

Hélia Lucila Malta

Estudos de parâmetros de propagação de fermento  
(*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de  
cachaça de alambique.

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Evelyn de Souza Oliveira  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Amazile Biagioni R. A. Maia

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2006



"Nada mais difícil, quando se procura um caminho, que descobrir se a força que nos empurra vem do desejo de fugir ou do desejo de buscar. Talvez, em algum nível bem profundo, nem haja qualquer diferença entre esses desejos."  
(Autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

À Professora doutora Evelyn Souza Oliveira, pela orientação e paciência;  
à Professora doutora Amazile Biagioni Ribeiro Abreu Maia, pela valiosa co-orientação;  
aos Professores componentes da banca, pelas correções e sugestões;  
ao Professor Gecenir Colen por todos os “palpites” científicos;  
aos Professores do PPGCA, pela contribuição científica e pessoal,  
ao estagiário Tiago Antônio Oliveira Mendes pela inestimável ajuda, interesse e respeito pelo trabalho;  
à Bunge Alimentos pelas amostras de SUPRO (isolado protéico de soja) utilizado neste trabalho;  
à Prodesa S.A., pelo fornecimento do extrato de levedura utilizado neste trabalho;  
à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo suporte financeiro;  
aos meus amigos Thiago Lucas, Michely Capobiango e Raquel Santos pela amizade, diversão e toda ajuda durante esses dois anos;  
às minhas amigas Raquel e Letícia Alvarenga, Érica Neves e Patrícia Perón pelo convívio, troca de experiências e companhia.  
ao Anderson pelo companheirismo, carinho, paciência e ajuda em todos os sentidos.  
às minhas amigas Ana Flávia Resende (e Túlio) e Poliana Moreno, por serem a família que eu pude escolher, pela constância na minha vida;  
aos meus avós, pela torcida e especialmente à Tia France,  
às minhas irmãs Yara e Talita, pelo respeito e por ainda crescermos juntas,  
aos meus pais Helvécio e Mercedes, por significarem apoio invariável, amor e incentivo nessa busca mesmo nas horas mais difíceis,  
à Deus, por me dar uma nova oportunidade todos os dias.

# SUMÁRIO

|           |  |    |
|-----------|--|----|
|           | LISTA DE TABELAS.....  | 7  |
|           | LISTA DE FIGURAS.....  | 8  |
|           | LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....                                    | 9  |
|           | RESUMO.....  | 10 |
|           | ABSTRACT.....  | 11 |
| 1         | INTRODUÇÃO.....  | 12 |
| 2         | REVISÃO DA LITERATURA.....   | 13 |
| 2.1       | CONCEITUAÇÃO.....  | 15 |
| 2.2       | PRODUÇÃO DE CACHAÇA.....   | 16 |
| 2.2.1     | Matéria-prima.....   | 18 |
| 2.2.2     | Extração do caldo.....   | 19 |
| 2.2.3     | Fermentação.....   | 19 |
| 2.3       | PROPAGAÇÃO DO FERMENTO.....  | 20 |
| 2.3.1     | Leveduras utilizadas na fabricação de cachaça.....                     | 20 |
| 2.3.2     | Fatores que influenciam na propagação do fermento.....                 | 22 |
| 2.3.2.1   | Aeração e Agitação.....  | 22 |
| 2.3.2.2   | Temperatura.....   | 23 |
| 2.3.2.3   | Requerimentos para o crescimento e composição química do mosto.....    | 23 |
| 2.3.2.3.1 | Fonte de carbono.....  | 24 |
| 2.3.2.3.2 | Fonte de nitrogênio.....   | 25 |
| 2.3.2.3.3 | Adição de fubá e farinha de soja ao mosto.....                         | 26 |
| 2.3.2.3.4 | Fonte de minerais.....   | 27 |
| 2.3.3     | Parâmetros cinéticos.....  | 29 |
| 2.3.4     | Propagadores.....  | 30 |
| 2.3.5     | Estratégias para aprimorar a performance dos meios de fermentação..... | 30 |
| 2.3.5.1   | Estratégia aberta.....   | 31 |
| 2.3.5.2   | Utilização dos resultados de testes conduzidos em shaker.....          | 31 |
| 2.3.5.3   | Aperfeiçoamento de meios já descritos na literatura.....               | 31 |
| 2.3.5.4   | Troca de componentes.....  | 31 |
| 2.3.5.5   | “Cópia” biológica.....   | 31 |
| 3.        | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 32 |
| 3.1       | MATERIAL.....  | 32 |
| 3.1.1     | Leveduras.....   | 32 |
| 3.1.2     | Propagadores.....  | 32 |
| 3.2       | MÉTODOS ANALÍTICOS.....  | 35 |
| 3.2.1     | Viabilidade celular.....   | 35 |
| 3.2.2     | Determinação dos açúcares redutores totais (ART) .....                 | 35 |
| 3.2.3     | Acidez total do mosto e do vinho.....                                  | 35 |
| 3.2.4     | Dosagem de etanol no vinho.....  | 35 |
| 3.2.5     | Determinação de massa seca celular (g de matéria seca/L)<br>.....      | 35 |
| 3.2.6     | Determinação de pH.....  | 36 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.3   | CÁLCULO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR.....   | 36 |
| 3.3.1 | Fator de conversão de substrato células ( $Y_x/s$ ) .....   | 36 |
| 3.3.2 | Fator de conversão de substrato em etanol ( $Y_p/s$ ) .....   | 36 |
| 3.3.3 | Fator de conversão de substrato em acidez ( $Y_{ac}/s$ ) .....  | 36 |
| 3.3.4 | Aumento de biomassa (em número de vezes) .....  | 37 |
| 3.4   | METODOLOGIA UTILIZADA NOS ENSAIOS DE PROPAGAÇÃO.....  | 37 |
| 3.4.1 | Ensaio preliminares – cultivos realizados no Propagador A.....  | 38 |
| 3.4.2 | Testes de propagação conduzidos em incubadora com agitação e temperatura controladas ( <i>shaker</i> )..... | 40 |
| 3.4.3 | Testes de propagação conduzidos no Propagador B.....  | 42 |
| 3.4.4 | Testes de propagação conduzidos no Propagador C.....  | 45 |
| 3.5   | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 47 |
| 4     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 48 |
| 4.1   | ENSAIOS PRELIMINARES.....   | 48 |
| 4.2   | TESTES DE PROPAGAÇÃO CONDUZIDOS EM INCUBADORA COM AGITAÇÃO E TEMPERATURA CONTROLADAS ( <i>SHAKER</i> )..... | 51 |
| 4.3   | TESTES DE PROPAGAÇÃO CONDUZIDOS NO PROPAGADOR B.....  | 53 |
| 4.4   | TESTES DE PROPAGAÇÃO CONDUZIDOS NO PROPAGADOR C.....  | 55 |
| 5     | CONCLUSÕES.....   | 59 |
| 6     | PERSPECTIVAS.....   | 60 |
| 7     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Composição Típica da cachaça pela legislação brasileira.....                                      | 16 |
| 2  | Limites máximos para contaminantes orgânicos e inorgânicos.....                                   | 16 |
| 3  | Composição de leveduras de fermento prensado.....   | 24 |
| 4  | Constituintes inorgânicos das leveduras.....  | 28 |
| 5  | Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios preliminares Propagador A.....             | 38 |
| 6  | Composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias dos ensaios preliminares .....       | 39 |
| 7  | Composição dos meios de cultura utilizados nas propagações conduzidas em <i>shaker</i> .....      | 41 |
| 8  | Composição dos meios de cultura utilizados no Propagador B.....                                   | 43 |
| 9  | Composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias nas propagações no Propagador B..... | 44 |
| 10 | Composição dos meios de cultura utilizados no Propagador C.....                                   | 45 |
| 11 | Sais minerais utilizados como micronutrientes no Teste 14.....                                    | 45 |
| 12 | Composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias no Propagador C.....                 | 45 |
| 13 | Resultados dos parâmetros fermentativos do Propagador A.....                                      | 48 |
| 14 | Resultados dos parâmetros fermentativos - <i>shaker</i> .....                                     | 51 |
| 15 | Resultados dos parâmetros fermentativos do Propagador B.....                                      | 53 |
| 16 | Resultados dos parâmetros fermentativos do Propagador C.....                                      | 55 |
| 17 | Resultado do Teste de médias dos parâmetros fermentativos.....                                    | 56 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| 1 Fluxograma da Produção de Cachaça..... | 18 |
| 2 Propagador A.....                      | 34 |
| 3 Propagador B.....                      | 34 |
| 4 Propagador C.....                      | 34 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $Y_{x/s}$  -Fator de conversão de substrato em células (g/g)  
 $Y_{p/s}$  -Fator de conversão de substrato em etanol (g/g)  
 $Y_{ac/s}$  -Fator de conversão de substrato em ácido acético (g/g)  
m.x. -Massa seca celular (g)

