UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

THAIS MICHELE SESSO VITOR

Fermentações em mostos com altos teores de açúcar

Piracicaba
2014

THAIS MICHELE SESSO VITOR

Fermentações em mostos com altos teores de açúcar

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valter Arthur

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista

Piracicaba

2014

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Vitor, Thais Michele Sesso
Fermentações em mostos com altos teores de açúcar / Thais Michele Sesso Vitor; orientador Valter Arthur, co-orientador Antonio Sampaio Baptista. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2014.
98 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Etanol 2. Fertilizantes de resíduos industriais 3. Impactos ambientais 4. Leveduras 5. Microscopia eletrônica de varredura 6. Saccharomyces 7. Tecnologia da fermentação 8. Vinhaça I. Título

CDU 661.722 : 582.282.23

Aos meus pais, Sandra e Sesso;

Às minhas filhas Gabriela e Isabela.

E ao meu marido Rodrigo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Á minha família, em especial a meu marido, pelo apoio, incentivo, dedicação e paciência em todos os momentos.

Ás minhas filhas Gabriela e Isabela, que me ensinam cada dia uma coisa nova, que não me cobram e nem me julgam por nada e são a razão da minha vida, amo vocês.

Aos meus pais, Sesso e Sandra, pelo carinho, compreensão e ajuda em todos os momentos da minha vida.

À minha grande amiga e irmã de coração, Fernanda, pelo apoio sempre, por não me deixar desistir, e por ajudar com minhas filhas quando foi preciso.

Ás avós Sandra e Ana pela dedicação e suporte para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao meu irmão André, por me ceder um pouco do seu tempo e me ajudar com seus conhecimentos.

Aos orientadores, Prof. Dr. Valter Arthur e Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista, pela amizade, confiança e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Benedicto Kroll, pelas orientações das análises estatísticas do trabalho.

Aos funcionários do setor de Açúcar e Álcool do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela colaboração e apoio durante os trabalhos realizados durante a Pós Graduação.

Em especial ao Pedrinho, funcionário do LAN, pela ajuda, dedicação, conversas e risadas ao longo destes 4 anos.

Aos meus colegas da pós graduação e da graduação, pelos cafés, conversas e risadas.

Aos estagiários que me ajudaram na execução deste trabalho, em especial ao Fernando Tonoli e Ruan P. Neto.

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka do NAP/MEPA (Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária), da ESALQ, por disponibilizar o uso do microscópio eletrônico de varredura e ao técnico Renato B. Salaroli, pelo auxílio nas análises.

À Marília R. G. Henyei, Bibliotecária do CENA/USP, pelas correções das referências.

Ao grupo de pesquisa Hugot-Bioenergia, da ESALQ, pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Ao programa de Pós–Graduação do CENA/USP, pela oportunidade concedida.

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

"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."

Chico Xavier

RESUMO

VITOR, T. M. S. **Fermentação em mostos com altos teores de açúcar.** 2014. 98 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

No Brasil, a produção de etanol é feita exclusivamente por via fermentativa. Devido ao baixo teor alcoólico do vinho (8 a 10 % v v^{-1}), para cada litro de etanol produzido são gerados de 10 a 12 litros de vinhaça. Este subproduto é rico em matéria orgânica (matéria orgânica variável de 15 a 37 Kg m^3 vinhaça, dependendo do tipo de mosto) e pode ser usado como adubo líquido na lavoura. Porém, a vinhaça no solo junto com outros efluentes líquidos, são fontes potenciais de poluição que podem contaminar águas subterrâneas. Por esses motivos, o objetivo deste trabalho foi produzir etanol a partir de fermentações com altos teores de açúcar, a partir da tecnologia VHG (Very High Gravity), visando a obtenção de vinhos com altos teores alcoólicos e com isso reduzir a quantidade de vinhaça gerada por litro de etanol produzido. Para tal foi realizada a adaptação da levedura PE-2 em meio de cultivo com crescentes concentrações de açúcares (9 a 24°Brix), sob 30°C. Nestas condições foi possível adaptar a célula das leveduras dessa linhagem em fermentações com altos teores de açúcar, sem promover morte celular ou perda visível da produtividade. Também foi observado que os volumes de vinhaça gerados em meios com altas concentrações de açúcar sofreram diminuição de até 72%. Ainda foi possível verificar que a levedura PE-2 se adaptou às concentrações crescentes de açúcar do mosto, mostrando tolerância em vinhos com altos níveis de álcool no final da fermentação, com alta viabilidade celular após o reciclo das células e não apresentou alterações morfológicas significativas na parede celular, quando observadas no microscópio eletrônico de varredura. Conclui-se que, é possível fazer a adaptação da levedura PE-2 em mostos com até 24 ºBrix. A adaptação dessa levedura em mostos com altos teores de açúcar na fermentação permite a diminuição de até 72 % do volume de vinhaça gerado.

Palavras-chave: Fermentação. Alto teor de açúcar. Etanol. Vinhaça. Levedura PE-2. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

VITOR, T. M. S. **Fermentation broth with high sugar contents.** 2014. 98 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

In Brazil, ethanol production is made only by fermentative pathway. Due to low alcohol wine (8-10% v v^{-1}), per liter of ethanol produced are generated from 10 to 12 liters of vinasse. This by-product is rich in organic matter (organic matter variable 15-37 Kg m^3 vinasse, depending on the type of wine) and can be used as liquid fertilizer in agriculture. However, vinasse in the soil along with other liquid effluents, are potential sources of pollution that can contaminate groundwater. For these reasons, the objectives of this work was to produce ethanol from fermentation with high levels of sugar, from the VHG (Very High Gravity) technology in order to produce wines with high alcohol levels and thereby decrease the amount of vinasse produced per liter of ethanol. For this adaptation of the yeast PE-2 in media with increasing concentrations of sugars (9 to 24 ^{o}Brix) under 30 °C was performed. Under these conditions it was possible to adapt the yeast cells of this strain in fermentations with high sugar contents, without promoting cell death or visible loss of productivity. It was also noted that the volumes of vinasse generated in media with high concentrations of sugar suffered decrease of up to 72%. Still been possible to see that the PE-2 yeast has adapted to increasing concentrations of sugar in the must, showing tolerance for wines with high alcohol levels at the end of fermentation with high cell viability after the cells recycle and no significant morphological changes in cell wall, as observed in the scanning electron microscope. It is concluded that it is possible to adapt the yeast PE-2 in musts with up to 24 ºBrix. The adaptation of this yeast in musts with high levels of sugar in the fermentation allows the decrease of up to 72% of the volume of vinasse generated.

Keywords: Fermentation. High sugar content. Ethanol. Vinasse. PE-2 yeast. Scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tanque de armazenamento de vinhaça 31

Figura 2 - Fertirrigação com vinhaça 31

Figura 3: Esquema de uma célula de levedura.....37

Figura 4 - Resumo da glicólise e fermentação convertendo glicose em etanol (WALKER, 2010) 39

Figura 5 - Reações da fermentação alcoólica (WALKER, 2010)..... 39

Figura 6 - Efeito da condição ambiental sobre o comportamento metabólico em *S.cerevisiae* (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999) 41

Figura 7 – Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura (CASTRO, 2002) 50

Figura 8 - Rendimento da fermentação dos diferentes tratamentos (ciclos fermentativos) 66

Figura 9 - Comportamento da produtividade das fermentações (g etanol L^{-1} mosto h^{-1}) durante os 15 ciclos fermentativos 68

Figura 10 - Produção de vinhaça relacionada com o teor alcoólico do vinho..... 70

Figura 11A - Imagens da levedura controle negativo (aumento de 5000 vezes).. 78

Figura 11B – Imagens da levedura controle positivo (aumento de 5000 vezes) .. 78

Figura 12A - Imagens da levedura controle positivo (aumento de 5000 vezes)... 80

Figura 12B - Imagens da levedura com 9°Brix (aumento de 5000 vezes)..... 80

Figura 12C - Imagens da levedura com 12°Brix (aumento de 5000 vezes) 80

Figura 12D - Imagens da levedura com 15°Brix (aumento de 5000 vezes) 81

Figura 12E- Imagens da levedura com 18°Brix (aumento de 5000 vezes)..... 81

Figura 12F - Imagens da levedura com 20°Brix (aumento de 5000 vezes)..... 81

Figura 12G - Imagens da levedura com 21°Brix (aumento de 5000 vezes) 81

Figura 12H - Imagens da levedura com 22°Brix (aumento de 5000 vezes) 81

Figura 12I - Imagens da levedura com 23°Brix (aumento de 5000 vezes)..... 81

Figura 12J - Imagens da levedura com 24°Brix (aumento de 5000 vezes)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes fermentativos em condições crescentes de açúcar, a uma temperatura de 30°C, com a linhagem PE-2..... 53

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) inteiramente ao acaso de diferentes concentrações de açúcar medidos pela produção de etanol..... 60

Tabela 3 - Valores médios de ART i no mosto, ART f no vinho e o tempo necessário para o término de cada ciclo fermentativo 62

Tabela 4 - Valores médios de etanol produzido durante os 15 ciclos fermentativos 64

Tabela 5 - Valores médios de biomassa e da viabilidade celular, durante os 15 ciclos fermentativos..... 73

Tabela 6 - Comportamento da viabilidade de células de leveduras em função do teor alcoólico do vinho..... 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 OBJETIVOS 23

3 REVISÃO DA LITERATURA 24

3.1 Produção de etanol 24

3.2 Fermentação alcoólica e produção de vinhaça 28

3.3 Fisiologia e bioquímica de leveduras 36

3.4 Efeitos da toxicidade do etanol sobre as células de levedura 46

3.5 Microscopia eletrônica de varredura. 49

4 MATERIAL E MÉTODOS 52

4.1 Locais de execução da pesquisa 52

4.2 Microrganismos e cultivo 52

4.2.1 Cultura de levedura 52

4.2.2 Meio de Fermentação..... 52

4.3 Condução dos ensaios 53

4.4 Parâmetros avaliados..... 55

4.4.1 Análises microbiológicas 55

4.4.1.1 Análise da viabilidade celular das leveduras 55

4.4.1.2 Imagens das leveduras em Microscopia Eletrônica de Varredura..... 55

4.4.2 Análises químicas 57

4.4.2.1 Determinação de açúcares redutores totais por DNS 57

4.4.2.2 Determinação de etanol nos vinhos delevurados..... 57

4.4.2.3 Determinação do teor de levedura no vinho..... 58

4.4.2.4 Estimativa da determinação da vinhaça 58

4.4.2.5 Produtividade de etanol..... 59

4.4.2.6 Rendimento fermentativo 59

4.4.2.7. Refratometria na escala Brix 59

4.3 Análise estatística 59

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61

5.1 Adaptação das leveduras em altos teores de açúcar no meio 61

5.2 Produção de etanol 63

5.3 Rendimento da fermentação 65

5.4 Produtividade 67

5.5 Produção de vinhaça 69

5.6 Formação de biomassa e viabilidade das células 71

5.7 Comportamento da viabilidade celular em função do teor alcoólico do meio 75

5.8 Morfologia das células de leveduras adaptadas ao mosto com altos teores de açúcares 78

6 CONCLUSÕES 84

REFERÊNCIAS 85

ANEXOS 97

1 INTRODUÇÃO

Uma tecnologia que está mudando significativamente a produção de etanol industrial é a fermentação de gravidade elevada (VHG) ou fermentação com alto teor de açúcar no mosto. Na produção de álcool combustível a partir de grãos, como milho e trigo, costuma-se usar mostos que contêm 20-22g de sólidos dissolvidos/100g. Nesta indústria, essa concentração de mosto é considerada "gravidade normal". Portanto, a tecnologia VHG para a produção de álcool combustível é definida como a preparação e fermentação do mosto contendo 27g ou mais de sólidos/100g dissolvido do mosto. Esta concentração corresponde a 300g de sólidos dissolvidos / L de mosto (THOMAS et al., 1993).

O processo de fermentação com alto teor alcoólico visa não somente o aumento da produção do etanol, como também possui vantagens técnica, econômica e ambiental. O grande interesse por essa tecnologia consiste na diminuição dos custos da produção do etanol: menor investimento de capital, redução de custos de mão de obra e energia por litro de etanol produzido, diminuição do consumo de água, facilidades de limpeza e sanitização, melhor assepsia, entre outros (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996).

Segundo Pereira et al. (2012), para a produção de elevados níveis de etanol a partir de açúcares fermentescíveis, um sistema promissor consiste na combinação de tecnologia de elevada gravidade (VHG) com operação em lotes repetidos com reciclo de biomassa. Tal sistema requer uma linhagem robusta capaz de converter eficientemente os açúcares em etanol à alta velocidade (alto rendimento e produtividade do etanol) com elevada tolerância ao stress osmótico, ao etanol e outros inibidores (formados durante o pré-tratamento das matérias-primas ou produzidos durante a fermentação).

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae,* têm sido tradicionalmente utilizada nas indústrias de pão, de cerveja e de vinho. Além disso, nos últimos anos, têm sido extensivamente estudadas para produção de etanol combustível. A levedura industrial deve responder às condições de estresse rapidamente e se adaptar aos fatores ambientais através do ajuste de suas atividades metabólicas, a fim de evitar perda substancial de viabilidade.

A capacidade de tolerar estresses variados é um critério importante para selecionar linhagens superiores, as quais apresentem eficiente fermentação de etanol (ZHAO; BAI, 2009).

As leveduras PE-2, CAT-1 e BG-1 mostraram uma notável capacidade de competir com leveduras nativas, sobrevivendo e dominando durante fermentações industriais, sendo atualmente as cepas mais utilizados em usinas de etanol no Brasil (BASSO et al., 2008). De acordo com a empresa LNF-Latino Americana (2012), a levedura PE-2 foi selecionada para o uso na fermentação do mosto de cana e de melaço em processos com reciclo total de células e teores alcoólicos de até 15% (v/v). Suas principais características são a alta resistência aos choques de pH, a longas paradas na fermentação e ao processo de reciclo. Também apresenta baixa formação de espuma, alta capacidade de implantação e predominância e elevado rendimento.

O etanol pode ser produzido a partir de qualquer carboidrato fermentescível pela levedura, a saber: sacarose, frutose, glicose, maltose, rafinose e outros, os quais podem ser encontrados em sucos de frutas, milho, melaço, beterrabas, batatas, malte, cevada, aveia, centeio, arroz, sorgo, etc. Material lignocelulósico, como madeira e resíduos da fabricação da pasta de papel também podem ser utilizados (MAY, 2008). A produção de etanol é iniciada aerobiamente para produzir o máximo de biomassa. De modo geral, o processo envolve as seguintes etapas: preparo do substrato, correção do mosto, preparo do inóculo, fermentação e destilação (PEREIRA et al., 2010).

A temperatura é sem dúvida, um dos mais importantes parâmetros ambientais que influenciam todas as atividades dos microrganismos, e as leveduras não são exceção. É regra prática estudar o metabolismo da levedura nas temperaturas ao redor de 25 a 30°C, embora estas temperaturas possam não ser estritamente pertinentes ao considerar os habitats naturais de muitas espécies de leveduras (WATSON, 1987).

Quando a concentração de açúcar aumenta, devido à letalidade induzida pelo etanol produzido, a temperatura deve ser diminuída, a fim de evitar quedas na viabilidade devido ao aumento da quantidade de etanol produzido pelas células de levedura. Assim, a diminuição da temperatura é recomendada para minimizar a mortalidade celular e manter níveis elevados da produção de etanol, quando a temperatura está aumentando no reator industrial (LALUCE et al., 2009).

Um dos estresses mais comuns que as células de leveduras encontram durante a fermentação é o aumento da concentração de etanol. Células de leveduras desenvolveram mecanismos apropriados para lidar com vários tipos de danos causados pelo aumento da concentração do etanol. Primeiro, o etanol aumenta a fluidez da membrana plasmática e destrói as estruturas da membrana normal. Em resposta, células de leveduras podem mudar composições de membrana para impedir a fluidização da membrana e estabilizar a membrana plasmática. A expressão de fatores que estabilizam e/ou reparam proteínas desnaturadas das células de leveduras, como a trealose induz as proteínas de choque ao calor tem manifestado correlação com as capacidades de tolerar álcool (SWAN; WATSON, 1998; VIANNA et al., 2008).

O etanol em concentrações relativamente baixas, inibe o crescimento da levedura, inibindo a divisão celular, diminuindo o volume celular e a taxa de crescimento específico, enquanto que altas concentrações de etanol diminuem a vitalidade da célula e aumentam a morte celular (BIRCH; WALKER, 2000).

Nas leveduras tolerantes ao etanol, uma quantidade significativa de trealose pode ser acumulada sob condições de crescimento em elevadas concentrações de etanol. Em contraste, as células incapazes de acumular trealose mostram crescimento retardado, na presença de alta concentração de etanol (OGAWA et al., 2000).

O conteúdo celular da trealose aumenta durante o crescimento exponencial em resposta a mudanças de temperatura atingindo um valor máximo na fase estacionária, o qual leva a aquisição da tolerância ou resistência ao calor, ao estresse osmótico e etanólico (ELEUTHERIO et al., 1995).

A composição da membrana plasmática da levedura pode influenciar a tolerância ao etanol. É sabido que durante a fermentação, a quantia crescente de etanol pode reduzir gradualmente a viabilidade da célula influenciando a integridade da membrana celular e sua função (PIPER, 1995). Embora comparado com outro alcanol tóxico, como o decanol, o etanol tem afinidade relativamente diminuída pela membrana celular. Será acumulado à concentração mais alta localizada na cabeça do grupo do fosfolipídeo, e consequentemente afete intensamente as propriedades físico-químicas e funções da membrana (WEBER; BONT, 1996).

Vários estudos recentes sugeriram que qualquer mudança na membrana celular para aumentar a estabilidade da membrana poderia antagonizar o efeito do etanol e aumentar a tolerância ao etanol (DING et al., 2009).

Segundo Basso, Basso e Rocha (2011), 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 os íons H +) é significativamente afetada. Como íons entram na célula, existe uma capacidade de dissipação do gradiente eletroquímico através da membrana, que por sua vez afeta a formação e manutenção da força motriz de prótons com subsequente diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana da levedura, existem vários outros efeitos do etanol sobre a fisiologia das leveduras durante a fermentação, incluindo a inibição de crescimento, e inativação enzimática, o que leva a uma diminuição da viabilidade celular.

Vários fatores desempenham um papel importante na diminuição da eficiência e amplitude na fermentação do etanol pelas leveduras, os mais importantes são: 1) inibição pelo produto final, o etanol; 2) inibição por certos sub-produtos tais como ácidos orgânicos; 3) inibição devido a pressões osmóticas resultantes de altas concentrações de açúcar; 4) inibição por temperaturas elevadas; 5) inibição da fermentação mas reforço do crescimento da célula devido à aeração; 6) inibição da fermentação devido a contaminação por bactérias ou outras leveduras, ou por níveis elevados de certos cátions (especialmente em fermentações industriais de escala); 7) inibição da fermentação devido a instabilidade da cepa que conduz a formação de mutações/variantes. De todos os fatores listados acima, o efeito inibitório do etanol sobre as células da levedura é de longe considerado o fator mais importante na fermentação alcoólica (PANCHAL, 1990).

O aumento da tolerância da levedura ao etanol pode resultar na obtenção de vinhos com altos teores alcoólicos. Isso permite otimizar o uso dos fermentadores e equipamentos para fazer a fermentação . Além disso, possibilita diminuir a geração de vinhaça, minimizando os impactos ambientais pelo uso desse resíduo. Tal fato facilita o gerenciamento do uso do resíduo, aumentando o potencial de sustentabilidade da usina e melhorando custo de produção.

2 OBJETIVOS

Avaliar a produção de etanol pela levedura PE-2 e sua adaptação à crescentes concentrações de açúcares (9 a 24°Brix),

Produzir etanol a partir de fermentações de mostos com altos teores de açúcar, visando à obtenção de vinhos com altos teores alcoólicos e com isso reduzir a quantidade de vinhaça produzida.

Avaliar a morfologia das células da levedura PE-2 em diferentes concentrações de açúcar no mosto, no microscópio eletrônico de varredura.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Produção de etanol

A segurança energética é um dos principais desafios deste século. O aumento da população mundial e do consumo *per capita*, associados ao problema da mudança do clima, ensejam a necessidade de ações mais coordenadas e sustentáveis, em seus aspectos ambientais, sociais e econômicos. Nesse sentido, o Brasil tem muito a contribuir, pois possui uma matriz energética com 46 % de fontes renováveis, considerando que o mundo em média utiliza 15 %. Isso faz com que o país possua uma posição de destaque no cenário mundial, principalmente por sua forte estratégia em agroenergia, que representa mais da metade dessa fonte renovável (BRASIL, 2009).

Um dos principais casos de sucesso é o Proálcool, lançado em 1975, com o objetivo de diminuir a dependência do petróleo importado pelo Brasil. Esse programa prestou uma grande contribuição ao desenvolvimento tecnológico do setor sucroalcooleiro. Atualmente, a cana-de-açúcar e seus derivados são a segunda principal fonte de energia primária da matriz energética nacional e o consumo de etanol já é superior ao da gasolina (BRASIL, 2009).