## RESUMO

A cachaça de alambique, produto típico brasileiro, tem sido destaque na economia do estado de Minas Gerais. Tradicionalmente, a propagação do fermento nas fábricas de cachaça de alambique é feita diretamente dentro das dornas de fermentação, que não são apropriadas para a fase aeróbia (fase de propagação do fermento), por não possuírem dispositivos de aeração e agitação. A introdução de um equipamento específico para otimizar a propagação do fermento, também pode abrir caminho para a utilização de linhagens selecionadas. Neste trabalho foram testados três equipamentos para propagação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* estudando o efeito da adição de ar, nutrientes e micronutrientes (sais minerais) sobre a viabilidade e crescimento celular, rendimento em massa celular e fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ). Nas condições avaliadas, o uso do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio não foi suficiente para manter a viabilidade das células, resultado conseguido com extrato de levedura na concentração de 0,9 g/100 mL. Os sais minerais testados (sulfatos de cobre, zinco, ferro, manganês) não interferiram no fator  $Y_{x/s}$ , no aumento de massa celular e na viabilidade. A concentração inicial do inóculo foi um fator decisivo no aumento de massa celular, possibilitando um aumento de até 75 vezes em relação à massa inicial.

Palavras chave: cachaça; *Saccharomyces cerevisiae*; propagação; nutrientes; micronutrientes; fermento.

## ABSTRACT

Cachaça, a typical Brazilian product, has been prominent in the economy of the state of Minas Gerais. Traditionally, the propagation of yeast in distilleries of cachaça occurs directly in the vats of fermentation, which are not appropriate for the aerobic phase (yeast propagation), because they do not possess aeration and agitation devices. The introduction of a specific equipment to optimize the propagation stage of yeasts, can also open the way for use of selected yeasts. In this work three types of equipment for propagation of *Saccharomyces cerevisiae* were tested; studying the effect of the addition of air, nutrients and micronutrients on the viability and cellular growth, yield of cellular mass and the substrate conversion factor in cells. Under the evaluated conditions, the use of ammonium sulphate as a nitrogen source was not sufficient to maintain the viability of the cells, result obtained with yeast extract in the concentration of 0,9 g/100 mL. The minerals tested (zinc, iron, copper and manganese sulphates) did not interfere with the  $Y_{x/s}$  factor, the increase in cellular mass and the viability. The initial concentration of inoculum was a decisive factor in the increase in cellular mass, resulting increase of up to 75 times the initial mass.

Key words: cachaça; *Saccharomyces cerevisiae*; propagator; micronutrients, yeast inoculum.

## 1. INTRODUÇÃO

Basicamente, a produção de cachaça consiste em se extrair o caldo da cana-de-açúcar na operação de moagem, convertê-lo em vinho pelo processo de fermentação e transformar o vinho de cana-de-açúcar em cachaça através da destilação. Tradicionalmente, a propagação do fermento nas fábricas de cachaça de alambique é feita diretamente dentro das dornas de fermentação. Esta prática, no entanto, está associada a um elevado grau de contaminação por bactérias, devido à precariedade operacional. As dornas de fermentação são apropriadas para a fase anaeróbia do metabolismo das leveduras, quando ocorre predominantemente a fermentação do açúcar (sacarose) em etanol e gás carbônico. Assim sendo, as dornas não dispõem de quaisquer dispositivos que permitam otimizar a propagação das leveduras, na qual a eficiência da aeração é fator primordial para a predominância do metabolismo respiratório, que permite maximizar a reprodução das células e minimizar a formação de etanol. É sabido que o etanol, além de ser inibidor da propagação das leveduras, é o substrato ideal para as bactérias acéticas e do ácido láctico que, em presença de oxigênio, o convertem em ácido acético. Isso explica o fato de ser a elevada acidez volátil um problema recorrente nas cachaças de alambique. A introdução de um equipamento específico para otimizar a etapa de propagação do fermento, além de resolver esses entraves, abre caminho para a utilização de linhagens selecionadas, o que pode representar um salto de qualidade para a cachaça de alambique. Com efeito, os trabalhos de isolamento de linhagens, que vêm sendo desenvolvidos por vários grupos de pesquisa em Minas Gerais, apontam excelentes perspectivas para se implementar a qualidade sensorial do destilado. No entanto, isso só será viável para os produtores na medida em que disponham de um equipamento adequado para propagação dessas linhagens.

Os processos tradicionais de propagação de leveduras requerem entre 8 e 15 dias. Em diversos casos, o prazo chega a ser de 25 a 30 dias. Dispondo de um propagador adequado, o produtor artesanal pode obter fermento suficiente para uma dorna em aproximadamente 24 horas, partindo de 500 g ou menos do fermento original (quer sejam células selecionadas ou naturais do próprio ambiente). Isso permite manter um controle muito mais eficiente da fermentação, substituindo-se as células de uma dorna a intervalos programados ou sempre que houver indícios de contaminação.

O objetivo deste trabalho foi estudar o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cachaça em diferentes propagadores de fermento, pelos processos descontínuo e descontínuo alimentado, sob aeração, além de estudar o efeito

da adição de nutrientes e micronutrientes (sais minerais). O desenvolvimento do trabalho constou basicamente de 3 etapas: *i*) Testar o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio (protéica e amoniacal) ao meio de cultivo durante o processo de propagação do fermento; *ii*) Testar a adição de micronutrientes (zinco, cobre, ferro e manganês; *iii*) Testar a influência da concentração inicial de inóculo no aumento do rendimento e da massa celular; contribuindo, assim para o desenvolvimento de um protocolo operacional de propagação de fermento que possa ser utilizado para produção de cachaça de alambique.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os dados históricos sobre bebidas alcoólicas são imprecisos, sendo difícil saber quando foram obtidas as primeiras bebidas alcoólicas fermentadas, embora haja citações sobre seu uso antes da era cristã. As descrições mais precisas provêm de autores árabes, do século X, supondo-se que eles tenham criado os termos álcool e alambique. Na Europa, as primeiras menções sobre o álcool datam do século XII (LIMA, 2001).

A tecnologia de produção das bebidas alcoólicas espalhou-se pelo Velho e Novo Mundo. Na Itália, o destilado de uva fica conhecido como *grappa*. Na Alemanha, a partir da cerveja, o *kirsh*. Na Escócia, o *Whisky*, destilado da cevada sacarificada. Na Rússia, a *vodka*, de centeio. Na China e Japão, o *sakê*, de arroz. Em Portugal, destilado do bagaço de uva, a *bagaceira* (LIMA, 2001). Com o descobrimento do Brasil, Portugal trouxe a cana-de-açúcar, originária da Ásia Meridional entre 1532 e 1548. A história da cachaça confunde-se então com a própria história do Brasil, sendo produzida como uma bebida alcoólica resultante dos tachos de melaço, a *garapa azeda* que passou então mais tarde a ser chamada *cagaça* e finalmente *cachaça* (LIMA, 2001) .

A produção de cachaça no Brasil data do início da colonização. Entretanto, as indústrias de cachaça até 1945 eram rurais e rudimentares, não havendo padrões de qualidade. A produção doméstica aumentou bastante e desde então o processo de produção vem sendo aperfeiçoado e melhorado, o que tem acarretado melhorias no rendimento, produtividade e qualidade do produto final (PATARO *et al.*, 2002).

Atualmente a produção artesanal de cachaça de alambique tem sido destaque na economia do estado de Minas Gerais. A produção de cachaça de alambique, mesmo registrando um alto grau de clandestinidade, desempenha importante papel na estruturação da economia agro-industrial do Estado. São 8.466 estabelecimentos

produtores, que, combinando a produção da cachaça com atividades agropecuárias, empregam, direta e indiretamente, cerca de 240.000 pessoas e geram uma renda anual total estimada de R\$ 1,5 bilhão, em toda a cadeia. Da produção do Estado, 43% são oriundas de estabelecimentos registrados, contra 57% de clandestinos. A produção de cachaça no estado de Minas Gerais é da ordem de 230 milhões de litros/safra, representando perto de 18% da produção nacional de, de acordo com SEBRAE – MG (2002).