Depois do Protocolo de Kyoto em 1997 e do “Intergovernmental Panel of Climate Change” em 2007, reforçaram-se em todo o mundo, as discussões sobre o crescente efeito estufa e a grande necessidade de rápida redução de CO_2. Governos de muitos países não somente estipularam valores limite para a diminuição das emissões de gases das energias fósseis, mas também conduziram a substituição por energias renováveis a um tema principal (KOHLHEPP, 2010).

Durante as últimas décadas, o planeta Terra experimentou um acelerado processo de aquecimento global. A temperatura média da atmosfera terrestre e dos oceanos elevou-se desde o final do século XIX devido às atividades humanas relacionadas com a industrialização, principalmente pela queima de combustíveis fósseis com base de petróleo, gás e carvão (BRAVO, 2007).

Portanto, de acordo com Cortez (2010), seja pela questão ambiental global (redução de emissões de gases do efeito estufa), seja pela importância em diminuir

a dependência externa de energia, o etanol brasileiro, que já apresenta indicadores ambientais muito positivos quando comparado a outras opções, representa para o Brasil, hoje e nas décadas vindouras, uma grande oportunidade.

Os impactos do aquecimento global são graves e cada vez mais evidentes, incluindo secas em algumas zonas e inundações em outras, o derretimento das calotas polares assim como das glaciais (que são importantes fontes de água doce). Há uma extinção massiva de espécies relacionadas com a mudança climática, como por exemplo, anfíbios e recifes de corais. Os impactos na agricultura são muito graves, assim como o ressurgimento de enfermidades como a malária, dengue e outras relacionadas com a mudança climática (BRAVO, 2007).

O etanol de cana por ser muito eficiente e apresentar baixo custo de produção, é atualmente considerado uma das melhores opções para diminuir as emissões de gases do efeito estufa pela queima de combustíveis fósseis. O balanço energético (que corresponde à unidade de energia renovável extraída por unidade de energia fóssil inserida) é altamente favorável, atingindo 8,9:1, com emissões evitadas de 2,86 e 2,16 t CO_2 eq./m^3, para o etanol anidro e hidratado respectivamente (LUCON, 2008).

O etanol que é produzido em outros países, a partir de milho ou trigo, não atinge a grande eficiência do etanol, de cana-de-açúcar, chegando ao balanço de 1,5:1, o que faz o etanol brasileiro ser um importante instrumento de mitigação de emissões (COELHO; LORA; GUARDABASSI, 2010).

São muitas e variadas as opções de matérias-primas para a produção de etanol, mas poucas atingiram proporções significativas na área comercial. Estima-se que em torno de 90% da produção mundial se etanol seja a partir da cana-de-açúcar ou milho. Porém, com o aumento da produção mundial e a entrada de novos países na produção, outras matérias-primas começam a entrar em cena, principalmente beterraba, trigo, mandioca (LEAL et al., 2010).

Dentre os fatores climáticos, a temperatura é o mais importante para a produção de cana-de-açúcar. A planta, geralmente, é tolerante a altas temperaturas, produzindo em regiões com temperatura média de verão de 47°C, desde que empregada irrigação. Temperaturas mais baixas (menos de 21°C), diminuem o crescimento dos colmos e promovem o acúmulo de sacarose (RODRIGUES, 1995).

Segundo Taupier e Rodríguez (1999), a cana é uma planta que possui uma das maiores qualidades entre as culturas comerciais, por sua eficiência de assimilação de fotossíntese e capacidade de produzir massa verde composta por açúcares, amidos, proteína e compostos lignocelulósicos, todos eles matérias-primas para um amplo campo de produções de importância econômica.

Dois tipos de etanol são utilizados como combustível nos motores de combustão interna: hidratado e anidro. O etanol hidratado contém aproximadamente 95% de etanol em volume e o restante é água. É usado como combustível exclusivo nos motores de ignição por faísca (motores do Ciclo Otto) e, se misturado com aditivos adequados ou utilizado em sistemas biocombustível, pode ser usado em motores de ignição por compressão (motores do Ciclo Diesel). A produção de etanol anidro requer uma etapa adicional de desidratação, que segue a de destilação, e o produto final contém 0,4% de água, em volume (SZWARC, 2010).

De acordo com o JornalCana (2013), a produção de etanol na segunda metade de outubro, alcançou 1,64 bilhão de litros, alta de 10,92% sobre o valor observado em 2012 (1,48 bilhão de litro). Do total produzido na segunda quinzena de outubro, 795,13 milhões de litros referem-se ao etanol anidro e 849,72 milhões ao etanol hidratado. No acumulado desde o início da safra até 1º de novembro, a produção de etanol somou 21,83 bilhões de litros (alta de 19,77% sobre o último ano), sendo 12,34 bilhões de litros de etanol hidratado e 9,49 bilhões de litros de etanol anidro. A produção de açúcar alcançou 29,56 milhões de toneladas, praticamente a mesma quantidade observada na safra 2012/13 (29,34 milhões de toneladas).

O Brasil conta com características que favorecem a liderança no setor, como a grande extensão territorial e os recursos naturais que possibilitam ampliar a produção de insumos energéticos provenientes da biomassa. Os avanços na substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, servem de modelo para outras nações (BRASIL, 2011).

A hegemonia do Brasil na produção canavieira e expansão global (Brasil representavam 75% do aumento de área de cana no período de 2000 a 2007 e dois terços dos aumentos globais de produção nesse período) derivam da sua experiência e capacidade para responder à demanda internacional para transportes de combustíveis, que foi recentemente desencadeada por medidas para mitigar as emissões de gases do efeito de estufa do setor de transportes em rápido

crescimento, preocupações de países desenvolvidos para aumentar a segurança energética e diminuir a dependência do petróleo, e não menos a necessidade de muitos países em vias de desenvolvimento a diminuir as faturas de importação de óleo fóssil (FISCHER et al., 2008).

Segundo a ÚNICA (2013), entre março de 2003 (quando os carros flex foram introduzidos no mercado brasileiro) e setembro de 2012, o abastecimento de carros flex com etanol hidratado, um combustível renovável, ou com gasolina, que hoje contém 25% de etanol misturado, gerou uma diminuição pelos consumidores brasileiros de 177.238.070 toneladas de dióxido de carbono (CO_2), um dos gases mais danosos responsáveis pelo efeito estufa (GEEs) e, como consequência, o aquecimento global. Atualmente os veículos flex já representam mais de 50% da frota de automóveis leves no Brasil correspondendo a 17.895.374, contra 12.421.332 de veículos movidos à gasolina.

O etanol é um combustível produzido a partir de fontes renováveis e, na utilização como oxigenante da gasolina, diminui as emissões dos gases de efeito estufa (GEE). Essas duas características lhe dão uma importância estratégica ao combate à intensificação do efeito estufa e seus efeitos nas mudanças climáticas globais, e colocam o produto em linha com os princípios do desenvolvimento sustentável. Em comparação com o petróleo e seus derivados, apresenta baixa toxidez e elevada biodegradabilidade, fatores da maior importância no caso de derramamentos acidentais e vazamentos de combustíveis em costas litorâneas, solos, águas superficiais e subterrâneas. Isso quer dizer que, em caso de acidentes, os impactos ambientais do etanol são substancialmente menores e a recomposição do meio ambiente ocorre mais rapidamente em comparação com os combustíveis fósseis (UNICA, 2007).

Enquanto a queima de combustíveis fósseis lança na atmosfera CO_2, que causa o efeito estufa, o biocombustível retira da atmosfera o CO_2 (por meio da fotossíntese dos vegetais) que, depois, retornará ao ambiente na combustão desse biocombustível. Trata-se de um processo sustentável de energia, que mantém constante o nível de CO_2 constante na atmosfera (AMARAL; ALMEIDA; GIULIANI, 2008).

Para aumentar a sustentabilidade da agroindústria sucroenergética é importante a diminuição do uso de insumos e uso de microrganismos mais eficientes, para tal é necessário a adoção de novas tecnologias, tais como a

limpeza a seco da cana, concentração de vinhaça, a pervaporação e a diminuição da carga microbiana com vapor ou radiação ionizante.

3.2 Fermentação alcoólica e produção de vinhaça

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas, economicamente, as leveduras ainda são os agentes mais usados. A levedura da fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, da qual foram selecionadas várias linhagens, tidas por muito tempo como espécies: *Saccharomyces ellipsoideus*, *S. carlsbergensis*, *S. uvarum*. Cada linhagem (isolada de meios diferentes) tem suas características próprias, afetadas pelas condições que o processo fermentativo se desenvolve (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A fermentação é um processo vivo e, como tal, a conversão do açúcar em álcool depende da levedura. Entre as principais linhagens de leveduras utilizadas pelas destilarias brasileiras, estão as selecionadas de fermentações industriais. Na safra 2007/2008, as leveduras selecionadas CATI e PE2 foram introduzidas em 134 destilarias e respondem atualmente por 60% do álcool combustível produzido no país (AMORIM; BASSO; LOPES, 2008).

De acordo com Ribeiro, Blumer e Horii (1999), para que a fermentação tenha uma condução satisfatória, tanto quanto possível dentro de especificações técnicas, é imprescindível que se inocule no mosto, uma quantidade de microrganismos capaz de converter os açúcares em álcool e gás carbônico, dentro de determinadas condições. Este conjunto de microrganismos recebe a denominação de “pé-de-cuba” ou simplesmente fermento.

As leveduras são mesófilas, sendo as temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol na faixa de 26-35°C, com média de 30°C. O pH ótimo situa-se entre 4 e 5, mas fermentações alcoólicas desenvolvem-se bem em níveis mais elevados, em substratos com poder-tampão elevado como os melaços a pH 5,8-5,9 (LIMA, 1975).

Atualmente, os principais processos de fermentação alcoólica utilizados pelas destilarias brasileiras são o sistema em batelada alimentada e a fermentação contínua, ambos com reciclo de leveduras usando centrífugas (AMORIM; BASSO; LOPES, 2008). Cerca de 85% das destilarias utilizam o processo de batelada alimentada para a produção de álcool e somente 15% utilizam o processo de fermentação contínua (GODOY et al., 2008).

No processo de fermentação brasileira as células de levedura são intensivamente recicladas (> 90% das leveduras é reutilizada de uma fermentação para outra), resultando em densidades celulares muito elevadas no interior do fermentador (10-17% p / v, base úmida), o que contribui para um curto tempo de fermentação (BASSO et al., 2008).

A recuperação de células de levedura para sua reciclagem no processo fermentativo é feito por decantação, característica de pequenas instalações produtoras de aguardente, ou por centrifugação (processo Melle-Boinot). O processo de Melle-Boinot é caracterizado pela recuperação do fermento por meio da centrifugação. Assim que os açúcares se esgotam do mosto em fermentação, o vinho é bombeado da dorna para a centrífuga separadora, onde ocorre a separação: de um lado o leite de levedura e, do outro, o vinho delevedurado (ALCARDE, 2011).

As principais vantagens do processo Melle-Boinot (reciclo de leveduras) são: elevado rendimento alcoólico; maior rapidez da fermentação pelo maior teor de levedo recuperado; álcool de melhor qualidade em consequência; diminuição da contaminação bacteriana; menos incrustações nos aparelhos de destilação pela retenção do material orgânico pelas centrifugações (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

Assim que se mistura o inóculo ao mosto corrigido, inicia-se o processo de fermentação alcoólica dos açúcares fermentescíveis nele contidos. O início do processo se caracteriza pelo desprendimento do gás carbônico, passando a ocorrer, então, a multiplicação das células do fermento e a produção de álcool. Em seguida, inicia-se a fase tumultuosa, que dura cerca de doze a dezesseis horas. A temperatura se eleva rapidamente, a densidade do mosto se reduz e se eleva a percentagem de álcool e acidez. A fase complementar, que demora de quatro a seis horas para finalizar, caracteriza-se pela diminuição da intensidade do desprendimento do dióxido de carbono, pela paralisação da movimentação no

líquido e a diminuição da temperatura. Nessa fase, a concentração de açúcares é reduzida para próximo de 0% (AMORIM; LEÃO, 2005).

Todo o processo, incluindo as etapas de reciclagem e de fermentação, é considerado estressante para as leveduras, uma vez que estas ficam constantemente expostas a fatores adversos como oscilações de temperatura e pH, alta concentração de açúcar e álcool e competição com leveduras selvagens que vieram juntamente com o caldo não esterilizado (LUCENA et al., 2007).

A destilação do álcool resulta na geração em grande quantidade de um resíduo chamado vinhaça. Apenas após os responsáveis pelo agronegócio da cana terem verificado ser muito grande a quantidade de vinhaça, gerada com a expansão da produção de etanol, e as suas consequências sobre o ambiente, ficou evidenciada a dimensão do problema e de ser necessária a mobilização de esforços no sentido de se desenvolver possibilidades tecnológicas para sua solução (LAIME, et al., 2011).

Uma tecnologia que está sendo usada atualmente pelas indústrias de bioetanol é chamada fermentação VHG (very high gravity), e tem como vantagem apresentar grande economia de água de processo e necessidade de energia por meio da fermentação de altas concentrações de açúcar e, por conseguinte, um aumento final da concentração de etanol no meio. A tecnologia permite também o aumento da eficiência da fermentação, sem grandes alterações às instalações existentes, por utilização eficiente do espaço fermentador e eliminação de perdas conhecidas (PULIGUNDLA et al., 2011). Com essa tecnologia (VHG) foi possível diminuir pela metade a quantidade de vinhaça gerada durante a produção de etanol (AMORIM; BASSO, 2009).

A vinhaça, vinhoto, restilo ou garapão caracteriza-se por ser o resíduo líquido que se obtém na operação de destilação no processo de produção de álcool. Essa, é rica em potássio e enxofre, apresenta quantidades consideráveis de fósforo, nitrogênio, cálcio, magnésio e micronutrientes. Além disso, caracteriza-se por apresentar uma demanda química de oxigênio (DQO) muito alta, pelo que constitui uma fonte importante de contaminação de águas superficiais, dos lençóis de água e do meio ambiente, em geral (MUTTON; ROSSETO; MUTTON, 2010; GONZÁLEZ, GARLOBO, 1999).

De acordo com Freire e Cortez (2000), é produzida em média, à razão de aproximadamente 13 litros de vinhaça por litro de álcool destilado. Após a produção

a vinhaça é inicialmente armazenada em tanques, conforme ilustrado na Figura 1 (USINA ALTA PAULISTA, 2012) e aplicado nas lavouras através de fertirrigação conforme a Figura 2.

Figura 1 - Tanque de armazenamento de vinhaça
Fonte: Usina Alta Paulista (http:// www.usalpa.com.br/galeria_vinhaca.html)

Figura 2 - Fertirrigação com vinhaça
Fonte: Usina São Martinho
(http://www.mzweb.com.br/saomartinho2009/web/conteudo_pti.asp?conta=45&tipo=28770).

A composição química da vinhaça é bastante variável, dependendo principalmente da composição do vinho submetido à destilação, o qual está relacionado a outros fatores, tais como: natureza e composição da matéria-prima, sistema de preparo do mosto, método de fermentação e sistema de condução da fermentação alcoólica, linhagem da levedura utilizada, tipo do aparelho de destilação, maneira de destilação e tipo de flegma preparado (PAMPLONA, 1984).

Segundo Marques (2006), a vinhaça é composta, em sua maioria, de água (≅ 97%). A fração sólida é constituída principalmente de matéria orgânica e elementos minerais, e o K representa cerca de 20% dos elementos presentes e constitui o elemento limitante para a definição da dose a ser aplicada nos solos.

De acordo com Rossetto (1987), o constituinte principal da vinhaça é a matéria orgânica, basicamente sob a forma de ácidos orgânicos e, em menor quantidade, por cátions como o K, Ca e Mg, sendo que sua riqueza nutricional está ligada à origem do mosto. Quando se parte de mosto de melaço, apresenta maiores concentrações em matéria orgânica, potássio, cálcio e magnésio, ao passo que esses elementos decaem consideravelmente quando se trata de mosto de caldo de cana, como é o caso de destilarias autônomas. Dos efluentes líquidos da indústria sucroalcooleira, a vinhaça é a que possui maior carga poluidora, apresentando DBO variando de 20.000 a 35.000 mg L-1.

A vinhaça, ao ser aplicada no solo acarreta modificações na dinâmica de íons. O alto teor em K adicionado forma complexos químicos, promovendo lixiviação de ânions como o nitrato, podendo poluir águas subterrâneas e aquíferos. Esta é a grande preocupação oriunda da utilização da vinhaça, a que os órgãos ambientais estão atentos (ROSSETO, 2006).

Hirata et al. (1991), demonstraram que a região que concentra grande parte da produção de açúcar e álcool no Estado de São Paulo localiza-se sobre a chamada região de recarga do aquífero Guarani, um dos mais importantes da América do Sul. Nesta região, os lençóis subterrâneos são relativamente próximos da superfície, o que os torna vulneráveis a infiltrações de substâncias poluentes, principalmente os sais (potássio, nitratos, etc.).

A fertirrigação já era uma alternativa conhecida, há muito tempo. Aplicada ao solo, a vinhaça irriga e, ao mesmo tempo, fertiliza a lavoura, razão pela qual ela traz o duplo benefício da disposição da vinhaça e da economia de custos em insumos, diminuindo gastos com fertilizantes e, em consequência disso, tornou-se uma prática

adotada por quase todas as usinas e destilarias. Vários experimentos comprovam os resultados positivos obtidos na produtividade agrícola, associados à economia na aquisição dos adubos minerais e reduzindo a poluição do lençol freático, quando a vinhaça é disposta em doses recomendadas (LAIME et al., 2011). Pode ser aplicada no solo de várias formas: sulcos de infiltração, caminhões-tanque, aspersão convencional (moto-bombas), aspersão com canhão hidráulico (ROSSETTO; SANTIAGO, 2011).

A vinhaça quando não é tratada, vira um danoso poluente, pois as bactérias aeróbias presentes no ambiente, provenientes do caldo consomem de forma voraz o oxigênio das águas, matando a vida dos rios. A vinhaça pode ser jogada em áreas de sacrifício, em geral, grandes tanques de estocagem do produto. Nesse caso, o prejuízo ambiental pode se dar com a contaminação dos lençóis freáticos e com o seu transbordamento, o que volta a ameaçar os rios. Por outro lado, quando utilizada adequadamente, a vinhaça se transforma em um valioso adubo orgânico (FILHO; SZMRECSÁNYI; RAMOS, 2010).

O destino desse resíduo deve atender a legislação ambiental através da Norma Técnica P-4.231 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, (LABORSOLO, 2010), a qual rege quanto ao seu armazenamento, transporte e aplicação no solo. Baseado nessa norma se deve ressaltar os seguintes itens: área para aplicação de vinhaça no solo; armazenamento da vinhaça e distribuição da vinhaça.

Quanto à área para a aplicação da vinhaça segundo a CETESB (2005), não pode estar contida no domínio das Áreas de Preservação Permanente (APP) ou reserva legal; não pode estar contida no domínio de áreas de proteção de poços, nem de ferrovias e rodovias federais ou estaduais; deve estar afastada no mínimo 1 Km dos núcleos populacionais e em áreas com declividade maior que 15% deverão ser adotadas práticas conservacionistas. Além disso, a concentração máxima de potássio no solo não poderá exceder a 5,0 % da capacidade de troca catiônica (CTC), quando esse limite for atingido a aplicação da vinhaça ficará restrita a reposição desse nutriente em função da extração média pela cultura que é de 185 Kg de K_2O por hectare por corte.

Ainda de acordo com a CETESB (2005), as normas para o armazenamento e distribuição da vinhaça devem seguir as seguintes recomendações: os tanques de armazenamento deverão ser impermeabilizados com geomembrana

impermeabilizante ou outra técnica de igual ou superior efeito; os tanques devem ser instalados no mínimo quatro poços de monitoramento onde serão medidos pH, dureza, sulfato, manganês, alumínio, ferro, nitrogênio nitrito, nitrogênio nitrato, nitrogênio amoniacal, potássio, cálcio, cloretos, sólidos dissolvidos totais, condutividade elétrica e fenóis; os canais mestres ou primários para distribuição de vinhaça deverão ser impermeabilizados com geomembrana. Ao término de cada safra, deverá ser realizada a limpeza da vinhaça nos tanques e nos canais mestres.

A Norma Técnica P- 4. 231 (CETESB, 2005), aprimora a prática comum, pois estabelece limites de aplicação da vinhaça no solo agrícola com base, entre outros, na concentração de potássio (K) no solo. Impõe ainda uma série de medidas de proteção ambiental, incluindo um acompanhamento da qualidade das águas subterrâneas nas áreas em que a vinhaça é aplicada, evitando ou controlando qualquer ocorrência de poluição. Anualmente, as indústrias paulistas são obrigadas a apresentar à CETESB um plano de aplicação de vinhaça demonstrando o atendimento da norma, plano usado em ações de fiscalização. O aprimoramento técnico que a Norma Técnica de São Paulo traz tende a se transformar em padrão para aplicação nacional (UNICA, 2007).

A distribuição da vinhaça sobre o solo envolve quatro fases bastante diferenciadas: o transporte primário, da indústria até os tanques de armazenamento; o armazenamento; o transporte secundário, dos tanques até as áreas de aplicação; e a distribuição sobre o solo. Cada fase envolve equipamentos, infraestrutura, mão de obra e técnicas de manejo específicas focados em metas econômicas e ambientais, cuja integração constitui a essência da logística do aproveitamento da vinhaça (BRAUNBECK; NETO, 2010).