O mercado de cachaça no Brasil tem passado por recentes transformações, configuradas, principalmente, por uma certa elitização do consumo e por uma busca crescente de qualidade. Atualmente, o mercado brasileiro da cachaça movimenta um volume de aproximadamente 1,3 bilhões de litros, o que coloca a bebida como a segunda mais vendida no Brasil, perdendo apenas para a cerveja. Embora a produção nacional seja consumida quase que totalmente no mercado interno, tem se verificado um crescimento acentuado da sua aceitação no mercado internacional, haja visto que hoje ela representa o terceiro destilado mais consumido no mundo (ESTANISLAU *et al.*, 2002).

Assim, o atual estágio de desenvolvimento do mercado da cachaça mostra grande potencial para a exportação, levando-se em consideração a crescente aceitação e a pequena parcela da produção que é destinada ao exterior (ESTANISLAU *et al.*, 2002). Apenas cerca de 1% da produção nacional é exportada, o que no ano de 2002 totalizou 14,8 milhões de litros.

Como conseqüência do aumento da produção, surgiu uma demanda técnica e científica, da cultura da cana-de-açúcar ao engarrafamento da cachaça. Muitos estudos e pesquisas foram feitos na área de fermentação do caldo de cana-de-açúcar e muitos foram os conhecimentos adquiridos quanto à extração do caldo, purificação, fermentação, desinfecção, técnicas de destilação, busca de leveduras apropriadas e selecionadas, e outros parâmetros. Esses estudos contribuíram para o aperfeiçoamento técnico da antiga e rotineira indústria aguardenteira, e seu acervo foi muito importante quando a indústria de álcool etílico no Brasil foi solicitada a incrementar suas atividades com a finalidade de produzir etanol como combustível líquido alternativo (LIMA, 2001).

Motivadas pela expansão do consumo, têm-se percebido ações voltadas no sentido de tornar a atividade mais eficiente e articulada, uma vez que historicamente ela se caracteriza como bastante pulverizada e com elevado índice de informalidade. Destas iniciativas, temos o Programa Brasileiro de Desenvolvimento de Aguardente de Cana (PBDAC), o Programa Especial de Exportações (PEE), o Programa dos Novos Pólos para Exportação (PNPE) e a Rede Mineira de Tecnologia da Cachaça (RTMC).

Embora o objetivo final seja a inserção no mercado através da qualidade do produto final, esforços têm que ser dispensados desde a obtenção da matéria-prima, passando por todas as etapas do processamento, até chegar à comercialização (ESTANISLAU *et al.*, 2002).

## 2.1. Conceituação

As aguardentes são obtidas por destilação de um líquido que contém álcool etílico em sua composição. De maneira geral, o conteúdo de álcool deriva da fermentação de açúcares contidos na matéria-prima. O teor de álcool das aguardentes varia de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento v/v (volume por volume) a temperatura de vinte graus Celsius. Nesta operação, inevitavelmente, são destiladas algumas substâncias que acompanham o álcool e que são chamadas de impurezas ou impurezas voláteis. Elas contribuem para conferir ao destilado diferentes características de aroma e sabor, que são modificadas ou intensificadas pela maturação, ou envelhecimento em tonéis de madeira, sob condições adequadas (LIMA, 2001).

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil, bebida fermento-destilada com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento v/v (volume por volume) à temperatura de vinte graus Celsius obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose (BRASIL, 2005).

Na TABELA 1, são mostrados a composição típica da cachaça (coeficiente de congêneres) segundo o novo Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para aguardente de cana e para cachaça:

**TABELA 1 – Composição Típica da cachaça pela legislação brasileira**

| Composto   | Limite máximo                 |
|--|-------------------------------|
| Teor alcoólico   | 38 a 48 % etanol v/v          |
| Ésteres em acetato de etila  | 200 mg/100mL de álcool anidro |
| Acidez volátil em ácido acético  | 150 mg/100mL de álcool anidro |
| Aldeídos em aldeído acético  | 30 mg/100mL de álcool anidro  |
| Furfural e Hidroximetilfurfural  | 5 mg/100mL de álcool anidro   |
| Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil -1- butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1- propanol), | 360mg/100mL de álcool anidro  |

Fonte: BRASIL, 2005

Segundo este Regulamento Técnico são fixados limites máximos para Contaminantes Orgânicos e Inorgânicos, mostrados na TABELA 2, a seguir.

**TABELA 2 - Limites máximos para contaminantes orgânicos e inorgânicos**

| Contaminantes Orgânicos         | Limite máximo                    |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Álcool metílico                 | 20,0 mg/100 mL de álcool anidro. |
| Carbamato de etila              | 150µg/L                          |
| Acroleína (2-propenal)          | 5mg/100mL de álcool anidro       |
| Álcool sec-butílico (2-butanol) | 10mg/100mL de álcool anidro      |
| Álcool n-butílico (1-butanol)   | 3mg/100mL                        |
| Contaminantes Inorgânicos       | Limite máximo                    |
| Cobre (Cu)                      | 5mg/L                            |
| Chumbo (Pb)                     | 200µg/L                          |
| Arsênio (As)                    | 100µg/L                          |

Fonte: BRASIL, 2005

## 2.2. Produção de cachaça

Do ponto de vista biológico, o processo para fabricação de cachaça de alambique constitui-se de duas etapas principais, do ponto de vista biológico: na primeira é preparado o inóculo, chamado também pé-de-cuba. Nesta etapa, basicamente os

microrganismos são multiplicados em condições apropriadas, para garantir o desenvolvimento adequado da segunda etapa, que corresponde à conversão de açúcar em álcool e gás carbônico, fase que é chamada fermentação (PATARO *et al.*, 2002).

A fermentação é a segunda e principal etapa do processo de produção de cachaça. Nesta etapa o açúcar e outros compostos presentes no mosto são transformados em etanol, CO<sub>2</sub> e outros produtos que são responsáveis pela qualidade e defeitos do produto. As fermentações são conduzidas em recipientes próprios denominados dornas (JANZANTTI, 2004).

O processo mais utilizado por produtores de cachaça de alambique é o de batelada simples com reciclagem de inóculo. Este método consiste na incubação de uma dorna com o pé de cuba. Quando a fermentação atinge um estado apropriado (formação de bolhas) passa-se metade do conteúdo para uma dorna vazia (corte de dorna). Em seguida, completa-se o volume das duas com o caldo a ser fermentado (PATARO *et al.*, 2002).

A FIGURA 1 a seguir, mostra o fluxograma da produção da cachaça. A cana-de-açúcar após moída e separado o bagaço, é submetida à uma filtração, por passagem em peneiras, ou decantado para separação do bagacilho. O caldo pronto para fermentar é denominado mosto, é colocado para fermentar na presença do fermento, normalmente o “pé-de-cuba”. Após terminada a fermentação do mosto, o caldo é chamado de vinho, que após sedimentado é destilado. Durante a destilação, são separadas frações de cabeça e cauda, onde a cachaça é a fração chamada de coração. A bebida então pode ser envelhecida, ou engarrafada logo a seguir da produção (LIMA, 2001; MAIA *et al.*, 1995).

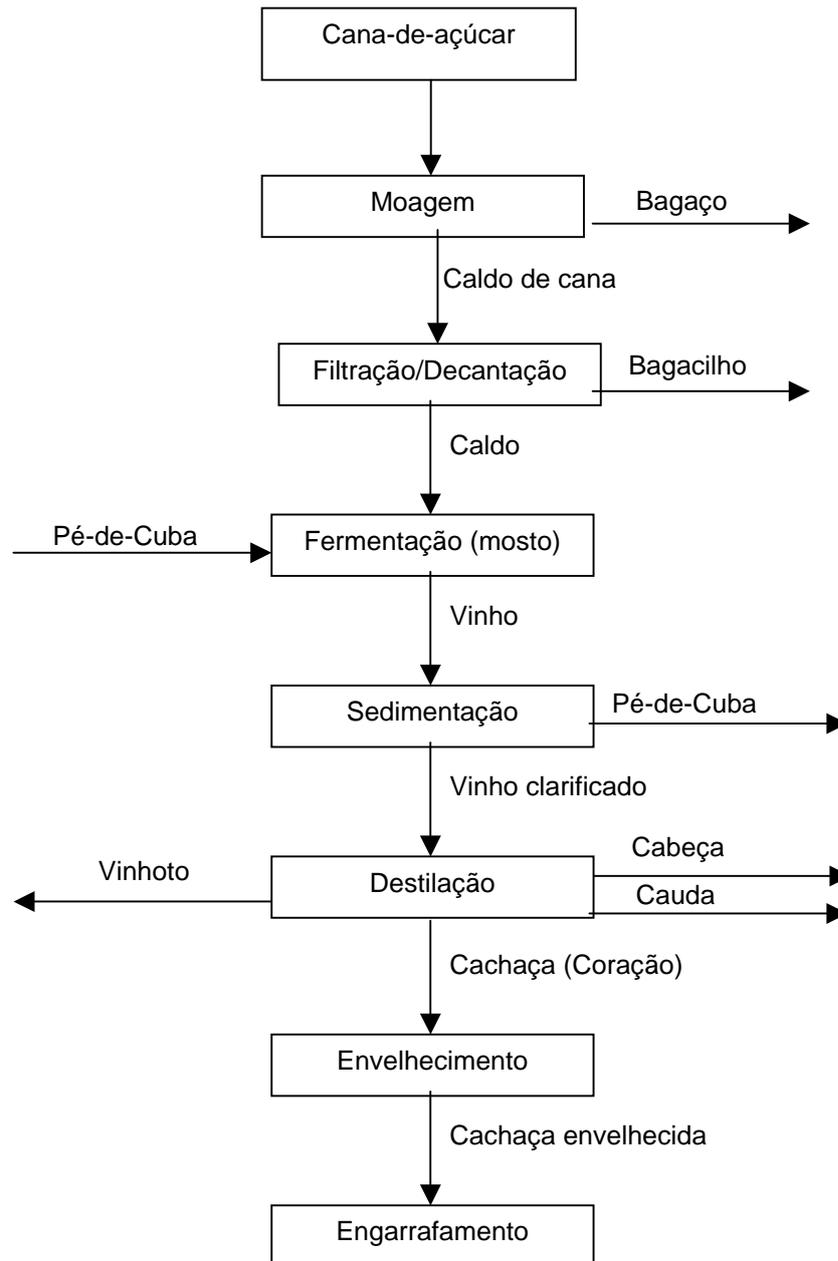


FIGURA 1 – Fluxograma da produção de cachaça.

### 2.2.1. Matéria-prima:

A matéria-prima para a fabricação da cachaça é a cana-de-açúcar. No Brasil normalmente é feita uma seleção, dentre as variedades existentes para produção de açúcar e álcool, tentando-se obter as que possam ser utilizadas na produção de cachaça de alambique (ANDRADE *et al.*, 2002).

A escolha das variedades produtoras de cana-de-açúcar em Minas Geras tem sido feita levando em consideração o período médio de maturação das variedades, condições climáticas e de solo (SILVEIRA *et al.*, 2002). As variedades devem ser adaptadas às condições climáticas da região onde se encontra instalada a unidade industrial, com a finalidade de apresentar elevada produtividade de açúcar por área (NOVAES, 1995 citado por JERONIMO, 2004).