O benefício imediato decorrente do uso racional desse resíduo nas lavouras canavieiras se dá pelo aumento da produtividade, que ocorre com mais intensidade em solos mais pobres e em regiões mais secas, e inclui-se aqui a economia de fertilizantes. Entretanto, mesmo com os efeitos benéficos da vinhaça no solo sabe-se que, quando aplicada em altas taxas, conduz a efeitos indesejáveis, como o comprometimento da qualidade da cana para produção de açúcar, poluição do lençol freático e até para a salinização do solo (JUNQUEIRA et al., 2009).

Pesquisadores e a iniciativa privada descobriram uma maneira de diminuir pela metade a quantidade de vinhaça resultante da produção de etanol. Atualmente, a maioria das usinas trabalha com um vinho de teor alcoólico de aproximadamente

8 % v/v. Em vinhos com teores alcoólicos mais elevados, as leveduras começam a morrer intoxicadas pelo etanol contido no mosto. O resultado é que para cada 1 litro de álcool são produzidos até 12 litros de vinhaça. Contudo, há relatos de que foi possível aumentar o teor alcoólico da fermentação para 16 % (v/v), adicionando o mosto concentrado (com mais açúcar) nas dornas, sem matar as leveduras. O resultado final da fermentação é mais álcool e menos vinhaça no tanque. O volume do resíduo cai pela metade – 6 litros de vinhaça por litro de álcool-, com o dobro da concentração de potássio. Assim, torna-se economicamente viável, transportar e espalhar a vinhaça por uma área maior, com menos impacto sobre o meio ambiente (AMORIM; BASSO, 2009).

Portanto, a preocupação com o meio ambiente tem se destacado devido à diminuição do consumo de água e no volume de vinhaça produzida. Na fermentação com alto teor alcoólico, uma diminuição de aproximadamente 40% no consumo de água pode ser obtida através do preparo do mosto com alta concentração de sólidos, da mesma forma consideráveis economias de energia em outras etapas do processo podem ser esperadas porque há menos fluido para aquecer, resfriar e destilar (PULIGUNDLA et al., 2011).

Marques e Serra (2004) realizaram um estudo do reciclo de células na produção de etanol visando avaliar o efeito tóxico do etanol e de outros metabólitos nas fermentações subsequentes. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904 foi inoculada em mosto preparado a partir de melaço diluído com 180 gL^{-1} e 310 gL^{-1} de açúcares redutores totais. Observaram que a interferência do etanol é mais preocupante em fermentações com altas concentrações de açúcar no mosto e que a interferência no metabolismo devido à reciclagem de células torna-se mais clara à medida que aumenta a concentração de açúcares no mosto.

De acordo com Pereira et al. (2012), para a produção de elevados níveis de etanol a partir dos açúcares fermentescíveis, um sistema promissor consiste na combinação de fermentação com alto teor alcoólico, tecnologia com operação de batelada repetida utilizando reciclagem de biomassa. Tal sistema requer uma cepa robusta capaz de converter eficientemente os açúcares em etanol à alta velocidade (alto rendimento e produtividade do etanol) com alta tolerância ao estresse osmótico, etanol e outros inibidores (seja formado durante o pré-tratamento das matérias-primas ou produzidos durante a fermentação). Também de acordo com Laluce et al. (2009), durante as fermentações consecutivas com a reutilização celular, a viabilidade das

células de levedura tem que ser mantida em um nível elevado, a fim de evitar o colapso do processo.

Segundo Steckelberg et al. (2010) linhagens de leveduras tolerantes ao alto teor de etanol são bastante desejáveis nos processos fermentativos industriais. Essas leveduras apresentam uma operação com concentração de etanol no vinho mais elevada, o que traz muitas vantagens nos processos industriais podendo citar entre elas: economia de vapor na destilação, ganho de produtividade dos aparelhos de destilação, diminuição do volume de vinhaça, menor necessidade de separadoras nas centrífugas.

Ainda de acordo com Steckelberg et al. (2010) pelos motivos descritos no parágrafo anterior, busca-se trabalhar sempre com a máxima concentração de etanol possível no vinho, sendo este limitado pelo nível de inibição causado por este produto sobre a cepa de levedura utilizada no processo. Quanto maior for a tolerância da mesma ao etanol, mais elevado pode ser a concentração deste produto no vinho**.** Também de acordo com Amorim, Basso e Lopes (2008), teores alcoólicos mais elevados permitem economia de energia, ao mesmo tempo que podem promover melhor controle da contaminação bacteriana.

3.3 Fisiologia e bioquímica de leveduras

Independentemente da época, ou da forma de condução da fermentação, a levedura responsável pela transformação do açúcar da cana de açúcar ou melaço pertence ao gênero *Saccharomyces*. Os fatores que consagram esse microrganismo como o mais indicado para esse fim resultam do fato desse fungo reunir os atributos desejados para a condução de um processo de produção de álcool. Capacidade de: rapidamente transformar açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido são os principais atributos desejáveis para uma cepa de uso industrial (ANDRIETTA et al., 2006).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* se reproduzem vegetativamente por brotamento, formam esporos ovóides ou esféricos (1-4), a parede do asco não se desfaz quando atinge a maturidade, fermentam vigorosamente (AMORIM, 1977).

Leveduras são fungos geralmente unicelulares, apresentando tamanho variável de 1-5 µm de diâmetro a 5-30 µm de comprimento. Sua forma também é muito variável, desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas, quase filamentosas. Suas células apresentam as características dos seres eucarióticos. Têm membrana citoplasmática lipoproteica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente. Possuem também, uma parede celular rígida, constituída principalmente de dois polissacarídeos: manana e glucana; além disso, contém proteínas e lipídeos. No citoplasma, encontram-se, além dos componentes usuais em solução, um ou mais vacúolos, delimitados por uma membrana; mitocôndrias; retículo citoplasmático; ribossomos e, grânulos de material de reserva (LIMA, 1975). A célula de levedura está representada na Figura 3.

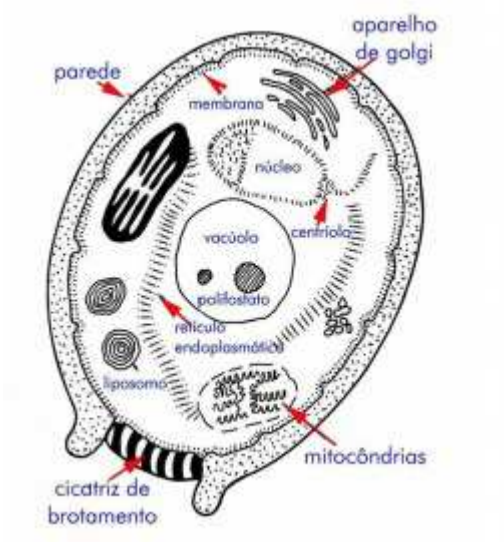

Figura 3: Esquema de uma célula de levedura
Fonte: Processo industrial no setor sucroalcooleiro
(http:// http://pimartins.weebly.com/fermentaccedilatildeo.html)

A principal função da membrana celular dos microrganismos é formar um obstáculo, regular a permeabilidade dos solutos entre a célula e o meio externo. A membrana mantém metabólitos essenciais e macromoléculas no interior da célula, bombeando os nutrientes para o interior da célula contra um gradiente de concentração, o que evita a entrada de certos solutos presentes no ambiente. (WEBER; BONT, 1996).

Segundo Amorim e Leão (2005) a indústria de álcool vem efetuando amplamente o sistema de reaproveitamento de inóculo, com a recuperação de leveduras, por causa de suas vantagens: redução substancial de tempo na fase inicial da fermentação, devido à concentração ótima de células recebidas pelo substrato, que permite rápida entrada na fase seguinte do processo, a chamada tumultuosa, com evidentes ganhos de rendimento econômico.

No sistema de recuperação de leveduras, após a fermentação passa-se todo o substrato por separadoras centrífugas, onde se separam de 10 a 20% do volume, sob a forma de um líquido espesso, com a aparência de um creme, a que se denomina leite ou creme de leveduras. Envia-se esse leite de leveduras para purificação com um tratamento com água e ácido sulfúrico até pH 2,2-3,2, sob agitação, por 4h e daí, de novo, para as dornas de fermentação (LIMA, 1975).

O etanol pode ser obtido por três maneiras gerais: por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa. A via destilatória não tem significação econômica no Brasil. Por via sintética, obtêm-se a partir dos hidrocarbonetos não-saturados eteno e etino, de gases do petróleo e da hulha. A via fermentativa é a mais importante para a obtenção do álcool etílico e divide-se em três fases distintas: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação (LIMA, 1975).

A fermentação da sacarose de acordo com Lima e Marcondes (2002) envolve muitas reações e etapas, contudo, forma simplista pode-se dizer que primeira etapa é a hidrólise da sacarose e a segunda é a fermentação alcoólica propriamente dita. A glicólise (Figura 4) é composta por reações catalizadas por enzimas, na qual a glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e dois equivalentes reduzidos de $NADH^+$, que serão introduzidos na cadeia respiratória ou na fermentação (WALKER, 2010).

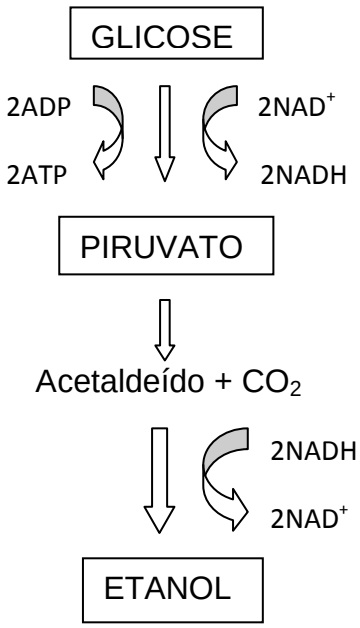

Figura 4 - Resumo da glicólise e fermentação convertendo glicose em etanol (WALKER, 2010)

A partir do piruvato, as reações podem ocorrer em duas etapas (Figura 5): na primeira, o piruvato é descarboxilado em acetaldeído (pela enzima piruvato descarboxilase), na segunda etapa, o acetaldeído é finalmente reduzido pela NADH em etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase (WALKER, 2010).

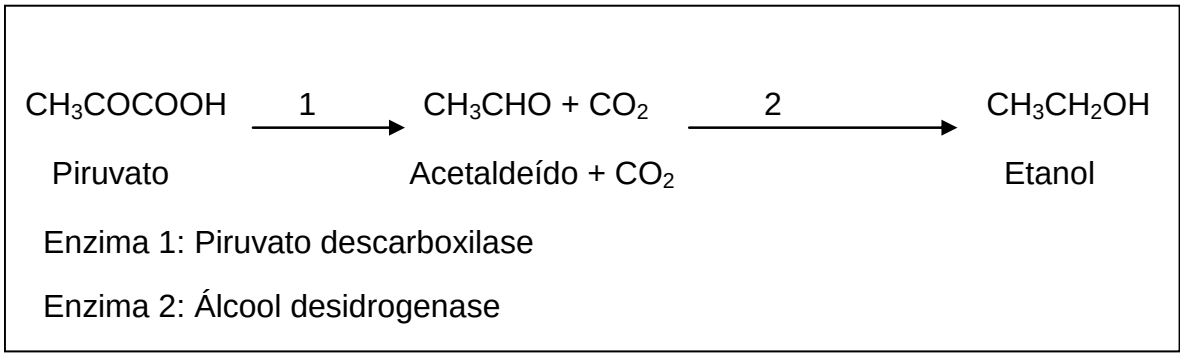

Figura 5 - Reações da fermentação alcoólica (WALKER, 2010)

O etanol pode ser produzido a partir de qualquer matéria orgânica de origem biológica que tenha quantidades consideráveis de açúcares e materiais que possam

ser convertido em açúcar, tais como amido ou celulose. A cana-de-açúcar, beterraba açucareira e, sorgo são exemplos de matéria-prima que contêm açúcar e, por conseguinte, pode ser utilizado para a produção de etanol (ESCOBAR et al., 2009).

Os processos de produção de etanol convencionais envolvem uma etapa de pré-tratamento, onde o açúcar obtido na matéria-prima é separado e usado como substrato para o fermentador, onde ele é convertido em etanol. Estes processos são baseados em técnicas tradicionais de fabricação de cerveja e utilizam linhagens de *Saccharomyces. cerevisiae*, porque elas tem um elevado rendimento de etanol, uma alta produtividade, e sua capacidade de resistir a altas concentrações de etanol mantém os custos de destilação baixo (NEVES et al., 2007; ESCOBAR et al., 2009).

Os microrganismos executam essa reação, obtendo, através dela, a energia necessária para sua sobrevivência. Durante o processo, o mosto aumenta a temperatura devido à energia liberada e são desprendidas bolhas de CO_2. O álcool produzido está misturado com a água e muitas outras substâncias. Através de uma destilação fracionada, o álcool é separado dos demais componentes (PEREIRA et al., 2010).

As fontes de hexose mais empregadas segundo Revilla et al. (1999) são: caldo e méis de cana-de-açúcar, amido de milho, outros grãos ou tubérculos e diferentes tipos de frutas. As matérias-primas amiláceas devem ser submetidas a tratamentos para desdobrar o amido, quer seja por hidrólise química ou enzimática. As matérias que contém sacarose são convertidas de forma direta em hexose pela ação da enzima invertase, produzida pela própria levedura durante o processo.

O ácido pirúvico é um composto chave, pois dependendo das condições do meio, ele pode sofrer diferentes transformações. Se o meio onde estão as leveduras possui oxigênio, este sofrerá uma série de reações de oxi-redução, dentro da mitocôndria (Ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos) produzindo NADPH e $FADH_2$, que na cadeia respiratória produzirão energia na forma de ATP e água. No ciclo de Krebs será liberado CO_2. Estas transformações na mitocôndria com a formação de ATP, CO_2 e H_2O recebeu o nome de respiração. No caso da fermentação, o ácido pirúvico é transformado em aldeído acético e CO_2 (AMORIM, 1977).

Em outras palavras, de acordo com Phaff, Miller e Mrak (1966), a *Saccharomyces cerevisiae*, na presença de oxigênio, tem a habilidade de fazer respiração ou oxidação da glicose a CO_2 e água. Dependendo das condições de

crescimento, a *Saccharomyces cerevisiae* pode mudar o seu metabolismo de um fermentativo para uma via oxidativa; ambos os sistemas com rendimento de energia para a célula, embora este último muito mais do que o primeiro. Pasteur foi o primeiro a demonstrar que a levedura em fermentação, quando submetido a aeração, diminui sua atividade fermentativa e parte da glicose é transformada para CO_2 e água. Este fenômeno chamado *Efeito Pasteur*, recebeu uma aplicação prática na produção de fermento de pão onde a formação de álcool não é desejável.

Segundo Ribeiro, Blumer e Horii (1999), se não houver oxigênio disponível, a liberação de energia por molécula de açúcar é baixa e, sob esta condição, a fermentação do açúcar conduz primariamente à formação de etanol e do CO_2. Na Figura 6 é mostrado o efeito ambiental sobre o comportamento metabólico em *Saccharomyces cerevisiae*, onde observa-se a formação preferencial de biomassa apenas em baixas concentrações de açúcares e em presença de oxigênio.

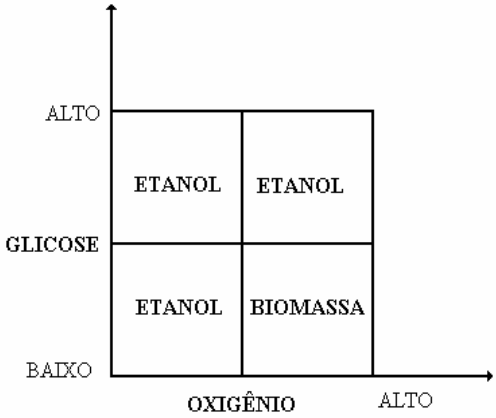

Figura 6 - Efeito da condição ambiental sobre o comportamento metabólico em *S. cerevisiae* (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999)

Mesmo com altos teores de açúcar, ocorre o efeito “Crabtree”, que é a inibição e repressão dos citocromos pela concentração de açúcares, reduzindo, portanto a respiração, o que faz com que as leveduras acelerem o processo fermentativo mesmo que haja oxigênio dissolvido no meio de fermentação. Ocorre, portanto uma típica fermentação anaeróbica com produção de etanol ainda que em presença de oxigênio (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

Na prática industrial, segundo Filho et al. (2013), o efeito “Crabtree” tornou-se bem conhecido nas destilarias brasileiras de etanol que fazem uso de mostos diluídos para favorecer a multiplicação (respiração) de fermento no início da safra. Também ocorre quando a destilaria encontra dificuldades em refrigerar o mosto em fermentação. A fim de diminuir a geração de calor, a concentração inicial de sólidos solúveis do mosto é diminuída promovendo aumento no crescimento do fermento.

Na biossíntese do etanol são empregadas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae.* É muito importante que a cultura de levedura possua um crescimento vigoroso e uma elevada tolerância ao etanol, apresentando assim a fermentação um grande rendimento final. O etanol em altas concentrações atua como um inibidor de crescimento e a tolerância das leveduras é um ponto crítico para uma produção elevada deste metabólito primário. A tolerância ao etanol varia consideravelmente de acordo com as linhagens de leveduras. De modo geral, o crescimento cessa quando a produção ultrapassa 5 % de etanol (v/v), e a taxa de produção sofre grande diminuição, na concentração de 6 a 10 % (v/v) de etanol (MAY, 2008).

Pesquisadores analisaram uma linhagem de levedura bastante usada na produção de etanol, a Pedra 2, uma das adotadas na usina Santa Fé, e a compararam com a linhagem de referência S288c. Ambas têm 16 cromossomos e cerca de 6 mil genes, mas cada linhagem ganhou ou perdeu genes em relação à outra. De acordo com Juan Lucas Argueso, pesquisador brasileiro que coordenou a análise genética, a Pedra 2 possui 16 genes que não são encontrados na linhagem de laboratório e devem favorecer a sobrevivência nos tanques de fermentação. Dois desses genes conferem resistência à toxicidade do etanol, cuja concentração aumenta com o avanço da fermentação (FIORAVANTI, 2009).

Kasavi et al. (2012), em seus estudos com 5 tipos de leveduras (BC187, Y9, K11, L-1374 e L-1528), observaram que todas as cepas apresentaram 77% ou produtividade maior de biomassa celular em meios contendo entre 0 e 47,28 g L^{-1} de etanol. A capacidade de crescimento das cepas apresentou uma nítida diminuição com a crescente concentração de etanol e cepas apresentaram apenas (1-2)% de crescimento em meio contendo 118,2 g L^{-1} de etanol.

Bassi et al. (2013), observaram o efeito de dois tratamentos (individual e combinado) sobre o crescimento e fermentação das leveduras *Dekkera bruxellensis* (CCA059, CCA077 e CCA155) e *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). O tratamento

individual (baixo pH ou alta concentração de etanol) afetou igualmente a viabilidade celular da CCA155 e da *S. cerevisiae*, e a inibição mais eficiente foi atingida com 15% de etanol. Já o tratamento combinado de pH 2,0 e 13% de etanol resultou em uma diminuição da viabilidade celular da *D. bruxellensis* quase três vezes maior que o da *S. cerevisiae*.

A levedura é sensível à temperatura, alta ou baixa, e responde, acionando mecanismos de estresse incluindo elevação de trealose intracelular. Além disso, certas proteínas, chamadas proteínas de choque térmico, são sintetizados. Algumas linhagens de leveduras são mais capazes de suportar estresse de temperatura do que outras. Algumas leveduras também são geralmente capazes de tolerar níveis mais altos de álcool. Em 1980, era habitual executar os fermentadores em 8-10 % de etanol, mas agora 16-17 % é o desejável (KELSALL; LYONS, 2003).

De acordo com Troyer (1953), os principais efeitos do etanol sobre o crescimento da levedura são o decréscimo do número total de células formadas e a diminuição exponencial na taxa de multiplicação. Resultados de experimentos envolvendo estimativa de números de células e utilização de glicose na mesma cultura indica que o primeiro efeito da adição de etanol é, provavelmente, uma redução da multiplicação celular. Sugere-se que a redução do crescimento efetuada por etanol resulta não apenas em menos células ativas, mas também no acúmulo da ligação de alta energia do fosfato. Estes dois efeitos, que resulta em uma diminuição na utilização de glicose, pode contribuir para a ocorrência do fenômeno de álcool tolerância.

Felipe (2010) também afirma que o etanol é prejudicial para o processo fermentativo, pois causa alteração da composição da camada lipídica da membrana celular, diminui as atividades metabólicas em função da inibição do transporte de glicose com consequente estresse hídrico, limita o rendimento e a produtividade do processo fermentativo e ainda diminui a tolerância da célula a temperaturas mais altas.

Segundo Walker (1998), as propriedades desejadas para leveduras produtoras de combustível etanol na fermentação são taxas rápidas e altas de fermentação e leveduras produtoras de etanol em meios de alta gravidade (produção › 18% v/v etanol); alta tolerância ao etanol; baixo pH e temperatura ótima alta para fermentação; utilização eficiente de substratos variados; níveis reduzidos

de metabólicos secundários de fermentação (ácidos orgânicos, glicerol, álcool superior, ésteres, aldeídos).