### 2.2.2. Extração do caldo

A extração do caldo de cana-de-açúcar é feita por esmagamento direto nas moendas, cuja capacidade vai variar de acordo com a capacidade de processamento da fábrica. O maior ou menor rendimento em cachaça está ligado à eficiência na extração do caldo (LIMA, 2001).

Tecnologicamente, todo líquido susceptível de fermentar é denominado mosto. Após moagem, o caldo de cana-de-açúcar é filtrado e clarificado por decantação, que retira parte das impurezas em suspensão. O caldo obtido pela moagem da cana-de-açúcar é constituído de água entre 78% e 86%, sacarose entre 11% e 18%, açúcares redutores entre 0,2% e 1,0%, cinzas entre 0,3% e 0,5% e compostos nitrogenados entre 0,5% e 1,0% (LIMA, 2001). O caldo de cana-de-açúcar a ser fermentado apresenta normalmente valores de pH entre 5,2 e 5,8. Os compostos orgânicos não açúcares são constituídos de substâncias nitrogenadas (proteínas, aminoácidos, etc.), gorduras, ceras, pectinas, ácidos (málico, succínico, etc.), e de matérias corantes (clorofila, sacaretina e antocianina). Os não açúcares inorgânicos, representados pelas cinzas, têm como componentes principais: sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio, cloro e outros (STUPIELLO, 1987, citado por JERONIMO, 2004).

### 2.2.3. Fermentação

A fermentação ideal ocorre com o caldo de cana-de-açúcar numa concentração de açúcar em torno de 14 a 16 °Brix. Teores de açúcar acima de 16 °Brix podem acarretar fermentações mais lentas e freqüentemente incompletas (PATARO *et al.*, 2002). Segundo OLIVEIRA & MAGALHÃES (2002), deve-se diluir o caldo de cana-de-açúcar para uma concentração de sólidos solúveis totais entre 12 e 16 °Brix.

A fermentação descontínua é também conhecida por fermentação por batelada ou processo descontínuo de fermentação. Tem a característica principal de no instante inicial o mosto é inoculado com microrganismos e incubado, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado (CARVALHO & SATO, 2001).

O processo é definido como fermentação descontínua alimentada é uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. A adição de mosto pode ser contínua ou intermitente (CARVALHO & SATO, 2001).

A duração média de um processo fermentativo é de 24 horas. Em geral, a fermentação é conduzida pelo sistema convencional em batelada e consiste em se colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado na dorna de fermentação (PATARO *et al.*, 2002). O processo fermentativo inicia logo que a levedura entra em contato com o mosto e é dividido em três fases: fase preliminar ou pré-fermentação, caracterizada pela adaptação das leveduras e multiplicação celular; fase de fermentação principal e tumultuosa, com desprendimento abundante de gás e produção de álcool e fase de fermentação complementar ou pós fermentação, onde se observa redução da atividade fermentativa (JANZANTTI, 2004).

Dentre os metabólitos secretados pelas leveduras, o etanol é produzido em maior quantidade (SILVA, 2003). Apesar disso, é normal que uma pequena percentagem seja convertida em outros produtos. Estes incluem glicerol, ácidos orgânicos (como succínico, acético, láctico, butírico, etc.), álcoois superiores (amílico, isoamílico, butírico, isobutírico, propílico e isopropílico), aldeídos, ésteres, entre outros compostos voláteis (JANZANTTI, 2004)

### 2.3. Propagação do Fermento:

#### 2.3.1. Leveduras utilizadas na produção de cachaça

As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas geralmente são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Nas fermentações espontâneas, um grande número de espécies podem estar envolvidas, com predominância de *S. cerevisiae* (REED & NAGODAWITHANA, 1991; PATARO, 2000). Segundo ALVES (1994), a viabilidade celular é extremamente importante para o desenvolvimento do processo fermentativo e a

tolerância da levedura ao produto da fermentação (etanol) é determinante na produtividade em álcool de fermentações em escala industrial.

O inóculo natural, chamado “pé de cuba” é usualmente preparado pelo método conhecido como fermento caipira, que consiste numa mistura de caldo de cana-de-açúcar não diluído, farelo de arroz, farinha de milho ou soja, entre outros cereais, com adição de suco de limão ou laranja azeda para abaixar o pH. São feitas adições diárias de caldo de cana-de-açúcar no período de cinco a sete dias (LIMA, 1983; RIBEIRO, 2002), quando as leveduras estão se reproduzindo e o volume de massa celular está aumentado. Desta forma, o inóculo é obtido a partir da fermentação espontânea do caldo por microrganismos selvagens presentes no caldo da cana-de-açúcar, nos equipamentos e nas dornas de fermentação.

A utilização de leveduras selecionadas tem sido pesquisada, visando um aumento da produtividade, vantagens tecnológicas e melhoria das características sensoriais da cachaça (PATARO *et al.*, 2000; GUERRA *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2001). Segundo MORAIS *et al.* (1997) foi observado que durante a multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para produção de aguardente de cana artesanal, a qual varia de 12 a 48 horas, há uma sucessão de espécies de leveduras, sendo a espécie predominante *S. cerevisiae*. *Candida sake*, *Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilum* e leveduras apiculadas também são freqüentes.