Em relação ao que se conhece até o momento, existe uma linhagem de levedura, a qual foi isolada de um processo de fermentação alcoólica brasileira, que tem a capacidade de permanecer, embora nem sempre como a linhagem dominante, em grande parte das destilarias em que é usada como inóculo. Essa linhagem é conhecida como PE-2. A sua capacidade de dominância do processo parece estar ligada ao alto rendimento em célula (Yx/s) e à alta velocidade de consumo de substrato apresentado por esta linhagem (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

De acordo com Amorim, Basso e Lopes (2008), nos ensaios de fermentação realizados em laboratório, as linhagens CATI e PE-2 apresentaram, na média de seis ciclos fermentativos, rendimentos 3% superiores ao da levedura de panificação. Além disso, CATI e PE-2 apresentaram maior viabilidade celular e tolerância aos estresses da fermentação alcoólica.

Algumas cepas foram capazes de persistir em muitas destilarias por muitas temporadas. As cepas PE-2 e CAT-1 apresentaram as maiores capacidades de implantação. Essas cepas podem ser implantadas em 51 a 58% das destilarias, onde foram introduzidas. Elas também apresentaram maior competitividade em relação às cepas contaminantes, o que representa uma média de 45 para 54% da biomassa de levedura durante a temporada de fermentação (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

A levedura selvagem é aquela que se encontra em seu estado natural, ou seja, não foi ainda manipulada antes do trabalho industrial, como no caso da produção de álcool. As fermentações desenvolvidas com estes microrganismos frequentemente são aleatórias, irregulares e de baixo rendimento. Convém salientar, entretanto, que muitas das leveduras usadas industrialmente são originárias de linhagens selvagens devidamente selecionadas (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

Basso et al. (2008), nos seus estudos com linhagens de *S. cerevisiae*, utilizou leveduras empregadas na indústria e os dados mostraram que as linhagens PE-2, CAT-1 e a BG-1 apresentaram uma notável capacidade de competir com leveduras selvagens, sobrevivendo e dominando durante fermentações industriais.

A atividade de água que representa o limite de crescimento para a maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (0,92) é equivalente a aproximadamente 15,9% etanol (p/v). Apenas em condições excepcionais podem

algumas linhagens de *S. cerevisiae* tolerar mais de 15% de etanol (p/v). Em concentrações de etanol mais elevadas, a atividade metabólica cessa e a lise de células pode ocorrer (HALLSWORTH, 1998).

No que tange ao crescimento das leveduras produtoras de etanol as propriedades desejadas são: alta taxa de crescimento de levedura, mas com diminuição do rendimento no crescimento final; alta viabilidade e vitalidade da célula; tolerância alta ao açúcar, às substâncias químicas tóxicas/inibidor e à flutuação de temperatura; tolerância à contaminação por bactérias; estabilidade genética; fácil propagação; mínima geração de calor durante fermentação; posse de características adequadas de floculação dependendo da necessidade do processo; possuir fator “Killer” (WALKER, 1998).

Segundo Kelsall e Lyons (2003), os lactobacilos consomem glicose para produzir ácido láctico e ácido acético, que é o segundo maior fator que afeta o rendimento de álcool na fermentação, que, por sua vez, tem um grande impacto na economia da destilaria. As leveduras produzem alguns ácidos orgânicos durante a fermentação, mas as concentrações são relativamente baixas quando comparadas com as produzidas por lactobacilos e outros bactérias contaminantes.

O dano térmico para uma célula de levedura conduz a uma desnaturação geral das proteínas de levedura e ácidos nucleicos. Uma célula de levedura não pode regular a sua temperatura e todos os processos de fermentação produzem calor. Quanto maior a temperatura acima da temperatura ótima para o crescimento da célula, maior a perda de viabilidade celular. A termotolerância da levedura é máxima quando o pH externo declina para 4,0 . Existe uma correlação geral entre taxa de crescimento e sensibilidade ao estresse. Células crescendo rapidamente em meio rico em glicose (o estado desejado para a rápida produção de etanol) são mais sensíveis ao calor e outros estresses que as células que estão na fase estacionária (RUSSELL, 2003).

A temperatura é um dos mais importantes parâmetros físicos que influência o crescimento das leveduras. Danos térmicos para as células de levedura resultam da interrupção do hidrogênio e interações hidrofóbicas levando para a desnaturação geral de proteínas e ácidos nucléicos. A maioria das leveduras de laboratório e industrial geralmente cresce melhor entre 20-30°C. Exceções notadas para esta faixa são encontradas quando as leveduras são estudadas em habitat natural. Por exemplo, algumas espécies associadas com animais de sangue quente não crescem

bem abaixo de 24-30°C, enquanto algumas leveduras psicrotróficas crescem otimamente entre 12-15°C (WALKER, 1998). Como todos os microrganismos, leveduras exibem características de temperatura mínima, ótima e máxima de crescimento (WALKER, 1998).

Os processos de fermentação sempre exigem controle de temperatura, e propõe-se que, caso as linhagens de leveduras fermentem etanol a temperaturas mais elevadas com sucesso, diminuições de custo significativas podem ser obtidas. Fermentações tradicionais têm sido desenvolvidas em países de clima temperado, mas a produção de etanol combustível é dependente do crescimento eficiente da biomassa de plantas, tais como cana de açúcar, milho, mandioca e, a maioria das quais são cultivadas em áreas tropicais (BABIKER et al., 2010).

Na fermentação para produção de etanol, temperaturas ligeiramente altas são empregadas para a produção de células de leveduras. O aumento na temperatura de fermentação de S. *cerevisiae* por um meio de glicose-base de 30° para 39°C pode resultar em uma diminuição no crescimento da célula e um aumento na produtividade de etanol e eventual morte da célula em temperatura próxima de 39 ^{o}C. Em geral, a temperatura ótima para a produção de etanol por linhagens de *Saccharomyces* é entre 5-10°C mais elevada que a temperatura ótima para crescimento (WHITE, MUNNS, 1951 apud MATTHEWS; WEBB, 1991).

3.4. Efeitos da toxicidade do etanol sobre as células de levedura

Nos últimos anos, as indústrias de cerveja e de bioetanol tem focado mais na implementação de medidas de diminuição de custos para permanecer rentável durante a crise econômica. Uma dessas medidas é a adoção da emergente tecnologia VHG (very high gravity), que é conhecida como fermentação com alto teor alcoólico, melhorando o processo de produtividade e diminuindo a produção de efluentes (PULIGUNDLA et al., 2011). Além das vantagens acima, existem outras como: economia de água, maior rendimento de álcool e a diminuição do trabalho, bem como as necessidades de energia, menor custo de capital e também redução da contaminação bacteriana (THOMAS et al., 1995).

A fermentação VHG do etanol foi desenvolvida na década de 1990 em que meios contendo açúcares com quantidades superiores de 25% (p/v), foram utilizados com o objetivo de alcançar concentrações em volume de etanol superior a 15% (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996; BAYROCK; INGLEDEW, 2001).

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

Portanto, a perda de viabilidade das células durante a fermentação VHG representa grande desafio para a produção de etanol combustível eficiente e, portanto, a melhoria da tolerância da levedura ao etanol é necessária (ZHAO; BAI, 2009).

Embora muitos microrganismos foram explorados para a produção de etanol, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são as mais amplamente utilizadas em grande escala industrial de fermentação de bioetanol, ou seja, devido à sua capacidade de fermentar uma grande variedade de açúcares e desenvolver os mecanismos adequados para lidar com as condições de estresse nocivas encontradas em processos VHG (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Tais linhagens de levedura devem ser resistentes a múltiplas tensões encontradas no processo VHG, incluindo a pressão osmótica que resulta das elevadas concentrações de açúcar, o estresse pelo etanol no final da fermentação, as condições anaeróbicas estabelecidas nos biorreatores de grande escala e os procedimentos de reciclo de células para utilização da levedura para vários ciclos consecutivos de fermentação (MUSSATO et al., 2010).

Segundo Moulin, Boze e Galzy (1984), a ação inibitória do etanol em todas as espécies de leveduras com metabolismo fermentativo afeta as suas taxas de crescimento e de fermentação, sendo o primeiro mais sensível para o etanol do que o segundo. O etanol tem um efeito letal sobre as células. Ainda de acordo com os autores, os fatores que influenciam a sensibilidade do etanol (temperatura, aeração e composição do meio) agem direta ou indiretamente modificando as propriedades da membrana plasmática. A importância dos lipídeos da membrana

tem sido claramente demonstrada em numerosos trabalhos. No entanto, o etanol não parece ter um único efeito, mas age de várias maneiras: modificando as propriedades lipídicas da membrana, os sistemas de transporte de soluto e a ação de algumas enzimas.

No ambiente, os microrganismos podem ser confrontados com compostos lipofílicos que preferencialmente se acumulam nas membranas. Esses compostos podem ocorrer naturalmente como, por exemplo, alcanóis e terpenos, ou podem ser os xenobióticos tais como alcanos e hidrocarbonetos aromáticos. O acúmulo de tais compostos irão afetar as propriedades físico-químicas das membranas e, consequentemente, o seu funcionamento (WEBER; BONT, 1996).

Portanto, a membrana plasmática é o alvo principal de estresse pelo etanol e vários autores têm sugerido uma relação entre a composição de ácidos graxos das membranas de fosfolipídios e tolerância ao estresse de etanol, embora a correlação entre a tolerância ao etanol e maior grau de insaturação de ácidos graxos dos lipídeos da membrana de *S. cerevisiae* seja bem documentada, a relação causal ainda não foi estabelecida (ALEXANDRE; ROUSSEAUX; CHARPENTIER, 1994; YOU; ROSENFIELD; KNIPPLE, 2003).

Os fosfolipídios da membrana plasmática demonstraram desempenhar um papel importante no mecanismo de tolerância ao etanol. O aumento de ácidos graxos insaturados na membrana resulta em maior tolerância ao etanol. A suplementação de meios de crescimento com vários ácidos graxos insaturados, vitaminas e proteínas também resultam em melhoria da tolerância ao etanol. Por outro lado, o aumento na temperatura, pressão osmótica e etanol intracelular têm mostrado diminuir a tolerância da levedura ao etanol (D’AMORE; STEWART, 1987).

O efeito da temperatura também é importante, sendo que sob altas temperaturas, o efeito do etanol sobre as células é maior e de acordo com Piper (1995), muitas mudanças induzidas em levedura por níveis de estresse pelo etanol são idênticas às causados pelo estresse pelo calor, existindo efeitos sinérgicos entre os danos induzidos por estes fatores. Esta sinergia resulta em influências adversas do etanol sendo mais intensa em temperaturas mais elevadas. Também de acordo com Van Uden (1984), a capacidade de uma linhagem de levedura resistir ao efeito inibitório do etanol diminui à medida que aumenta a temperatura.

Em temperaturas elevadas é improvável que a membrana plasmática não possa ser livremente permeável ao etanol. As mudanças na composição ácido-graxo, as quais têm sido relatadas para proteger as células durante o crescimento ativo e da fermentação, também demonstraram proteger as células em repouso a partir de etanol extracelular. Se o principal objetivo das alterações lipídicas é facilitar a difusão de etanol para fora da célula durante a fermentação, então é difícil imaginar como esse aumento de permeabilidade também protegeria as células em repouso contra o etanol extracelular (INGRAM; BUTTKE, 1984).

A capacidade da célula de aumentar os níveis de ácidos graxos insaturados é o principal mecanismo de tolerância induzida por etanol em leveduras (ALEXANDRE; ROUSSEAUX; CHARPENTIER, 1993). Também de acordo com You, Rosenfield e Knipple (2003), entre os vários componentes da membrana, o ácido graxo insaturado e ergosterol foram considerados como os dois fatores determinantes da tolerância ao etanol.

Portanto, além de afetar a composição da membrana da levedura, a alta concentração de etanol no fim da fermentação causa outros efeitos sobre a fisiologia das leveduras, como a inibição do crescimento e inativação enzimática, o que leva a diminuição da viabilidade celular (BANAT et al., 1998).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) usa elétrons que se dispersam ou são emitidos a partir da superfície da amostra. O feixe de elétrons é localizado dentro de uma pequena sonda que passa rapidamente para frente e para trás sobre a amostra. O rastreamento completo de cima abaixo geralmente leva apenas alguns segundos. As diferenças na superfície da amostra afetam o padrão com o qual os elétrons são dispersos a partir deste. Buracos ou fissuras aparecem escuros, as protuberâncias e saliências aparecem claras, resultando em uma imagem tridimensional. Somente estruturas superficiais podem ser examinadas com o MEV. Consequentemente, este é utilizado para estudar células inteiras, tecidos e superfícies de diversas estruturas (CASTRO, 2002).

O MEV consiste basicamente dos componentes representados na Figura 7.

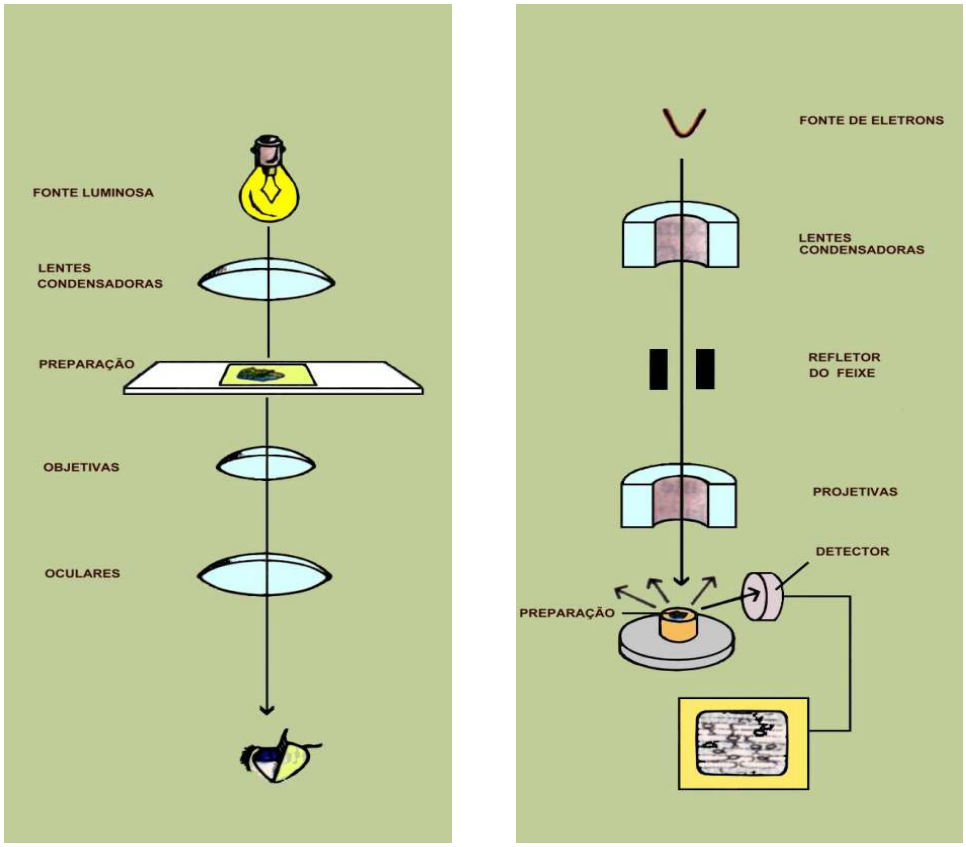

Figura 7 – Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura (CASTRO, 2002)

Os MEV apareceram no mercado, pela primeira vez, em 1965, e desde então se tem revelado indispensáveis em muitos tipos de pesquisa biológica, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos em fungos, estudo da morfologia de pólens e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais. O MEV tem uma série de aspectos extremamente valiosos. Ele pode ser operado em uma escala ampla de aumentos, desde 10X até 100.000X (GALLETI, 2003).

Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis

pela obtenção das imagens de alta resolução, enquanto que os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição (MALISKA, 2014).

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

De acordo com Tanaka e Kitajima (2009), em relação ao preparo da amostra, quando o espécime em estudo embora rígido não seja metálico (plástico, minerais, material biológico rígido) se examinado diretamente, gerará imagens com problemas. Os elétrons incidentes são absorvidos, não tendo como fluir, se acumulam e são emitidos espontaneamente, causando efeito conhecido como carga "charging". Para evitar este efeito, a superfície em estudo deve ser coberta com uma fina camada de metal. Isto pode ser obtido evaporando o metal (em geral ouro) em condições de vácuo no interior de um metalizador.

Ainda segundo Tanaka e Kitajima (2009), quando se pretende examinar espécimes biológicos que apresentem estruturas delicadas na superfície ou que se colapsem facilmente, há necessidade de se proceder a sua fixação para preservar a sua forma tridimensional. Como o interior da coluna do MEV fica sob alto vácuo, a amostra deve ser desidratada, o que usualmente é feito em soluções de concentração crescente de acetona. Se a amostra tem certa rigidez, pode-se eliminar a acetona por secagem ao ar, seguida da montagem e "sputtering". Mas se a amostra for muito frágil, a tensão superficial da acetona ao final da secagem pode destruir detalhes superficiais ou mesmo causar o colapso de partes do espécime criando inúmeros artefatos. Este problema é usualmente contornado utilizando-se a secagem ao ponto critico.

Portanto, o sucesso ou o fracasso na obtenção de informações estruturais ou químicas de espécimes orgânicas, polímeros, amostras biológicas, e espécimes hidratadas que são examinadas por instrumentos como o feixe de elétrons, depende essencialmente da maneira como as amostras são preparadas (GOLDSTEIN et al., 1992).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de execução da pesquisa

O projeto foi realizado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP, no CENA/USP e no NAP/MEPA do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

4.2 Microrganismos e cultivo microbiano

4.2.1 Cultura de levedura

Foi utilizada para o estudo a linhagem de levedura PE-2, liofilizada, tradicionalmente empregada para a produção de etanol industrial nas usinas brasileiras. Essa levedura foi gentilmente cedida pela empresa LNF- Latino Americana, localizada em Bento Gonçalves (RS).

4.2.2 Meio de Fermentação

Os mostos utilizados nos experimentos de fermentação foram preparados com caldo de cana-de-açúcar clarificado com fosfato de sódio monobásico. A clarificação do caldo consistiu das seguintes etapas: fervura do caldo por 15 minutos; esfriamento do caldo; filtragem do caldo; adição de 5g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4. H_2O) para cada 2 litros de caldo fervido; homogeneização do caldo; transferência do caldo para um balão de fundo chato; tamponamento do balão com algodão e papel absorvente; autoclavagem com vapor flluente por 15 minutos; autoclavagem a 120°C e 1 atm por mais 15 minutos; após retirada do balão da autoclave, o mesmo foi mantido em repouso por 48 horas; após este tempo, o sobrenadante foi sifonado e repetido o procedimento de esterilização em autoclave. Após a clarificação do caldo, os mostos foram concentrados a 24°Brix (em panelas no fogo), sendo posteriormente diluídos com água destilada até atingirem o brix

desejado para cada tratamento sendo depois esterilizados em autoclave (121°C/20min) para a execução de cada etapa do projeto. Foram colocados 200 mL de mosto e 8 g (4%) da levedura PE-2 liofilizada em erlenmeyer de 500 mL em um shaker a 30°C e 60 rpm. A fermentação foi conduzida em batelada simples (4 repetições), com recuperação das células (Melle Boinot) ao término de cada tratamento, sendo o final da fermentação determinado pela estabilização dos pesos dos erlenmeyers. Os mostos foram submetidos a diferentes tratamentos, conforme descrito no item 4.3.

4.3 Condução dos ensaios

Os efeitos dos crescentes teores de açúcar do mosto sobre a fermentação alcoólica foram investigados conforme os tratamentos descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Testes fermentativos em condições crescentes de açúcar, a uma temperatura de 30°C, com a linhagem PE-2.

Tratamentos	Descrição
1	PE-2, 30^{0}C, 9 ± 1 ^{0}Brix;
2	PE-2, 30^{0}C, 10 ± 1 ^{0}Brix;
3	PE-2, 30^{0}C, 11 ± 1 ^{0}Brix;
4	PE-2, 30^{0}C, 12 ± 1 ^{0}Brix;
5	PE-2, 30^{0}C, 13 ± 1 ^{0}Brix;
6	PE-2, 30^{0}C, 14 ± 1 ^{0}Brix;
7	PE-2, 30^{0}C, 15 ± 1 ^{0}Brix;
8	PE-2, 30^{0}C, 16 ± 1 ^{0}Brix;
9	PE-2, 30^{0}C, 17 ± 1 ^{0}Brix;
10	PE-2, 30^{0}C, 18 ± 1 ^{0}Brix;
11	PE-2, 30^{0}C, 19 ± 1 ^{0}Brix;
12	PE-2, 30^{0}C, 20 ± 1 ^{0}Brix;
13	PE-2, 30^{0}C, 21 ± 1 ^{0}Brix;
14	PE-2, 30^{0}C, 22 ± 1 ^{0}Brix;
15	PE-2, 30^{0}C, 23 ± 1 ^{0}Brix.

Após, foi realizada uma segunda fermentação com mostos variando de 9, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23 e 24°Brix, para avaliação dos efeitos dos crescentes teores de açúcar do mosto sobre a parede celular das leveduras, no microscópio eletrônico de varredura (MEV). Também foi realizado a avaliação no MEV da parede celular da levedura em um meio sem adaptação ao teor de açúcar de 24°Brix (controle positivo).

Também foi realizado o preparo do controle negativo que consistiu de células de leveduras desidratadas vivas reativadas em água, sob 37 °C, por 15 minutos.

4.4 Parâmetros avaliados

4.4.1 Análises microbiológicas

4.4.1.1 Análise da viabilidade celular das leveduras

A viabilidade celular da levedura PE-2 foi realizada através de microscopia óptica, em microscópio Olympus, BH, em aumento de 400x, considerando leitura de células viáveis e não viáveis presentes no quadrante C em câmara de Neubauer. A contagem no quadrante C foi realizada em 5 sub-quadrantes, os 4 dos cantos e o sub-quadrante central. A contagem das células viáveis e não viáveis foi realizada através da coloração diferencial das células vivas com azul de metileno 0,1%, de acordo com Pierce (1970).

4.4.1.2 Imagens das leveduras em Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram realizadas duas novas fermentações para o estudo da parede celular da levedura, ambas em mosto esterilizado. A primeira fermentação consistiu da adaptação da levedura PE-2 a altos teores alcoólicos, com teores de açúcares de 9°Brix, 12°Brix, 15°Brix, 18°Brix, 20°Brix, 21°Brix, 22°Brix, 23°Brix e 24°Brix. A segunda fermentação foi realizada colocando-se a levedura PE-2 diretamente no mosto com 24°Brix, ou seja, sem adaptação da levedura (controle positivo). Também foi realizado o preparo do controle negativo que consistiu de células de leveduras desidratadas vivas reativadas em água, sob 37 °C, por 15 minutos. Todos os estudos tiveram como finalidade a obtenção de amostras da levedura PE-2 para a observação da parede celular das mesmas, no Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo LEO 435 VP.

As amostras dos diferentes tratamentos (teor alcoólico) foram coletadas no final de cada ciclo fermentativo, que ocorria com a estabilização do peso dos erlenmeyers e depois do reciclo das leveduras realizado em centrífuga. Foi recolhida uma alíquota

da biomassa da levedura de cada tratamento e colocado em ependorf de 0,5 mL contendo o fixador Karnovisky modificado, composto de glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, $CaCl_2$ 0,001M. Em seguida essas amostras foram colocadas em refrigerador, podendo ser usadas até o prazo de 1 ano.

O preparo das amostras para a visualização no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) seguiu os seguintes procedimentos:

a) Uso de uma gota de poly-L-lisina na lamínula por 15 a 20 minutos, retirando-se o excesso;

b) Agitação da amostra e colocação de uma gota dessa suspensão sobre a lamínula por 30 minutos, depois retira-se o excesso;

c) Colocação das lamínulas com os separadores entre uma amostra e outra na gaiola que será levada posteriormente ao ponto crítico;

d) Desidratação das amostras dentro da gaiola em um bécker em concentrações crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% por 30 minutos cada concentração e na de 100%, 3 vezes de 30 minutos cada.

e) Secagem ao ponto crítico (CO_2);

f) Colocação das lamínulas nos stubs;

g) Metalização (sputtering) das amostras;

h) Visualização das imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura, com aumento de 5.000 vezes.

4.4.2 Análises químicas

4.4.2.1 Determinação de açúcares redutores totais por DNS

A determinação de açúcares redutores totais foi realizada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico), segundo Miller (1959) modificado. A inversão da sacarose foi feita por hidrólise ácida, utilizando-se 25 mL da amostra e 25 mL de ácido clorídrico 1,3M em balão de 100 mL. A solução foi aquecida a 65°C durante 30 minutos, após foi resfriada à temperatura ambiente e neutralizada com hidróxido de sódio 4M, sendo o volume final completado para 100 mL de água destilada. A diluição da amostra foi de 1:4. O procedimento continuou com a retirada de 0,5 mL da amostra do balão, com a adição de 0,5 mL de DNS em tubos de ensaios graduados a 12,5 e 25 mL. Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria em água fervente por 5 minutos e depois resfriados rapidamente em banho de gelo até a temperatura ambiente. Os tubos tiveram os volumes completados até 12,5 mL com água destilada e a leitura (em absorbância) foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV mini-1240 (Shimadzu), com comprimento de onda de 540nm, utilizando-se uma curva padrão de glicose, com concentração variando de 0 a 8 g L^{-1}. Foi realizada uma adaptação do método para a determinação dos açúcares redutores totais.

O cálculo dos teores de açúcares redutores totais (ART) foi obtido a partir da equação representada abaixo, onde R^2 = 0,998.

ART (g L^{-1}) = (média das leituras) + 0,0098 / 0,0728

4.4.2.2 Determinação de etanol nos vinhos delevurados

Os vinhos foram centrifugados a 2917,98 g durante 10 minutos, em seguida, 25 mL do vinho delevurado (sobrenadante) foi transferido para o interior de um microdestilador para álcool modelo TE-012 (Sarge aparelhos científicos LTDA) e

destilados por arraste em vapor, recolhendo-se 25 mL do destilado, em balão volumétrico. As amostras destiladas foram transferidas para um densímetro digital, marca ANTON PAAR, modelo DMA 48, onde foi realizada a análise do teor alcoólico (v v^{-1}), conforme Zago et al. (1996).

4.4.2.3 Determinação do teor de levedura no vinho

Em tubos de centrifuga, 200 mL de vinho bruto foram centrifugados a 2917,98 g durante 10 minutos (Centrífuga PR-6000, IEC). Em seguida, os sobrenadantes foram separados para as análises de teor alcoólico e ART e os tubos com as biomassas foram medidos. Os resultados foram expressos em biomassa presente no vinho em mL mL^{-1} (ZAGO et al., 1996).

4.4.2.4 Estimativa do volume de vinhaça produzida

A quantidade de vinhaça por litro de etanol foi calculada através da equação:

$$\text{Vinhaça} = \frac{(100 - \text{Teor Alcoólico})}{\text{Teor Alcoólico}}$$

O resultado foi expresso em Litros de vinhaça por Litros de etanol (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS - IPT, 1990).

4.4.2.5 Produtividade de etanol

A produtividade da fermentação foi calculada através da equação (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS - IPT, 1990).

$$\text{Produtividade (g álcool / L vinho / hora)} = \frac{\text{Teor alcoólico (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}}$$

4.4.2.6 Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica, considerando que 100 % de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g de álcool, o que equivale a 64,75 mL desse produto, a partir de 100 g de açúcares redutores totais. A concentração de etanol foi determinada conforme o item 4.4.2.2

4.4.2.7. Refratometria na escala Brix

As análises foram feitas de acordo com Spencer e Mead (1945), onde as amostras foram aplicadas diretamente no refratômetro Abbe de bancada Mod. Q767B (Diadema, Brasil), à temperatura de 20°C e foram realizadas as leituras.

4.3 Análise estatística

Os resultados obtidos neste projeto foram submetidos à análise da variância (Tabela 2) em um delineamento inteiramente ao acaso (EIA), considerando o ambiente experimental perfeitamente uniforme de acordo com os tratamentos descritos no item 6.3 (condução dos ensaios). Ocorrendo diferenças significativas verificadas pelos valores da estatística F, foi aplicado o método de Tukey

com α = 0,05. Os resultados (das 4 repetições) foram analisados pelo programa estatístico R (2008).

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA)

Causas de variação	G.L.
Tratamentos	14
Resíduo	45
Total	59

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Adaptação da levedura em meios com altos teores de açúcar

Realizando-se a adaptação das células de levedura, da linhagem PE-2, em mosto com concentrações crescentes de açúcar, foi verificado que o consumo de açúcares ocorreu durante todos os 15 ciclos de fermentação. Também foi possível verificar que o consumo de substrato, por consequência, o crescimento celular, ocorreu desde o substrato com aproximadamente 100 g ART L^{-1} (açúcares redutores totais) até com cerca de 240 g ART L^{-1}. Contudo, foi verificado o aumento do tempo necessário para se realizar a fermentação, o qual passou de 5 h para cerca de 11 h, em substratos com 100 e 240 g de ART L^{-1}, respectivamente (Tabela 3). Apesar do aumento do tempo de fermentação, esses resultados foram muito interessantes, uma vez que as fermentações industriais, utilizando mostos na faixa de 200 g ART L^{-1}, normalmente duram cerca de 8 a 10 h.

Esses resultados obtidos estão de acordo com Li et al. (2009), os quais em seus estudos de fermentação com alto teor alcoólico, em meio contendo 255 g L^{-1} de glicose gastaram de 8 a 14 h para terminar os nove ciclos consecutivos de fermentação. Porém os resultados encontrados não estão de acordo com os obtidos no trabalho de Pereira et al. (2010), no qual as leveduras PE-2, VR-1, inoculadas em meios com alta concentração de glicose inicial (330 $g.L^{-1}$) e com suplementação de nutrientes, terminaram a fermentação em 80 horas (sem reciclo), enquanto a CAT-1 foi mais lenta. Ainda, Pereira et al. (2012), utilizando substratos contendo de 324 a 343 g L^{-1} e com reciclo das células (15 ciclos), observaram que as fermentações demoraram de 29 a 65 h para terminarem.

Em relação aos valores de ARTi (Açúcares Redutores Totais iniciais), que estão apresentados na Tabela 3, foi observado que quase todos os tratamentos apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância, devido ao aumento da concentração de açúcar no mosto, exceto os Tratamentos 12 e 13 e os Tratamentos 4 e 8, os quais não diferiram estatisticamente entre si.

Ainda analisando a Tabela 3, nota-se que o valor de açúcar residual (ARTf) foi semelhante estatisticamente do Tratamento 1 até o Tratamento 11. Já a partir do tratamento 12 (20,8^{o}Brix) até o tratamento 15 (24,1^{o}Brix), houve um aumento significativo desse açúcar residual, mostrando os efeitos danosos da fermentação com alto teor alcoólico para a levedura PE-2. Estatisticamente, o tratamento 12 não diferiu dos Tratamentos 2 e 13, mas diferiu dos demais. Já o Tratamento 14 diferiu dos Tratamentos 13 e 15 e também diferiu dos demais. Por último, o Tratamento 15 não diferiu somente do ciclo 14, mas diferiu dos demais tratamentos. Isso significa que o açúcar residual pode permanecer no vinho e após a destilação vai para a vinhaça o que resulta em perdas na produtividade e também pode aumentar os problemas de incrustações na coluna de destilação.

Tabela 3 - Valores médios de ART i no mosto, ART f no vinho e o tempo necessário para o término de cada ciclo fermentativo

Tratamento	^{o}Brix Inicial	Tempo (h)	ART i (g L^{-1})	ART f (g L^{-1})
Tratamento 1	9,3	7	95 m	1,75 ± 0,42 e
Tratamento 2	10,3	5	101,5 k	2,68 ± 0,64 de
Tratamento 3	11,4	6	95,5 l	1,43 ± 0,25 e
Tratamento 4	12,6	6	134 j	1,48 ± 0,20 e
Tratamento 5	13,6	7	155,5 g	1,28 ± 0,17 e
Tratamento 6	14,4	7	154,4 h	1,47 ± 0,04 e
Tratamento7	15,4	7	145,5 i	1,68± 0,61 e
Tratamento 8	16,7	8	134 j	2,12 ± 0,61 e
Tratamento 9	17,6	9	177 f	1,52 ± 0,19 e
Tratamento 10	18,7	9	179,12 e	2,5 ± 0,87 e
Tratamento 11	19,9	9	201,1 d	2,38 ± 0,94 e
Tratamento 12	20,8	9	212,77 c	6,47 ± 0,94 cd
Tratamento 13	21,8	10	212,77 c	7,93 ± 2,95 bc
Tratamento 14	22,8	10	241,62 a	10,4± 4,58 ab
Tratamento 15	24,1	11	232,35 b	13,16 ± 1,72 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Por outro lado, esses resultados indicam que até o Tratamento 11 (19,9^{o}Brix), a fermentação ocorreu dentro da normalidade conforme se observa rotineiramente em uma fermentação alcoólica, ou seja, alta taxa de viabilidade celular da levedura, tempo de fermentação coerente com a quantidade de açúcar inicial e alta produtividade. Do Tratamento12 ao Tratamento 15, observa-se que ocorreu aumento do tempo da fermentação e aumento dos valores de ART final, apesar da levedura PE-2 ter se mantido com alta viabilidade e ter tolerado ao estresse alcoólico até o tratamento 15.

De acordo com Li et al. (2009), tensões severas durante a fermentação com elevado teor alcoólico, como a alta pressão osmótica do açúcar inicial e a forte inibição do etanol durante a fase de produção, podem causar a redução da viabilidade celular da levedura, aumentando o tempo de fermentação. No entanto, no presente trabalho, a viabilidade das células de leveduras manteve-se alta (em média, 93,5%), apesar do alto teor alcoólico formado, o aumento do tempo fermentativo deve-se à grande quantidade de açúcar disponível no mosto, ou seja, diminuiu a velocidade de fermentação apesar de ter sido observado o aumento da quantidade de biomassa de leveduras (Item 5.6).

Apesar do tempo de fermentação ter aumentado, está dentro do esperado para a quantidade de açúcar utilizada nos diferentes ciclos, o que leva a crer que as células de leveduras continuavam saudáveis e reproduzindo-se normalmente.

5.2 Produção de etanol

A melhoria do processo de fermentação como o uso de altos teores alcoólicos e linhagens de leveduras mais tolerantes e robustas, pode levar a teores de etanol mais elevados no vinho, o que seria benéfico para a economia do processo, devido à redução do consumo de energia para a operação de destilação, por consequência, diminuição na quantidade de resíduos gerados.

Segundo Amorim, Basso e Lopes (2008) teores alcoólicos mais elevados permitem economia de energia, ao mesmo tempo que promovem melhor controle da contaminação bacteriana.

Na Tabela 4, nota-se um aumento da formação de etanol (de 3,96 % v/v no Tratamento 1 para 12,8 % v/v no Tratamento 15) em função da adaptação das leveduras às crescentes concentrações de açúcar do mosto e que estatisticamente, ao nível de 5% de significância, houve diferença nos valores de teor alcoólico entre todos os tratamentos, exceto entre os Tratamentos 11 e 12.

Estes resultados indicam que com o aumento da concentração de açúcar, as leveduras foram se adaptando ao meio e a produção de etanol foi aumentando a cada ciclo e que, portanto, a levedura PE-2 mostrou-se tolerante ao estresse osmótico, ao estresse alcoólico e ao reciclo das células sofridos durante as fermentações.

Tabela 4 - Valores médios de etanol produzido durante os 15 ciclos fermentativos

Tratamentos	^{o}Brix Inicial	^{o}Brix Final	Etanol produzido % (v/v)
Tratamento 1	9,3	3,3	3,96 ± 0,1 n
Tratamento 2	10,3	3,1	4,37 ± 0,03 m
Tratamento 3	11,4	3,3	5,2 ± 0,05 l
Tratamento 4	12,6	3,8	5,9 ± 0,05 k
Tratamento 5	13,6	3,8	6,6 ± 0,05 j
Tratamento 6	14,4	4,08	7,2 ± 0,05 i
Tratamento7	15,4	4,83	7,9 ± 0,0 h
Tratamento 8	16,7	4,92	8,6 ± 0,05 g
Tratamento 9	17,6	5,07	9,1 ± 0,14 f
Tratamento 10	18,7	5,6	9,8 ± 0,1 e
Tratamento 11	19,9	6,2	10,6 ± 0,25 d
Tratamento 12	20,8	6,85	10,9 ± 0,22 d
Tratamento 13	21,8	7,1	11,4 ± 0,19 c
Tratamento 14	22,8	7,95	12,1 ± 0,22 b
Tratamento 15	24,1	8,6	12,8 ± 0,09 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Pereira et al. (2012), demonstraram que o aumento de glicose inicial de 324 para 343 g L^{-1} com a utilização da levedura industrial PE-2, durante 15 ciclos fermentativos consecutivos, promoveu uma concentração final de etanol no

vinho de 17,1 ± 0,2% (v v^{-1}) e uma produtividade de 3,51 ± 0,04 g L^{-1} h^{-1}. Os resultados do presente trabalho diferem um pouco desse apresentado por Pereira e colaboradores, uma vez que a concentração final de etanol foi de 12,8 ± 0,09% (v v^{-1}) e de produtividade foi de 9,2 ± 0,06 g L^{-1} h^{-1}. Infere-se que essas diferenças sejam pelo fato de que neste trabalho as concentrações iniciais de açúcares foram menores (100 a 240 g L^{-1} ART).

Segundo Pereira et al. (2010), as leveduras PE-2, VR-1 e a CAT-1, em uma alta concentração de glicose inicial (330 g L^{-1}), consumiram quase toda a glicose, mas a PE-2 teve uma produção de etanol superior a 19% (v v^{-1}) às demais linhagens de levedura e também apresentou melhor rendimento fermentativo (90% do valor teórico) entre elas.

Cerqueira (2013), também obteve altos valores de etanol em seu estudo de fermentação com alto teor alcoólico (em mostos com 25, 30 e 35 ^{o}Brix) com as leveduras PE-2 e CAT-1. Utilizando a PE-2 para a fermentação em mostos com 25 ^{o}Brix, os valores de etanol obtidos variaram de 9,88% (v v^{-1}) no 1° ciclo e 14,43% (v v^{-1}) no 6° ciclo. Já com o uso da levedura CAT-1, para o mesmo valor de Brix, obteve valores de etanol ainda maiores, que variaram de 10,69% (v v^{-1}) no 1° ciclo a 15,15% (v v^{-1}) no 6° ciclo.

De acordo com Pretorius (2000), as espécies de leveduras são conhecidas por diferirem em sua capacidade de produzir e tolerar etanol, e embora este fenômeno tenha sido estudado ao longo das últimas décadas, a razão pela qual algumas linhagens são mais tolerantes ao etanol do que outra ainda não está clara. A *S. cerevisiae* é reconhecida como a levedura mais predominante nas bebidas alcoólicas, e especialmente em vinhos, onde, nos últimos estágios da fermentação, níveis elevados de etanol são atingidos.

5.3 Rendimento da fermentação

O alto rendimento de etanol em curto período de tempo em uma fermentação é o desejável, pois é um fator economicamente importante na produção industrial do etanol. No entanto, foi verificado que o rendimento fermentativo variou de 64 a 84,5%, apresentando valores menores dos que os normalmente encontrados nas

usinas e destilarias, os quais oscilam entre 85 a 90%. Somente no Tratamento 8, onde o rendimento encontrado foi de 92,12% (Figura 8).

No início da fermentação (Tratamento 1), o baixo rendimento pode ser atribuído ao fato de se ter trabalhado com grande quantidade de células de leveduras em substrato com baixa concentração de açúcares. Isso pode ter levado a um consumo de açúcar muito maior do que o esperado para realizar o crescimento e a manutenção da população de leveduras. Após o primeiro ciclo de fermentação, as células foram se adaptando às concentrações crescentes de açúcar no mosto, apresentando assim, aumento no rendimento da fermentação. A diminuição da eficiência fermentativa pode ocorrer devido a formação de produtos secundários, como por exemplo, glicerol e ácidos orgânicos.

Além disso, as leveduras, quando fermentam em ambientes estressantes, apresentam diminuição da viabilidade celular, aumento na formação de glicerol, redução na formação de biomassa e diminuição nos conteúdos de glicogênio e trealose, sendo tais parâmetros de extrema utilidade para a identificação de linhagens tolerantes a um único ou a um conjunto de fatores estressantes (ALVES, 1994).

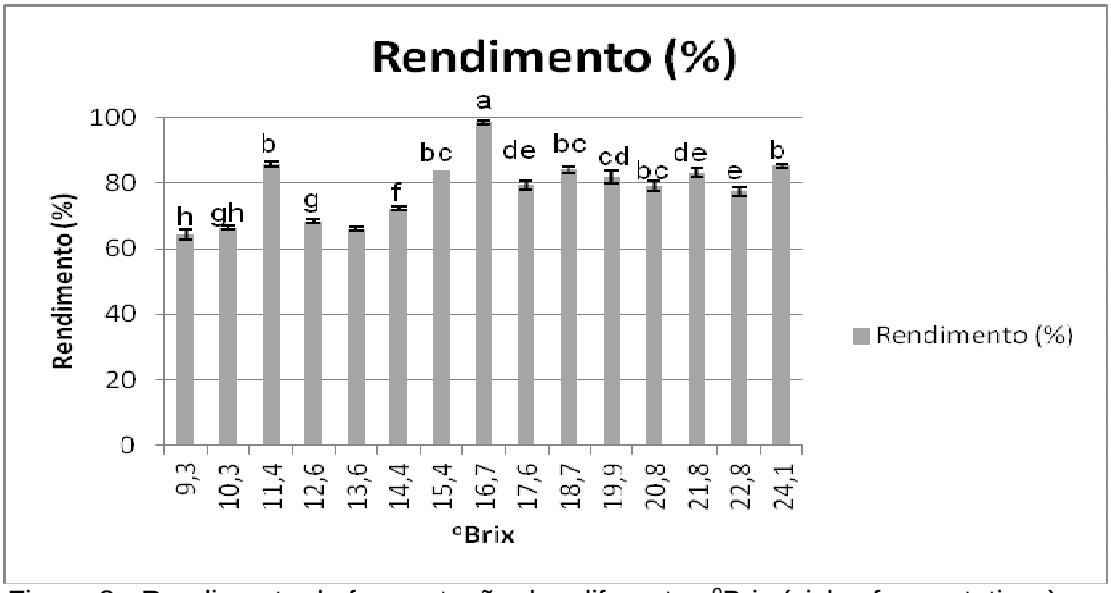

Figura 8 - Rendimento da fermentação dos diferentes °Brix (ciclos fermentativos)

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Felipe (2010) que diz que o etanol pode ser prejudicial para o processo fermentativo, pois causa

alteração da composição da camada lipídica da membrana celular, reduz as atividades metabólicas, em função da inibição do transporte de glicose, com consequente estresse hídrico, limita o rendimento e a produtividade do processo fermentativo e ainda diminui a tolerância da célula sob temperaturas mais elevadas.