Nas grandes destilarias brasileiras de álcool e mesmo em pequenas fábricas, já é comum o uso de fermentos selecionados no início da safra, mas ainda há um grande número de fábricas que trabalha com leveduras de panificação, prensadas, e com fermentos naturais. Ao longo dos ciclos de fermentação, que dura normalmente entre 20 a 24 horas, o caldo de cana-de-açúcar vai sendo lentamente “contaminado” pelas leveduras indígenas, que se sobrepõe e dominam o processo fermentativo. Isso ocorre em qualquer região do país, com predominância de microrganismos adaptados às condições locais (LIMA, 2001). Observa-se que de uma forma geral, *S. cerevisiae* prevalece nas fermentações, em fermentações espontâneas ou conduzidas (FIALHO, 2000; SCHWAN *et al.*, 2001).

## 2.3.2. Fatores que influenciam diretamente na propagação do fermento

### 2.3.2.1. Aeração e agitação

Para preparação de culturas “starter” (ou inóculo) e no controle da fermentação alcoólica, é importante considerar a função do oxigênio no controle do metabolismo e crescimento da levedura. Quando o oxigênio está disponível, o metabolismo da levedura direciona para a respiração, rendendo teoricamente 38 moles de ATP para cada mol de glicose, desta forma, permitindo uma maior velocidade de crescimento, maior produção de biomassa, e a síntese de materiais de reserva, como esteróis e ácidos graxos. Desta forma, a aeração é usada na preparação de culturas “starter” quando uma quantidade maior de biomassa é requerida (HENICK-KLING, 1988).

Segundo AIBA *et al.* (1973), os propósitos da aeração e agitação em fermentação são, primeiramente, fornecer oxigênio aos microrganismos, e agitar o caldo de fermentação de forma que uma suspensão uniforme de microrganismos esteja dispersa no meio. Muitos fermentadores são equipados com agitação mecânica do meio de cultura para desintegrar as bolhas de ar e intensificar a turbulência dos líquidos, mas fermentadores desprovidos de agitadores mecânicos também são usados.

Segundo SCHMIDELL (2001), um cultivo que seja altamente eficiente, ocorre com elevadas velocidades de crescimento celular, significa altas velocidades de consumo da fonte de carbono, a fim de que haja abundância de elétrons transportados na cadeia respiratória (geração de ATP), mas significa também, obrigatoriamente, a necessidade da existência de oxigênio dissolvido, a fim de que estes elétrons sejam drenados ao final desta cadeia.

Ainda segundo este mesmo autor, a situação é distinta para o oxigênio, pois este elemento é muito pouco solúvel em água. De fato, a concentração de oxigênio dissolvido na saturação é apenas da ordem de 7 mg O<sub>2</sub>/L (ou 7ppm), ao se borbulhar ar atmosférico a pressão de 1 atm e a 35 °C. Por esta razão é que se costuma afirmar que a extensão de um processo descontínuo aeróbio e, por conseguinte, a obtenção de elevadas concentrações do produto desejado, depende enormemente da capacidade de se transferir o O<sub>2</sub> para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular pode ser elevada. Em outras palavras, pode-se ter situações em que a capacidade de transferência de oxigênio é que ditará as condições de operação.

Formas menos eficientes, em termos de transferência de oxigênio, podem ser interessantes sob outros aspectos, como, por exemplo, a de submeterem as células a um menor cisalhamento. Deve-se lembrar também que sempre se fermenta soluções de nutrientes, o que significa a presença de muitas substâncias dissolvidas, as quais, no cômputo final, reduzem a concentração de oxigênio em relação ao valor observado para a água (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

#### 2.3.2.2. Temperatura

PATARO *et al.* (1998) estudaram as características da fisiologia de crescimento de 210 linhagens de leveduras isoladas de um alambique de cachaça de alambique do estado de Minas Gerais. A maioria das linhagens foi fisiologicamente adaptada às condições ambientais observadas nas dornas de fermentação. Elas foram capazes de crescer a 35 °C, em meio contendo até 25% de glicose e em concentração de 5 % (v/v) de etanol.

A temperatura ótima para a fermentação é de 5-10 °C acima do ótimo para o crescimento da levedura, que encontra-se na faixa de 25-30 °C (JONES *et al.*, 1981; WATSON, 1987). ALVES (1994) ressalta que estas considerações não condizem com o fato de que nas regiões tropicais a temperatura do processo facilmente atinge 40 °C. STUPIELLO & HORII (1981) afirmam que a reprodução de células pode ocorrer até a temperatura da ordem de 38 °C, havendo inibição da multiplicação a 40 °C e na presença de 8 a 9 % v/v de etanol.

#### 2.3.2.3. Requerimentos para o crescimento e composição química do mosto

É importante observar que as condições de cultivo que proporcionem o máximo de crescimento celular podem não ser necessariamente aquelas que proporcionem o máximo de rendimento de algum produto do metabolismo (AIBA *et al.*, 1973). Sabe-se que metabolicamente as leveduras são predominantemente anaeróbias facultativas, sendo capazes de crescer tanto na ausência de ar (fermentação) como na sua presença (respiração ou metabolismo oxidativo). A presença do oxigênio molecular, como ocorre na aeração, induz a mudança no metabolismo energético de fermentação para respiração (REED & PEPPLER, 1973).

A célula de levedura possui compartimentações para adequação da atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria (BASSO *et al.*, 1996). Observa-se que, quando os microrganismos são capazes de crescer em ambas as

situações (aerobiose/anaerobiose), um substrato que é metabolizado aerobiamente ocasiona um crescimento celular muito maior quando comparado ao substrato metabolizado anaerobiamente (AIBA *et al.*, 1973).

Na verdade, poucas espécies são capazes de crescer mais rapidamente sob estas condições, e *S. cerevisiae* se sobressai como leveduras geralmente conhecidas como anaeróbias facultativas. É comumente aceito que anaeróbios facultativos têm a habilidade de crescer sob ambas as condições de aerobiose ou anaerobiose usando, respectivamente, oxigênio molecular ou outro composto como aceptor final de elétrons ou redutores equivalentes vindos do processo anabólico (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Segundo REED & NAGODAWITHANA (1991), muitos autores têm demonstrado a relação entre a composição da biomassa das leveduras e a quantidade dos vários nutrientes requeridos para alcançar esta composição. A composição de leveduras *S. cerevisiae* de fermento prensado para panificação é mostrada na TABELA 3, a seguir.