Tony D'Amore et al. (1988), observaram que com o aumento de concentração de glicose (100, 200, 300 e 400 g L^{-1}) houve uma diminuição na taxa de crescimento e de fermentação, bem como a percentagem do rendimento teórico de etanol (93,5; 66,4; 59,0; e 23,6%, respectivamente).

Li et al. (2009) obtiveram alto rendimento fermentativo (90,8%), em estudos de fermentação com alto teor alcoólico (VHG) usando o processo de batelada.

Cerqueira (2013), em seus estudos com mostos na concentração de 25 ^{o}Brix fermentado pela levedura PE-2, obteve rendimento de até 90,9% e quando o mosto foi fermentado pela levedura CAT-1, o rendimento foi ainda maior, chegando a 95,2%.

Segundo Laluce et al. (2009), um fator econômico importante associado com a produção industrial de etanol é a obtenção de altos rendimentos de etanol ao longo de uma sucessão de ciclos de fermentações rápidas, no qual as células a partir de um ciclo são utilizados como inóculo do próximo ciclo de fermentação.

5.4 Produtividade

A produtividade da fermentação variou de 4,4 g de etanol L^{-1} h^{-1} no Tratamento 1 até 9,2 g de etanol L^{-1} h^{-1} no Tratamento 15. Em média, a produtividade foi de 8,1 g de etanol L^{-1} h^{-1} de mosto (Figura 9). Também pode ser verificado que a produtividade teve aumento mesmo na presença do crescente teor de açúcar no mosto, ou seja, o açúcar foi consumido mais rapidamente. Uma possível explicação para tal pode ser o fato da levedura já estar adaptada ao substrato.

Estes resultados foram semelhantes àqueles observados por Li et al. (2009). Estes autores, utilizando mostos com 255 g L^{-1} de açúcar inicial, durante 9 ciclos fermentativos, observaram produtividade média de 8,21 g de etanol L^{-1} mosto h^{-1}.

Porém, Pereira et. al. (2010), utilizando as linhagens industriais de leveduras (PE-2 e CA1185) observaram produtividade de até 2,5 g de etanol L^{-1} mosto h^{-1}. Talvez uma explicação para tais diferenças foi que nos experimentos conduzidos por esses autores, os melhores resultados encontrados com tolerância a altos teores de açúcar no meio foram observados em concentrações de 330-350 g de glicose L^{-1}, quando conseguiram realizar fermentações com mais de 19% (v v^{-1}) de etanol no vinho. Portanto, as fermentações foram lentas, pois além do estresse osmótico foram acometidas pelo efeito inibidor das altas concentrações de etanol.

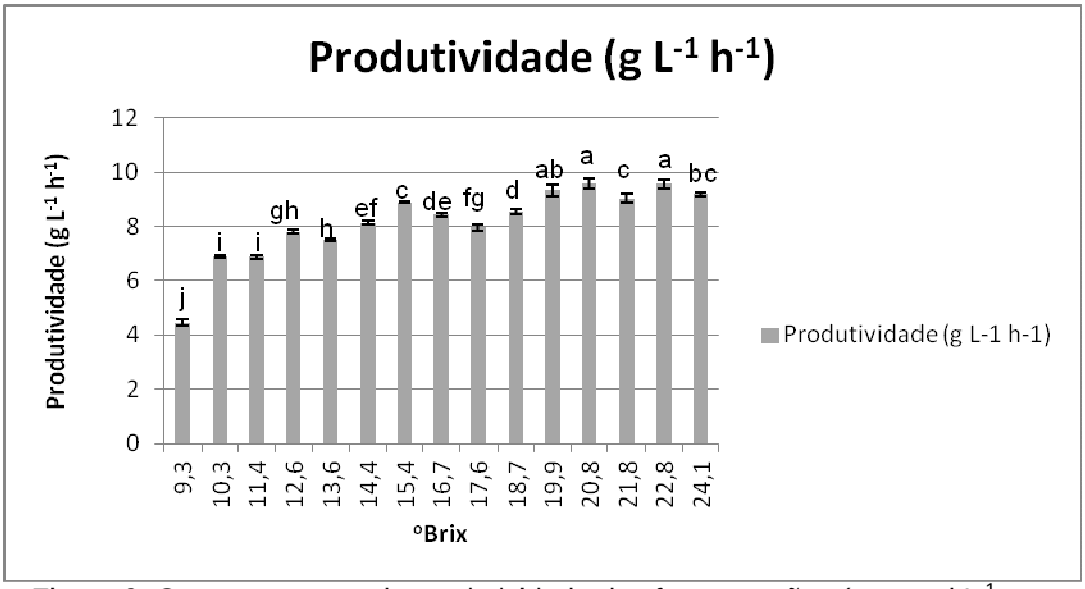

Figura 9. Comportamento da produtividade das fermentações (g etanol L^{-1} mosto h^{-1}) durante os 15 ciclos fermentativos

Em relação ao que se conhece até o momento, existe uma linhagem de levedura, a qual foi isolada de um processo de fermentação alcoólica brasileira, que tem a capacidade de permanecer, embora nem sempre como a linhagem dominante, em grande parte das destilarias em que é usada como inóculo. A sua capacidade de dominância do processo parece estar ligada ao alto rendimento em célula (Yx/s) e à alta velocidade de consumo de substrato apresentado por esta linhagem. Essa linhagem é conhecida como PE-2 (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

A linhagem PE-2 também foi estudada em fermentações VHG com reciclo de células, atingindo concentração de 17,1% (v v^{-1}) de etanol e produtividade de 3,51 g L^{-1} h^{-1} de etanol durante 15 ciclos (PEREIRA et al., 2012).

Neste trabalho, a levedura PE-2 fermentou 232,35 g L^{-1} de açúcar no mosto no Tratamento 15, produzindo 12,8% (v v^{-1}) de etanol, com uma produtividade de 9,2 g L^{-1} h^{-1}.

Os resultados obtidos não estão de acordo com os encontrados por Cerqueira (2013), no qual a fermentação do mosto com 25 ^{o}Brix pela levedura PE-2, resultou em uma produtividade máxima de 4,81 g L^{-1} h^{-1} e do mosto com a mesma concentração de Brix pela levedura CAT-1, em uma produtividade de 4,98 g L^{-1} h^{-1}.

5.5 Produção de vinhaça

Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu redução da produção de vinhaça em função do aumento da concentração de açúcar do mosto. Foi possível diminuir a quantidade de vinhaça de 24,25 L de vinhaça L^{-1} etanol produzido, em vinho proveniente de fermentação com 9,3 °Brix, para 6,8L de vinhaça L^{-1} etanol em vinho proveniente de fermentação com 24,1 °Brix. Isto representa diminuição de 72,05% do volume de vinhaça simplesmente com a adaptação das células de leveduras para fermentar mostos com teores mais elevados de açúcares.

A produção média de vinhaça nas usinas brasileiras é em torno de 10 a 12 litros de vinhaça para cada litro de etanol. Essa diminuição no volume de vinhaça é muito importante, pois pode contribuir para reduzir a preocupação ambiental nas usinas, que devem atender a legislação ambiental (CETESB, 2005). A vinhaça é o principal resíduo da produção de etanol, além de ter potencial de ser altamente poluidora, gera custos com o armazenamento, transporte e aplicação.

Pode-se considerar também que, de maneira geral, a cada safra o tamanho de área de fertirrigação das usinas aumenta, mostrando a preocupação das usinas com o uso racional da vinhaça, buscando maior rendimento agrícola e diminuição no uso de fertilizantes químicos, bem como uma adequação de dose de vinhaça que não cause prejuízo ao meio ambiente (JUNQUEIRA et al., 2009).

Dentro de uma perspectiva social, o aproveitamento e o uso da vinhaça na atividade produtiva, representam uma melhoria e um saldo favorável, na medida em que se evitam os custos externos da poluição resultante do seu depósito sobre a natureza, difíceis de estimar com rigor, mas seguramente acentuados nos espaços

em que se encontram as usinas e destilarias. Ao mesmo tempo em que se evita este custo externo, gera-se um produto bastante energético, proteico e químico, permitindo entre outras coisas, a redução de importação de insumos agrícolas (LAIME et al., 2011).

A diminuição do volume de vinhaça com o aumento do teor alcoólico do vinho pode ser observada na Figura 10.

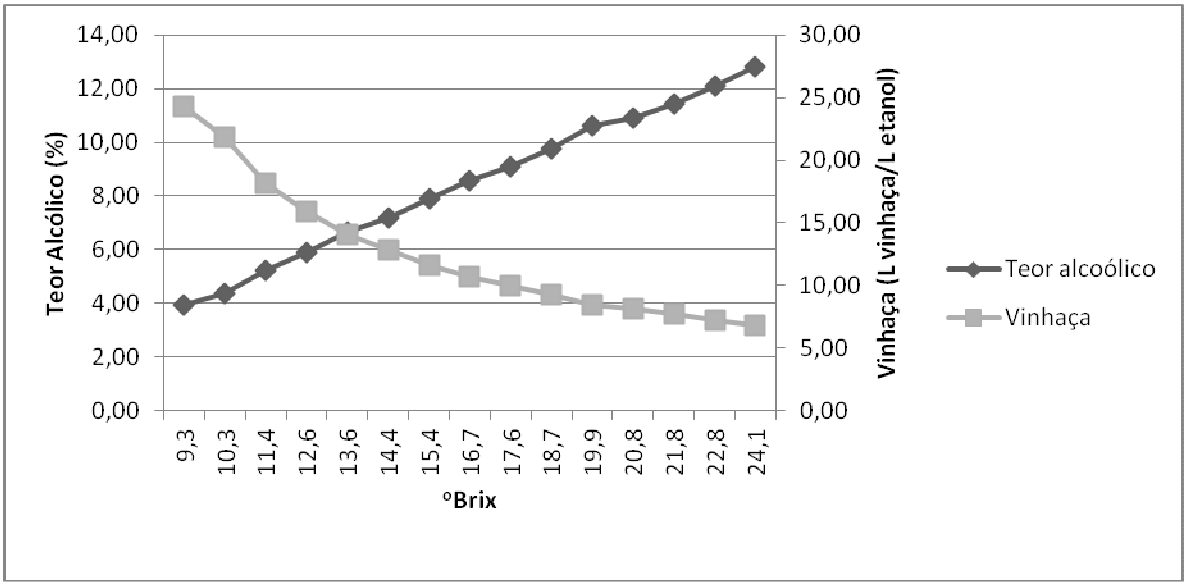

Figura 10 - Produção de vinhaça relacionada com o teor alcoólico do vinho

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles apresentados por Amorim e Basso (2009), pois a redução da produção da vinhaça também foi obtida, havendo relatos de que foi possível aumentar o teor alcoólico da fermentação para até 16% (v v^{-1}), alimentando caldo de cana mais concentrado (com mais açúcar) nas dornas, sem matar as leveduras. O resultado final da fermentação é mais álcool e menos vinhaça no tanque. O volume do resíduo cai pela metade, 6 litros de vinhaça por litro de álcool, com o dobro da concentração de potássio. Isso pode tornar economicamente viável, transportar e espalhar a vinhaça por uma área maior, com menos impacto sobre o meio ambiente.

Quando depositada no solo, a vinhaça pode promover melhoria em sua fertilidade; todavia, quando usada para esse fim, as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, isto é, as dosagens devem ser mensuradas de acordo com as características de cada solo, uma vez que este

possui quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos, podendo ocorrer a lixiviação de vários desses íons, sobretudo do nitrato e do potássio (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Também de acordo com Mutton, Rosseto e Mutton (2010), de modo geral, o uso da vinhaça promove melhorias na produtividade agrícola da cana, benefícios químicos, biológicos e físicos ao solo, além de gerar economia com a aquisição de fertilizantes. Entretanto, se aplicada em excesso, pode causar alterações na qualidade da matéria-prima para a indústria, como a diminuição da qualidade tecnológica do caldo.

A utilização contínua da vinhaça nos mesmos solos, mesmo que em dosagens baixas, ano após ano, pode gerar a saturação de cátions, principalmente de potássio na CTC dos solos, ocasionando problemas de lixiviação de seus constituintes para águas subterrâneas. A lixiviação de K para a subsuperfície não é um problema ambiental, uma vez que o K não é poluente de águas. O problema é que a alta concentração de K favorece a formação de complexos químicos, que com carga neutra, são facilmente lixiviados. O complexo formado entre o $(K)^+$ e o $(NO3)^-$ é especialmente preocupante do ponto de vista ambiental porque o nitrato sim é grande poluente de águas (UNESP, 2007).

5.6 Formação de biomassa e viabilidade das células

Uma fermentação realizada com alto teor de açúcar no mosto e com reciclo das células, não é viável com grandes perdas da biomassa ou da viabilidade durante os ciclos fermentativos.

Em relação à produção de biomassa, foi verificado um aumento do volume de biomassa (9,37% no Tratamento 1 para 12,3% no Tratamento 15), à medida que foram aumentados os teores de sólidos solúveis no mosto. Isso indica que a levedura utilizada foi adequadamente adaptada aos teores crescentes de açúcar no mosto, bem como ao aumento da produção de álcool no vinho nos diferentes ciclos fermentativos. Ao analisar estatisticamente os resultados, $p \leq 0.05$, (Tabela 5), foi observado que a formação de biomassa apresentou aumento significativo do Tratamento1 ao Tratamento 9.

De acordo com Laluce et al. (2009), em escala industrial, os reciclos no processo fermentativo podem ser realizados ao longo de meses quando ocorre a proliferação celular. Isto indica que a população de células de levedura precisa se manter saudável durante todo o processo do período de produção por diversos ciclos de fermentação.

Os resultados obtidos não estão de acordo com Laluce e colaboradores (2009), os quais observaram que os teores de biomassa mantiveram-se baixos e sem variação no final da fermentação com duração de 7 horas, partindo de um mosto com 200 g L^{-1} de sacarose, 30 ^{o}C e 40 g L^{-1} de inóculo e nem com o trabalho de Troyer (1953), no qual foi verificado que os principais efeitos do etanol sobre o crescimento da levedura foram a redução do número total de células formadas e a diminuição exponencial na taxa de multiplicação.

Li et al. (2009), também não obtiveram uma grande quantidade de biomassa ao longo dos 9 ciclos fermentativos, variando de 24 a 35 g L^{-1}.

Ao longo de uma fermentação realizada em 15 ciclos, reutilizando as células de levedura para iniciar o próximo ciclo, não se deve ter uma diminuição da viabilidade ou da biomassa durante os ciclos. Portanto, uma comparação importante que deve ser feita quando se fala em biomassa, é em relação à viabilidade das células. Segundo Laluce et al. (2009), apesar da quantidade de células ter se mantido baixa durante a fermentação, a viabilidade manteve-se alta (95 ± 2,2%), indicando que a células estavam vivas.

Tabela 5 - Valores médios de biomassa e da viabilidade celular, durante os 15 ciclos fermentativos

Tratamentos	^{o}Brix Inicial	Biomassa (%)	Viabilidade (%)
Tratamento 1	9,3	9,37 ± 0,47 f	92,5 ± 1,86 a
Tratamento 2	10,3	9,75 ± 0,28 ef	84,7 ± 8,78 b
Tratamento 3	11,4	9,62 ± 0,25 f	93,5 ± 3,38 a
Tratamento 4	12,6	10 ± 0,4 def	93,5 ± 1,21 a
Tratamento 5	13,6	10,3 ± 0,47 cdef	93,06 ± 2,07 a
Tratamento 6	14,4	10,6 ± 0,47 bcdef	95,5 ± 2,24 a
Tratamento7	15,4	10,8 ± 0,25 bcdef	95,3 ± 2,5 a
Tratamento 8	16,7	11 ± 0,4 bcdef	93,7 ± 1,53 a
Tratamento 9	17,6	11,6 ± 0,47 abcde	94,6 ± 3,35 a
Tratamento 10	18,7	11,1 ± 0,47 bcdef	95,2 ± 0,68 a
Tratamento 11	19,9	11,8 ± 0,47 abdc	94,3 ± 0,76 a
Tratamento 12	20,8	12,5 ± 0,4 ab	96,9 ± 1,52 a
Tratamento 13	21,8	12,1 ± 0,25 abc	94,5 ± 2,23 a
Tratamento 14	22,8	13,2 ± 2,62 a	92,7 ± 0,8 a
Tratamento 15	24,1	12,3 ± 0,47 ab	92,7 ± 1,58 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Analisando-se a Tabela 5, observa-se que a viabilidade celular somente do Tratamento 2 diferiu dos demais tratamentos ($p \leq 0.05$).

Segundo Basso, Basso e Rocha (2011), de 90 a 95% das células de levedura são recicladas, resultando em alta densidade celular no interior do fermentador [10 a 14% (base peso úmido / v)]. A reutilização celular reduz a necessidade de propagação intensa de levedura, e menor quantidade de açúcar é desviada para a formação de biomassa. Estima-se que o aumento da biomassa de levedura 5 a 10% (em relação à biomassa inicial) durante um ciclo de fermentação, é suficiente para substituir as células de levedura perdidas durante a etapa de centrifugação. A elevada concentração de biomassa de levedura no interior do fermentador é responsável por um curto tempo de fermentação de 6 a 10 h em destilarias produtoras de etanol a partir de cana-de-açúcar, quando comparado com 40 a 50 h no processo de fermentação de açúcar proveniente de milho.

A Tabela 5 demonstra que a viabilidade das células da levedura PE-2 foi mantida alta (média de 93,5%) e que houve um aumento do volume de biomassa ao longo dos ciclos. Portanto, isso significa que havia um grande número de células vivas da levedura, ou seja, estava ocorrendo a multiplicação das células que seriam usadas no reciclo para a próxima fermentação. O volume da biomassa oscilou de 9,37 a 13,2% (m v^{-1}), sendo esse valor semelhante àquele conseguido pelas usinas.

Pereira et al. (2012), obtiveram resultados diferentes dos encontrados neste trabalho, sendo que nas fermentações inoculadas com 0,167 g mL^{-1} de fermento fresco da levedura PE-2, a viabilidade diminuiu de 80% (início da primeira fermentação) para 20% (final da terceira fermentação). Possivelmente, esta redução drástica nos valores de viabilidade foi um resultado da ausência de crescimento das leveduras durante as fermentações em batelada sequenciais e da alta concentração de etanol (15-16% v / v) atingida nos processos VHG.

Laluce et al. (2009), em condições otimizadas de fermentação (200 g / l inicial sacarose, 40 g / l de massa seca de células, 30 ° C) obtiveram respostas ótimas de 80,8 ± 2,0 g / l de etanol máximo mais uma conservação de viabilidade de 99 % para um período de 4 h de fermentação.

Krishnan et al. (1995) observaram que para fermentações com glicose inicial <150 g / L, a viabilidade da levedura (produto de fusão de *S. diastaticus e S. uvarum*) manteve-se acima de 95% ao longo da fermentação. Para uma maior concentração de glicose sem suplementação de nutrientes, as viabilidades caíram em cerca de 30% no final da fermentação. No entanto, com suplementação de nutrientes, as viabilidades permaneceram acima de 95%.

Kasavi et al. (2012), em estudos com 5 linhagens de leveduras (BC187, Y9, K11, L-1374 e L-1528), observaram que todas as cepas apresentaram 77% ou mais de produção de biomassa celular em meios contendo entre 0 e 47,28 g L^{-1} de etanol. Porém, a capacidade de crescimento das cepas apresentou uma nítida diminuição com a crescente concentração de etanol e estas mostraram apenas (1-2)% de crescimento em meio contendo 118,2 g L^{-1} de etanol.

Os resultados obtidos por Tony D'Amore et al. (1988), indicam que, sob elevada pressão osmótica (30% de açúcar), a proporção de etanol intracelular em relação ao etanol extracelular foi maior do que sob menor pressão osmótica (20% de açúcar). Esses fatores podem contribuir para a diminuição do crescimento de leveduras e da atividade de fermentação. Por outro lado, a suplementação de

nutrientes do meio resulta em um aumento da biomassa no final da fermentação, suportando o aumento da produção de etanol observado. Estes resultados sugerem que a limitação de nutrientes, é responsável pela diminuição da atividade de fermentação em condições de meio com alta concentração de glicose e não necessariamente ao acúmulo intracelular de etanol ou acúmulo de sub-produto, é responsável pela diminuição da capacidade de crescimento e fermentação da levedura com pressões osmóticas mais elevadas.

Os resultados mostram que a viabilidade das leveduras manteve-se alta (média de 93,52%) apesar das altas concentrações de açúcar usadas na fermentação e do reciclos efetuados ao longo dos ciclos. Ou seja, as leveduras não sofreram inibição (estresse osmótico) devido à adaptação das mesmas ao crescente teor de açúcar (9 a 24 °Brix) do mosto, e também não foram afetadas pelo aumento do teor alcoólico no vinho produzido durante a fermentação que chegou a 12,8% (v v^{-1}). Estes resultados mostram que a levedura PE-2, escolhida para a realização do trabalho manteve-se apta para altos teores alcoólicos.

5.7 Comportamento da viabilidade celular em função do teor alcoólico do meio

A conservação da viabilidade celular alta, durante os ciclos fermentativos das células de levedura, é um pré-requisito para efetuar uma sucessão de longa duração dos ciclos de fermentação (LALUCE et al., 2009). No presente estudo, a Tabela 6 demonstra que não foi observado efeito tóxico do etanol sobre as células de leveduras durante a fermentação, pois se observa o aumento do teor alcoólico e a não diminuição da viabilidade das células das leveduras (93,5%). Isso foi observado devido à adaptação gradual das células de leveduras aos crescentes teores de açúcar do mosto. Pode-se dizer que a levedura foi capaz de produzir álcool sem restrição nos parâmetros avaliados, pois não foi observado efeito inibitório do álcool à capacidade fermentativa, ou seja, a levedura foi adaptada corretamente para o alto teor alcoólico.

Tabela 6 - Comportamento da viabilidade de células de leveduras em função do teor alcoólico do vinho

Tratamentos	°Brix Inicial	Etanol produzido % ($v\ v^{-1}$)	Viabilidade (%)
Tratamento 1	9,3	3,96 ± 0,1 n	92,5 ± 1,86 a
Tratamento 2	10,3	4,37 ± 0,03 m	84,7 ± 8,78 b
Tratamento 3	11,4	5,2 ± 0,05 l	93,5 ± 3,38 a
Tratamento 4	12,6	5,9 ± 0,05 k	93,5 ± 1,21 a
Tratamento 5	13,6	6,6 ± 0,05 j	93,06 ± 2,07 a
Tratamento 6	14,4	7,2 ± 0,05 i	95,5 ± 2,24 a
Tratamento7	15,4	7,9 ± 0,0 h	95,3 ± 2,5 a
Tratamento 8	16,7	8,6 ± 0,05 g	93,7 ± 1,53 a
Tratamento 9	17,6	9,1 ± 0,14 f	94,6 ± 3,35 a
Tratamento 10	18,7	9,8 ± 0,1 e	95,2 ± 0,68 a
Tratamento 11	19,9	10,6 ± 0,25 d	94,3 ± 0,76 a
Tratamento 12	20,8	10,9 ± 0,22 d	96,9 ± 1,52 a
Tratamento 13	21,8	11,4 ± 0,19 c	94,5 ± 2,23 a
Tratamento 14	22,8	12,1 ± 0,22 b	92,7 ± 0,8 a
Tratamento 15	24,1	12,8 ± 0,09 a	92,7 ± 1,58 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com Canetta, Adya e Walker (2006), a viabilidade das células das leveduras *S. cerevisiae* e *Sc. pombe* expostas a 10 % $v\ v^{-1}$ de etanol permaneceu alta durante os 30 minutos e 1 hora de exposição (maior que 90%). Já a 20% $v\ v^{-1}$ de etanol, durante 30 minutos de exposição, a viabilidade das células permaneceu elevada (95 e 96%), diminuindo após 1 hora para 80 e 87% para *S. cerevisiae* e *Sc. pombe,* respectivamente. Expondo ambas as estirpes a 30% $v\ v^{-1}$ de etanol durante 10 minutos resultou em uma diminuição drástica nas suas viabilidades: de 9% para *S. cerevisiae* e de 12% para *Sc. pombe*, e depois de 1 h, a viabilidade de ambas foi reduzida para 0%, confirmando que os elevados níveis de toxicidade de etanol induzem a morte celular.

Conforme Marques e Serra (2004) em mosto com 180g ART L^{-1} usando a levedura IZ 1904 e 8 ciclos fermentativos, o teor alcoólico final obtido de 6,8% $v\ v^{-1}$ não foi o suficiente para causar inibição significativa da levedura. Já Bueno Neto (1982) Marques e Serra (2004) relataram que somente acima do teor alcoólico de

7,2% v v^{-1} ocorre a inibição para o crescimento celular. Já os resultados deste trabalho demonstraram que mesmo com as altas concentrações de ART (até 240 g L^{-1}) e dos altos teores alcoólicos obtidos (12,8% v v^{-1}), a viabilidade das células de levedura PE-2 não foi afetada. Uma possível explicação para essa diferença de comportamento pode ser o fato de que no presente trabalho a levedura foi adaptada à concentrações crescentes de açúcares no meio, ao passo que no trabalho de Bueno Neto (1982) isso não foi realizado.

Segundo Batistote et al. (2010), a taxa de crescimento da linhagem Pedra- 2 foi de 6mg mL^{-1} no período de 8 a 10 horas de fermentação, mostrou uma alta taxa de viabilidade celular, em torno de 82%, bom consumo de açúcar, e uma produção de 14% (v v^{-1}) de etanol, apresentando bom rendimento fermentativo nas condições estudadas (15°Brix e 12 horas de fermentação).

Em estudo de tratamento alcoólico da levedura, (BENJAPHOKEE et al., 2012) observaram que a viabilidade das leveduras TJ14, TISTR5606 e 3ADip na presença de 10% e 15% de etanol foi idêntica e não diminuiu, mesmo após 60 minutos de tratamento.

Dinh et al. (2008), submeteram as células de levedura, linhagem FY834, sob um aumento gradual na concentração de etanol do meio (2,5 a 10% v v^{-1}), e a taxa de crescimento específico da linhagem adaptada ao etanol não se alterou por meio do cultivo repetidos sob alta concentração de etanol, sugerindo que é possível obter com sucesso uma linhagem, cuja taxa de crescimento específico não seja alterada através do cultivo repetido nas concentrações de etanol avaliadas.

Os resultados de Pereira et al. (2012) sugerem que o aumento da biossíntese de trealose intracelular e glicerol foram uma resposta direta aos altos níveis de etanol e estresse osmótico desenvolvido durante o reciclo de leveduras para um meio com alto teor de açúcar, respectivamente. Além disso, o elevado acúmulo desses metabólitos chaves intracelulares, pelas células de levedura PE-2, durante fermentações VHG (alto teor alcoólico) consecutivas, indica que essa linhagem tem capacidade de se adaptar para sobreviver sob esse ambiente estressante (altos teores de etanol e açúcar) e atingir alto desempenho fermentativo, durante diferentes ciclos de fermentação.

A ação da trealose consiste em estabilizar a membrana e proteger as células das leveduras frente aos efeitos do etanol. Portanto, a concentração intracelular desse dissacarídeo tem desempenhado um importante papel sobre a capacidade da célula em tolerar elevadas concentrações de etanol (MAJARA; O'CONNOR-COX; AXCELL, 1996).

5.8 Morfologia das células de leveduras adaptadas ao mosto com altos teores de açúcares

Analisando as imagens de leveduras obtidas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV), em aumento de 5.000 vezes, pode-se verificar que as células recém-ativadas (Controle negativo) (Figura 11A) demonstraram diferenças morfológicas significativas da parede celular quando comparadas com as células de leveduras inoculadas e incubadas em substrato com 24 ºBrix (Controle positivo) sem serem submetidas à adaptação prévia (Figura 11B). As principais diferenças observadas foram o formato alongado da célula e o aspecto mumificado (enrugado) das células não adaptadas, indicando que essas células sofreram danos (estresse osmótico) quando colocadas diretamente em mosto com alto teor de açúcar (24°Brix). Isso pode ser devido ao fato de que quando se coloca a célula em um meio hipertônico, ocorre perda de água pela célula, que se murcha (plasmólise). Por consequência, a concentração de álcool no meio, proporcionou alterações morfológicas visíveis das células das leveduras (nas condições do estudo).

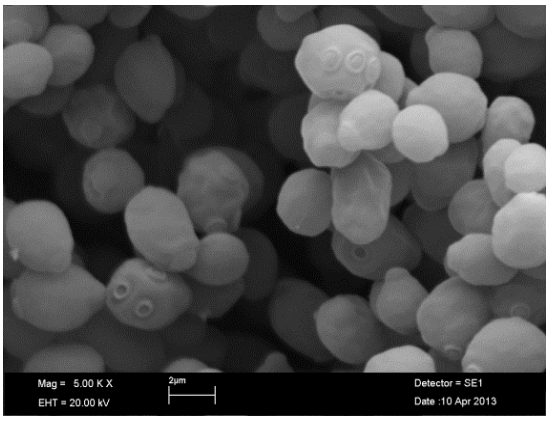

Figura 11A: Imagens da levedura controle negativo (aumento de 5000 vezes)

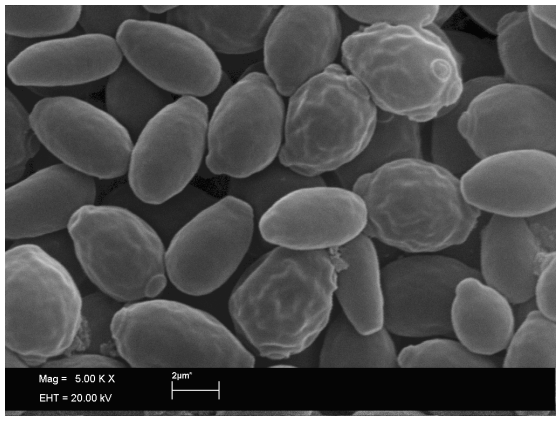

Figura 11B: Imagens da levedura controle positivo (aumento de 5000 vezes)

Geralmente, as condições adversas que os microrganismos enfrentam, afetam principalmente as estruturas celulares (membranas) e as diferentes macromoléculas, como os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, as quais sofrem modificações estruturais que danificam suas funções (FOLCH-MALLOL et al., 2004).

A membrana plasmática é um dos principais alvos para a inibição provocada pelo etanol no transporte de nutrientes. O etanol interage com as membranas através da sua inserção no interior hidrofóbico, provocando um aumento da polaridade dessa região, enfraquecendo as interações hidrofóbicas, a barreira hidrofóbica da membrana às trocas livres de moléculas polares e afeta o posicionamento das proteínas na membrana. Pode-se observar ainda um aumento da fluidez, com consequente aumento de permeabilidade passiva a íons e a pequenos metabólitos (INGRAM; BUTTKE, 1984).

De acordo com Ma et al. (2013), o alto nível de etanol (10% e 15%) afeta a morfologia da *S. cerevisiae*, enquanto que o nível relativamente baixo (2,5%) e o médio (7,5%) nível ou um curto tempo de tratamento não influencia no tamanho das células. Na presença de teores de etanol considerados médios (7,5%) e altos (10 e 15%), a espessura da parede celular das células não era uniforme, algumas paredes celulares tornaram-se muito finas e a integridade da parede celular de algumas células foi comprometida.

Quando as células de *Saccharomyces cerevisiae* se encontram em uma condição de alta osmolaridade externa, sofre uma mudança imediata em seu volume celular devido à perda de água do citosol. Esta desidratação é um processo rápido (aproximadamente 1 minuto) sendo parcialmente compensado por um influxo de água do vacúolo para o citoplasma quando íons tóxicos se acumulam em organelas (SERRANO, 1996).

O etanol induz a lise das células devido à formação de peptidoglicano de ligação cruzada, que é agravada pelo aumento da temperatura para acima de 35° C (JONES, 1989).

As estruturas de superfície de células retraídas e fixadas em solução hipertônica de NaCl não eram diferentes das células fixadas em meio isotônico, não havia plasmólise do lado de fora do envoltório. As células ressuspensas em meio isotônico eram idênticas às células do controle; cicatrizes do broto foram mantidas tanto no estado retraído e após ressuspensão (MORRIS et al., 1983).

Analisando as imagens de leveduras realizadas no microscópio eletrônico de varredura, em aumentos de 5.000 vezes, permitiu verificar que as células submetidas aos mostos com teores crescentes de sólidos solúveis (9 a 24°Brix) e ao reciclo das células efetuados ao fim de cada ciclo, não demonstraram diferenças morfológicas significativas da parede celular quando comparadas com as células do controle negativo, conforme pode ser observado nas imagens das Figuras 12A a 12J.

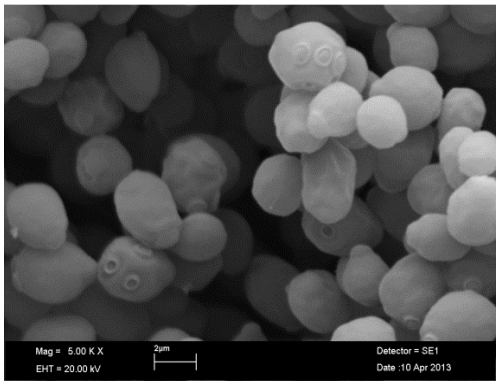

Figura 12A: Imagens da levedura controle negativo (aumento de 5000 vezes)

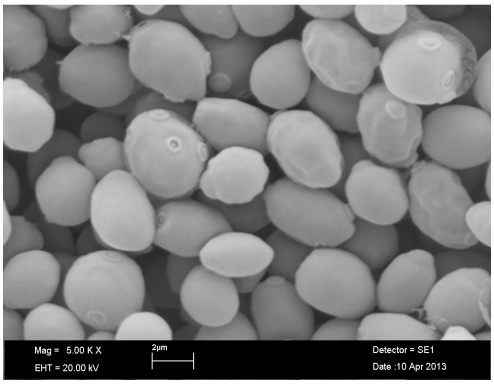

Figura 12B**:** Imagens da levedura com 9°Brix (aumento de 5000 vezes)

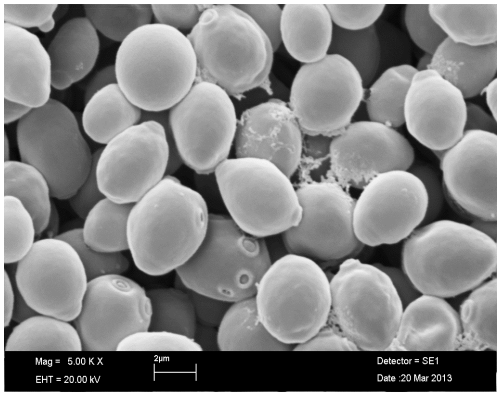

Figura 12C**:** Imagens da levedura com 12°Brix (aumento de 5000 vezes)

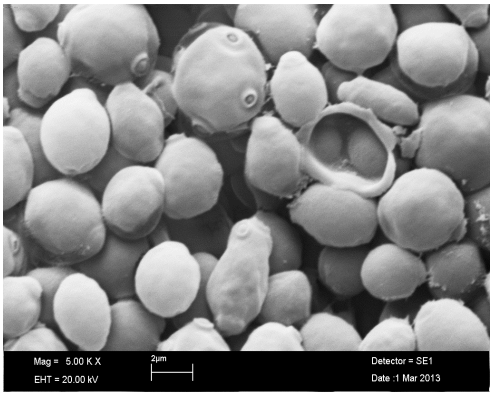

Figura 12D:Imagens da levedura com 15°Brix (aumento de 5000 vezes)

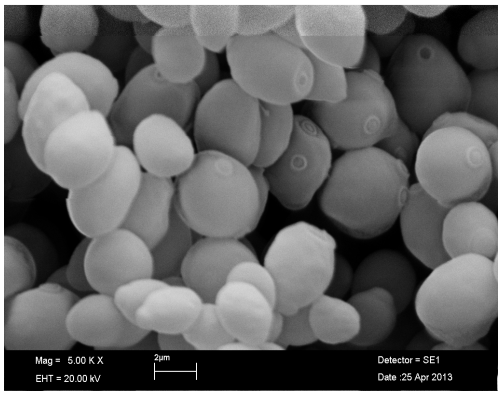

Figura 12E: Imagens da levedura com 18°Brix (aumento de 5000 vezes)

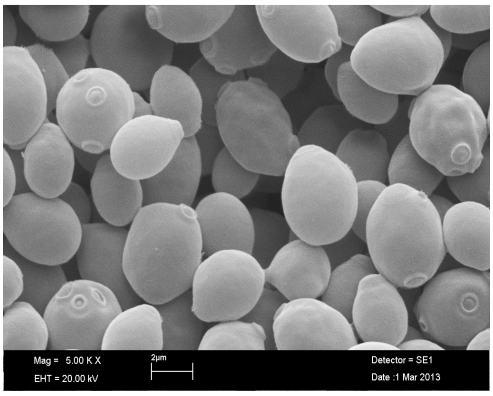

Figura 12F: Imagens da levedura com 20°Brix (aumento de 5000 vezes)

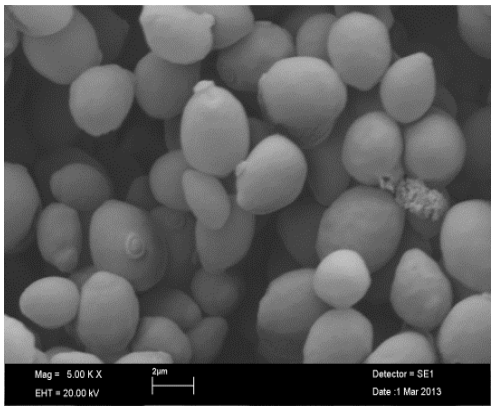

Figura 12G: Imagens da levedura com 21°Brix (aumento de 5000 vezes)

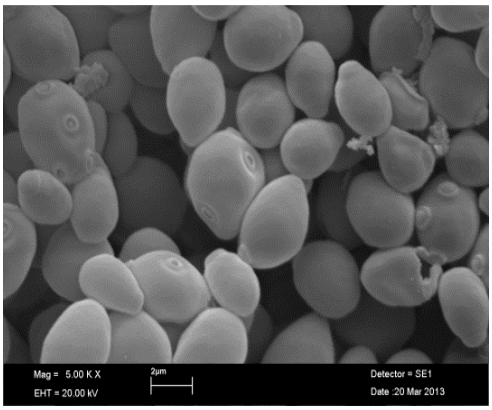

Figura 12H: Imagens da levedura com 22°Brix (aumento de 5000 vezes)

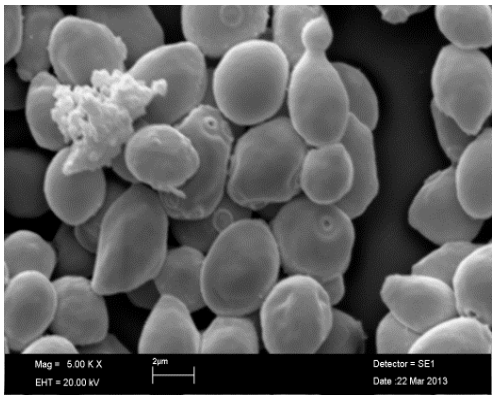

Figura 12I: Imagens da levedura com 23°Brix (aumento de 5000 vezes)

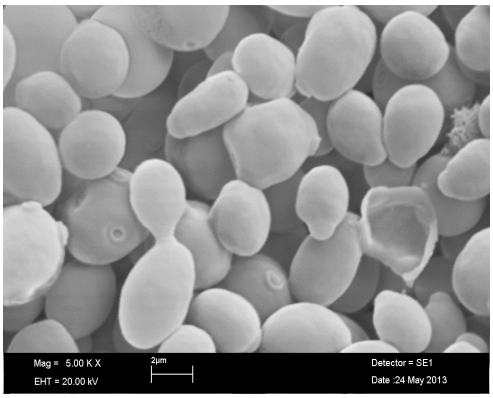

Figura 12J: Imagens da levedura com 24°Brix (aumento de 5000 vezes)

Observando as imagens das leveduras, conforme as Figuras 12A a 12J dos diferentes tratamentos mostram células lisas e túrgidas, indicando que as células não sofreram danos severos e que a adaptação ao aumento da concentração de açúcar no meio foi eficiente. Por consequência, a concentração de álcool no meio,

não proporcionou alterações morfológicas visíveis, nas condições do estudo, sobre as células das leveduras.

As análises das imagens da parede celular das leveduras realizadas através da microscopia eletrônica de varredura, mostraram que os parâmetros usados no desenvolvimento do trabalho como a escolha da levedura selecionada PE-2 (tolerante ao reciclo de células e de teores alcoólicos de até 15%), da temperatura de fermentação de 30°C e da adaptação gradativa das leveduras ao aumento da concentração de açúcar no meio, apresentaram bons resultados, já que não foram observadas mudanças morfológicas visíveis na parede celular das leveduras.

A temperatura de 30°C também foi adequada aos tratamentos utilizados, pois de modo geral, nessa temperatura, os efeitos do etanol não causaram danos significativos sobre a parede das células das leveduras. Os resultados encontrados estão de acordo com aqueles encontrados por Amorim, Basso e Alves (1996), que mostram que as leveduras de destilarias crescem bem em temperaturas entre 30 - 33°C e as fermentações podem ocorrer com altas velocidades em temperaturas ainda mais elevadas. Entretanto, com o aumento da temperatura a levedura se torna mais vulnerável à toxidez exercida pelo etanol produzido, ocorrendo queda de viabilidade. Alguns efeitos podem ser atribuídos às alterações na composição da membrana a fim de preservar a integridade das mesmas. Ainda segundo os autores acima, as leveduras podem aumentar as proporções de ácidos graxos saturados, bem como o comprimento das cadeias desses ácidos. Os ácidos graxos saturados conferem rigidez, enquanto que os insaturados conferem fluidez às membranas, por isso, em temperaturas mais elevadas os ácidos graxos saturados conferem a fluidez necessária à célula.

Uma linhagem de *Saccharomyces* proveniente da produção de vinho tolerante ao etanol é capaz, após crescimento na presença de altas concentrações de etanol, de melhorar a eficiência da tolerância da membrana ao etanol. Em linhagens de *Saccharomyces* menos tolerante ao etanol, em escala laboratorial, não são capazes de adaptar a sua membrana ao etanol. Além disso, após crescimento na presença de altas concentrações de etanol, a membrana dessa linhagem de *Saccharomyces* torna-se cada vez mais sensível, embora este seja um processo reversível. A reversão para uma maior tolerância ao etanol ocorre apenas após a adição de uma fonte de energia (glicose) e não ocorre na presença de ciclohexamida (JIMÉNEZ; BENÍTEZ, 1987).

Dinh et al. (2008) observaram que o conteúdo de ácidos graxos da membrana celular e o tamanho das células de levedura adaptada ao etanol (2,5 a 10% v/v), foram alterados (mudança na composição de ácido graxo e aumento do tamanho das células de levedura) durante o processo de adaptação. Esse aumento no tamanho pode ser o fenótipo típico das células de levedura adaptados para elevada concentração de etanol. Além disso, a diferença de tamanhos da célula mãe (maior) entre as linhagens de levedura não adaptadas ao etanol, sugere que o tamanho da célula, do ciclo celular e a adaptação ao etanol estão intimamente correlacionados.

No trabalho de Canetta, Adya e Walker (2006), as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* foram expostas às concentrações de 10, 20 e 30 % v v^{-1} de etanol. Os efeitos sobre a morfologia celular (rugosidade) e fisiologia (volume celular) foram mais pronunciados para *Sc. pombe* que para *S. cerevisiae* com 10 % v v^{-1} de etanol. Na concentração de 20 % v v^{-1}, depois de 1h de exposição ao etanol, as células da *S. cerevisiae* apresentaram um aumento do encolhimento da célula e da rugosidade, enquanto a *Sc. pombe* apresentaram além do aumento da rugosidade, uma queda acentuada no volume das células (retração mais evidente). Já com 30 % v v^{-1} de etanol, para ambas as linhagens, observou-se um rápido aumento da rugosidade celular e do declínio no volume celular.

A parede celular da levedura compreende cerca de 30% do peso de uma levedura desidratada. Morfologicamente ela é compreendida de três camadas sendo que a mais externa é composta principalmente de manana-proteína, e um pouco de quitina. A camada central é composta de glucana, que é responsável pela resistência da parede celular. A camada mais interna parece ser composta principalmente de material proteico (AMORIM, 1977).

6 CONCLUSÕES

1) A levedura PE-2 é capaz de se adaptar e tolerar os vários estresses sofridos pelas células de leveduras durante a fermentação como a alta concentração de açúcar, alta concentração de álcool no vinho e ao processo de reciclo durante todos os ciclos.

2) Mediante a microscopia eletrônica de varredura, pode-se concluir que a levedura PE-2 adaptada para fermentar em mostos com altos teores de açúcares, não sofreu alterações morfológicas significativas na parede celular, diferentemente dessas linhagens de leveduras inoculadas diretamente em meio com alto teor de açúcar.

3) Fermentações realizadas com a levedura PE-2, adaptadas à altas concentrações de açúcar no mosto, permitem reduzir a produção de vinhaça em até 72 %.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, F.; PEINADO, R.A.; MILLAN, C.; ORTEGA, J.N.; MAURICIO, J.C. Relationship between ethanol tolerance, H+-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, p. 34–42, 2006.

ALCARDE, A.R. **Fermentação**. Brasília, DF: Agência Embrapa de Informação Tecnológica – AGEITEC, 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_22122006154841.html> Acesso em: 10 mar 2014.

ALEXANDRE, H.; ROUSSEAUX, I.; CHARPENTIER, C. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 20, p. 173-183, 1993.

ALEXANDRE, H.; ROUSSEAUX, I.; CHARPENTIER, C. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 124, p. 17–22, 1994.

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros de fermentação alcoólica.** 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMARAL, W.A.N.; ALMEIDA, L.T.; GIULIANI, E. Expertise aumenta competitividade em biocombustíveis. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 8, p. 22-25, 2008.

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica.** Araras, 1977. 95p.

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

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C. Tecnologia reduz resíduo do etanol. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 23 abr. 2009. p. A19.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processos de produção de álcool:** controle e monitoramento. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996. 103 p.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. **Visão Agrícola,** Piracicaba, 2008. v.5, n.8, p.34-37.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, London, v. 109, p. 195-200, 2006.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A.S. Uma nova visão da microbiota de leveduras habitantes do processo de produção do bioetanol brasileiro. **Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 30, p. 42-47, 2011.

ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; McCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, Woodbury, v.v19, p. 2258-2270, 2009.

BABIKER, M.A.; BANAT, A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High – temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 861-867, 2010.

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

BASSI, A.P.G.; SILVA, J.C.G.; REIS, V.R.; ANTONINI, C.S.R. Effects of single and combined cell treatments based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentation of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 29, p. 1661-1676, 2013.

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

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M.A.S. (Ed.). **Biofuel production -** Recent developments and prospects. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/ethanol-productionin-brazil-the-industrial-process-and-its-impact-on-yeast-fermentation> Acesso em: 24 set. 2013.

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

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C.A.L.; RAMOS, D.D.; ERNANDES, J.R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 32, p. 83-95, 2010.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very high gravity fermentation

technology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 27, p. 87-92, 2001.

BENJAPHOKEE, S.; HASEGAWA, D.; YOKOTA, D.; ASVARAK, T.; AUESUKAREE, C.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, p. 379-386, 2012.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 26, p. 678–687, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico da agroenergia.** Brasília, DF, 2009. 160 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil é líder mundial no setor de agroenergia.** Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2011/12/brasil-e-lider-mundial-no-setor-de-agroenergia> Acesso em: 3 maio 2012.

BRAUNBECK, O.A.; NETO, E.A. Logística do transporte de matéria-prima e resíduos da cana-de-açúcar. In: CORTEZ, L.A.B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. cap. 3, p. 485-504.

BRAVO, E. O aquecimento global. In: _____. **Agrocombustíveis, cultivos energéticos e soberania alimentar na América** Latina - aquecendo o debate sobre agrocombustíveis. São Paulo: Ed. Expressão Popular; Terra de Direitos, 2007. cap. 2, p. 27-31.

BUENO NETO, C.L. **Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar**. 1982. 147 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CANETTA, E.; ADYA, A.K., WALKER, G.M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, p. 308-315, 2006.

CASTRO, L.A.S. **Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 37p.

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

COELHO, S.T.; LORA, B.A.; GUARDABASSI, P.M. Aspectos ambientais da cadeia do etanol de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. In: CORTEZ, L.A.B. (Ed.).

Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. cap. 2, p. 241-253.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. Portaria número 4.231. LABORSOLO. **Disposição de vinhaça.** Disponível em: ‹www.laborsolo.com.br/divisao.ambiental.asp?ex=2&id=1&menu=55› Acesso em: 17 fev. 2010.

CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. 954 p.

D'AMORE, T.; STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 9, p. 322-330, 1987.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 365-372, 1988.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura.** Aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: PUCRS, Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise, 2007. 60 p.

DING, J.; HUANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, N.; YANG, D.; ZHANG, K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 253-263, 2009.

DINH, T.N.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C.; SHIMIZU, H. Adaptation of Saccharomyces cerevisiae cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, e 2623, 2008.

ELEUTHERIO, E.C.A.; RIBEIRO, M.J.S.; PEREIRA, M.D.; MAIA, F.M.; PANEK, A.D. Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, New York, v. 36, p. 1217-1223, 1995.

ESCOBAR, J.C.; LORA, E.S.; VENTURINI, O.J.; YANÉZ, E.E.; CASTILLO, E.F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 1275-1287, 2007.

FELIPE, M.G.A. A qualidade da matéria-prima na produção de etanol de cana-de-açúcar. In: CORTEZ, L.A.B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 553-559.

FIORAVANTI, C. As artesãs do etanol. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, n. 165, p. 45-48, 2009. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2009/11/01/as-artesas-do-etanol/> Acesso em: 13 maio 2013.

FISCHER, G.; TEIXEIRA, E.; HIZSNYIK, E.T.; VELTHUIZEN, H.V. Land use dynamics and sugarcane production. In: ZUURBIER, P.; van de VOOREN, J. (Ed.).

Sugarcane ethanol: contributions to climate change mitigation and the environment. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008. p. 29-59.

FILHO, A.A.V.; SZMRECSÁNYI, T.; RAMOS, P. Impactos da evolução do setor sucroalcooleiro: Sumário das questões que balizarão uma evolução sustentável. In: CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 279-289.

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

FOLCH-MALLOL, J.L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; ROBLES, A.A.C. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, DF, v. 46, p. 24-46, 2004.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agronomia, 2000. 203 p.

GALLETI, S.R. Introdução a microscopia eletrônica. **O Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 33-35, 2003.

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

GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D.E.; ECHLIN, P.; JOY, D.C.; ROMIG Jr., A.D.; LYMAN, C.E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**: A Text for Biologists, Material Scientists and Geologists. New York: Plenum Press, 2ºEd., 1992, 820p.

GONZÁLEZ, R.G.; GARLOBO, C.M. Vinhaça. In: INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR- ICIDCA. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar:** diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília, DF: ABIPTI, 1999, p. 435-438.

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

HIRATA, R.C.A.; BASTOS, C.R.A.; ROCHA, G.A.; GOMES, D.C.; IRITANI, M.A. Groundwater pollution risk and vulnerability map of the state of São Paulo, Brazil. **Water Science and Technology**, London, v. 24, p. 159-169, 1991.

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

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

JIMENEZ, J.; BENITEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 1196-1198, 1987.

JONES, R.P. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 11, p. 130-153, 1989.

JORNALCANA. **Números confirmam safra 2013/14 alcooleira.** Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: http://www.jornalcana.com.br/noticia/Jornal-Cana/55392+Numeros-confirmam-safra-2013-14-alcooleira. Acesso em: 10 fev 2014.

JUNQUEIRA, C.A.R.; JUNIOR, V.E.M.; LOSSARDO, L.F.; FELICIO, B.C.; JUNIOR, O.M.; FOSCHINI, R.C.; MENDES, R.M.; LORANDI, R. Identificação do potencial de contaminação de aquíferos livres por vinhaça na bacia do Ribeirão do Pântano, Descalvado (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 507-518, 2009**.**

KASAVI, C.; FINORE, I.; LAMA, L.; NICOLAUS, B.; OLIVER, S.G.; ONER, E.T.; KIRDAR, B. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 45, p. 230-238, 2012.

KELSALL, D.R.; LYONS, T.P. Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed.). **The alcohol textbook.** A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. 4. ed. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2003. cap. 10, p. 121-134.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, p. 223-253, 2010.

KRISHNAN, M.S.; XIA, Y.; TSAO, G.T.; KASTHURIKRISHNAN, N.; SRINIVASAN,N.; COOKS, R.G. Process engineering of high-ethanol-tolerance yeast for the manufacture of ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 51, p. 479-493, 1995.

LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRE, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, MA, v. 5, p. 16-29, 2011.

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

LEAL, M.R.L.V.; VALLE, T.L.; FELTAN, J.C.; CARVALHO, C.R.L. Outras matérias-primas para a produção de etanol. CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 519-539.

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

LIMA, L.R.; MARCONDES, A.A. **Álcool carburante**: uma estratégia brasileira. Curitiba: Editora UFPR, 2002. 248 p.

LIMA, U.A. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v. 1, 285 p.

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

LNF LATINO AMERICANA. **Produtos**. Leveduras. Disponível em: <www.lnf.com.br> Acesso em: 26 abr. 2012.

LUCENA, B.T.L.; SILVA-FILHO, E.A.; COIMBRA, M.R.M.; MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JR, M.A. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, p. 1072-1084, 2007.

LUCON, O.S. Aspectos ambientais da cadeia do etanol de cana-de-açúcar – Termo de Referência. In: WORKSHOP ASPECTOS AMBIENTAIS DA CADEIA DO ETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR. Projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo, Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, 2008, São Paulo.

MA, M.; HAN, P.; ZHANG, R.; LI, H. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 59, p. 589-597, 2013.

MAJARA, M.; O'CONNOR-COX, E.S.C.; AXCELL, B.C. Trehalose – A stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, St. Paul, v. 54, p. 221-227, 1996.

MALISKA, A.M. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise.** Santa Catarina, 97p. Disponível em: < http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf> Acesso em: 05 jun. 2014.

MARQUES, T.A.; SERRA, G.E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 532-535, 2004.

MATTHEWS, T.M.; WEBB, C. Culture systems. In: TUITE, M.F.; OLIVER, S.G. ***Saccharomyces.*** New York: Plenum Press, 1991. v. 4, chap. 8, p. 249-282.

MAY, L. **Biotecnologia**. Faculdade Estácio de Sá de Campo Grande / MS. Curso de Farmácia – Biotecnologia. Disponível em: ‹www.fes.br/disciplinas/far/biotecnologia/10%AA-AULABiotec-2008.ppt› Acesso em: 20 jan. 2010.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORRIS, G.J.; WINTERS, L.; COULSON, G.E.; CLARKE, K.J. Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 129, p. 2023-2034, 1983.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v. 2, p. 365-382, 1984.

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

MUTTON, M. A.; ROSSETO, R.; MUTTON, M.J.R. Utilização agrícola da vinhaça. In: CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 423-440.

NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 28, p. 383-391, 1974.

NEVES, M.A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N.; NAKAJIMA, M. State of the art and future trends of bioethanol production. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, Tokyo, v. 1, p. 1-14, 2007.

OGAWA, Y.; NITTA, A.; UCHIYAMA, H.; IMAMURA, T.; SHIMOI, H.; ITO, K. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, p. 313-320, 2000.

PANCHAL, C.J. **Yeast strain selection.** New York: Marcel Dekker, 1990. 349 p.

PAMPLONA, C. **Proálcool.** Impacto em termos técnico-econômicos e sociais do programa no Brasil.: Piracicaba: Planalsucar, 1984. 93 p.

PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 32, p. 1655-1661, 2010.

PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol

fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 34, p. 45-53, 2012.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. **The Life of Yeasts.** Their nature, activity, ecology and relation to mankind. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, 1966.

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

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

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; OBULAM, V.S.R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**. p.675-729, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Áustria: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em < www.R-project.org> Acesso em: 03 maio 2012.

REVILLA, M. S.A.; ARIAS, M.S.; CARRACEDO, G.B.; GARLOBO, C.M. Álcool. In: In: INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR- ICIDCA. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar:** diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília, DF: ABIPTI, 1999. p. 229-236.

RIBEIRO, C.A.F.; BLUMER, S.A.G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira.** 2ª Parte. Tecnologia do Álcool. Piracicaba, 1999. 34 p.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociências, UNESP, 1995. 101 p.

ROSSETTO, A.J. Utilização agronômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar**: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, p. 435-504.

ROSSETTO, R. Vinhaça e o meio ambiente. O poder das novas tecnologias. In: REUNIÃO ANUAL – ENCONTROS FERMENTEC, 27., 2006, São Pedro. Módulo 1 – Fermentação alcoólica. Piracicaba: Fermentec S/C. Ltda., 2006. p. 3-5.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A.D. Adubação – Resíduos alternativos. Brasília, DF: Agência Embrapa de Informação Tecnológica – AGEITEC, 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html> Acesso em: 20 fev. 2014.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed.). **The alcohol textbook.** A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. 4. ed. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2003. cap. 9, p. 85-120.

SERRANO, R. Salt tolerance in plants and microorganisms: Toxicity targets and defense responses. **International Review of Citology**, Amsterdam, v. 165, p. 1-52, 1996.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, p. 108-114, 2007.

SPENCER, G.L.; MEADE, G.P. Special reagentes. In: CANE SUGAR HANDBOOK. New York: Wiley, 1945.

STECKELBERG, C.; SARTORATO, A.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G. Influência do perfil de ácidos graxos sobre a tolerância ao etanol em diferentes cepas de leveduras de uso industrial. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA AMBIENTAL, 5., 2010, São Pedro, SP. Disponível em: ‹www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t049.doc› Acesso em: 20 jan. 2010.

SWAN, T.M.; WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 191-197, 1998.

SZWARC, A. O impacto do uso do etanol na qualidade do ar das grandes cidades. In: CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar:** P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 185-193.

TANAKA, F.A.O.; KITAJIMA, E.W. **Curso Introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura -** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária, Piracicaba, 2009, 32p.

TAUPIER, L.O.G. A diversificação da cana no novo século. In: INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR- ICIDCA. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar:** diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília, DF: ABIPTI, 1999, p. 3-27.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; JONES, A.M.; INGLEDEW, W.M. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: effect of sugar concentration and fermentation temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 43, p. 211-226, 1993.

THOMAS, K.C.; DHAS, A.; ROSSNAGEL, B.G.; INGLEDEW W.M. Production of fuel alcohol from hull-less barley by very high gravity technology. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 72, p. 360-364, 1995.

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

TROYER, J.R. A relation between cell multiplication and alcohol tolerance in yeasts. **Mycologia**, Lancaster, v. 45, p. 20-39, 1953.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP. WORKSHOP TECNOLÓGICO, 2007, Jaboticabal. **Termo de Referência; Vinhaça**. Jaboticabal: FCAV, UNESP, 2007. Disponível em: http://www.docstoc.com/docs/122788574/Marcia-Mutton-1.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**. São Paulo, 2007. 68 p.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. UNICA divulga oficialmente suas estimativas para a safra 2013/2014. **A Crítica**, Campo Grande, 02 de maio de 2013. Disponível em:<http://www.acritica.net/index.php?conteudo=Noticias&id=86690> Acesso em: 6 maio 2013.

USINA ALTA PAULISTA. Junqueirópolis, SP. Disponível em: www.usalpa.com.br/galeria_vinhaca.html. Acesso em: 21 jun. 2012.

VAN UDEN, N. Temperature profiles of yeasts. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 195-251, 1984.

VIANNA, C.R.; SILVA, C.L.C.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 93, p. 205-217, 2008.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology.** Chichester: John Wiley & Sons, 1998. chap. 4, p. 101-202.

WATSON, K. Temperature relations. In: ROSE, A. (Ed.). **The yeasts.** London: Academic Press, 1987. v. 2, chap. 3, p. 41-71.

WEBER, F.J.; BONT, J.A.M. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1286, p. 225-245, 1996.

ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNADINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar.** 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ/USP, 1996. 194 p.

YOU, K.M.; ROSENFIELD, C.L.; KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1499–1503, 2003.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 144, p. 23-30, 2009.

ANEXO

Anexo A - Resultados (médias) dos parâmetros avaliados durante os 15 ciclos fermentativos

	Ciclos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
^{o} Brix Inicial	9,3	10,3	11,4	12,6	13,6	14,4	15,4	16,7	17,6	18,7	19,9	20,8	21,8	22,8	24,1
ART I ($g.L^{-1}$)	95,00	101,50	95,50	134,00	155,50	154,40	154,40	134,00	177,00	179,12	201,10	212,77	212,77	241,62	232,35
^{o} Brix Final	3,3	3,1	3,3	3,8	3,8	4,08	4,83	4,92	5,07	5,6	6,2	6,85	7,1	7,9	8,6
ART f ($g.L^{-1}$)	1,75	2,69	1,43	1,48	1,33	1,47	1,69	2,12	1,53	2,51	2,39	6,47	7,93	10,44	13,16
Viabilidade i (%)	91,18	89,96	92,44	93,19	92,19	91,76	92,42	95,80	91,74	94,82	95,08	91,97	93,54	93,54	91,26
Viabilidade f (%)	92,50	84,71	93,55	93,52	93,06	95,52	95,30	93,69	94,61	95,20	94,28	96,95	94,54	92,75	92,71
Teor Alcoólico (%)	3,96	4,37	5,20	5,90	6,60	7,20	7,90	8,60	9,10	9,80	10,60	10,90	11,40	12,10	12,80
Biomassa (%)	9,37	9,75	9,62	10,00	10,38	10,63	10,88	11,00	11,63	11,13	12,00	12,50	12,13	13,25	12,38
Rendimento (%)	64,29	66,49	84,09	68,28	66,04	72,26	83,85	98,54	79,40	84,06	81,41	79,12	83,11	77,34	85,08
Tempo fermentação (h)	7,00	5,00	6,00	6,00	7,00	7,00	7,00	8,00	9,00	9,00	9,00	9,00	10,00	10,00	11,00
Produtividade (% Alc.h-1)	0,57	0,87	0,87	0,98	0,94	1,03	1,13	1,08	1,01	1,09	1,18	1,21	1,14	1,21	1,16
Prod. Vinhaça (L vinhaça/L etanol)	24,28	21,94	18,14	15,88	14,04	12,84	11,66	10,70	9,99	9,26	8,39	8,16	7,73	7,25	6,80