**TABELA 3: Composição de leveduras de fermento prensado**

| Componente       | % em base seca |
|------------------|----------------|
| Proteína         | 47             |
| Carboidratos     | 33             |
| Minerais         | 8              |
| Ácidos Nucléicos | 8              |
| Lipídeos         | 4              |

Fonte: REED & NAGODAWITHANA (1991)

PULZATTO (2000) comenta que a composição química da levedura é amplamente afetada pelas condições químicas e físicas do meio de crescimento, mas podem ser resumidas como tendo alto teor de proteína, alto conteúdo de ácidos nucleicos, baixo conteúdo de lipídeos, alto conteúdo de cinzas, conteúdo moderado de carboidratos e alto conteúdo de vitaminas.

#### 2.3.2.3.1. Fonte de Carbono

OURA (1974) afirma que a presença do oxigênio não significa necessariamente que o metabolismo é de fato aeróbio. A concentração de glicose no meio tem provado ter uma importante função regulativa no metabolismo. A concentração de açúcar no caldo de cana-de-açúcar deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira está relacionada com a propagação de *S.cerevisiae* que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja superior a 2-3% (p/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é

indispensável para um crescimento eficiente. A segunda etapa está relacionada com a fermentação propriamente dita, ou seja, a conversão de açúcar em etanol e CO<sub>2</sub>. Nesta etapa, o teor médio de açúcar tolerado pela levedura é em torno de 15% (p/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo (MAIA *et al.*, 1992; SCHWAN & CASTRO, 2001).

MAIA (2002) comenta que em cultura aeróbia, o próprio substrato é reconhecido com agente regulador do metabolismo da glicose. O efeito Crabtree é descrito como o efeito repressor da atividade respiratória pela glicose livre. Assim, *S cerevisiae* seria “sensível” à glicose, pois em concentrações de 100 a 200 mg/L já é iniciada a fermentação. Segundo REED & PEPPLER (1973) esta repressão ocorre na concentração de 0,2 % p/v, e esta é a razão para se conduzir fermentações em batelada alimentada. O açúcar deve ser alimentado continuamente à uma taxa lenta para que possa ser consumido continuamente e não ultrapasse a concentração crítica.

Segundo PRESCOTT & DUNN (1959) a concentração de açúcar é mantida baixa no tanque de propagação com o objetivo de favorecer a utilização do açúcar para a produção de células ao invés da produção de etanol. A concentração usual de açúcar no propagador varia entre 0,5 a 1,5% p/v, dependendo do processo.

Devido à formação de etanol diminuir o rendimento em biomassa, é necessário controlar a taxa de alimentação de açúcar no propagador para minimizar a produção de etanol. Desta forma, a concentração de açúcar é o parâmetro principal para efetiva produção de massa celular de levedura (MISKIEWICZ & KASPERSKI, 2000).

#### 2.3.2.3.2. Fonte de Nitrogênio

As leveduras geralmente podem sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias para seu crescimento celular a partir do íon amônio. O crescimento é acelerado quando estão disponíveis no meio de crescimento “unidades de construção”, como aminoácidos, para a síntese de enzimas celulares e componentes estruturais (HENICK-KLING, 1988). No entanto, ALVES (1994) comenta que a utilização de sulfato de amônio como fonte nitrogenada resulta em maior acidez do meio, que embora possa favorecer o controle da contaminação bacteriana (e conseqüente redução da formação de ácidos láctico e acético), causa estresse à levedura, diminuindo a viabilidade e multiplicação.

Pode-se usar suplementação com amônio ou sais de amônio, mas segundo AIBA *et al.* (1973), o crescimento é mais rápido quando se usa nitrogênio orgânico. PULZATTO

(2000) constatou que a produção específica de células de levedura ( $Y_{x/s}$ ) aumentou linearmente com o aumento do nitrogênio protéico no meio de fermentação sintético.

A reprodução de *S. cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, e dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta mais significativa. A levedura não assimila instantaneamente o nitrogênio quando adicionado na forma de uréia (46% de N) ou sulfato de amônio (21% de N) (PINOTTI, 1991).

Visando verificar a influência da adição de nitrogênio protéico na fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça, JERÔNIMO (2004) testou o uso de três diferentes fontes de nitrogênio protéico, dentre elas, um isolado protéico de soja (denominado comercialmente de SUPRO 780 – anteriormente denominado Samprosoy 90 LH produzido pela Bunge Alimentos), obtendo uma boa multiplicação e viabilidade da levedura, propiciando assim, melhor qualidade no fermento reciclado. Neste experimento, a viabilidade manteve-se elevada até o final do experimento (6 ciclos), e a massa celular produzida também. Segundo esta autora, o nitrogênio protéico original do caldo de cana-de-açúcar foi praticamente todo consumido, o que significa estar em forma assimilável pela levedura. Do ponto de vista nutricional da levedura, os resultados deste trabalho mostram que o N protéico presente no caldo é insuficiente para suprir a nutrição da levedura em fermentação.

#### 2.3.2.3.3. Adição de fubá e farinha de soja ao mosto:

MAIA (1992) propôs que a adição de fubá ao mosto resulta em alguns benefícios ao processo fermentativo, como a adsorção pelo amido de metabólitos secundários da própria fermentação alcoólica, cuja presença no mosto afeta a via glicolítica. Mas CLETO (1997) testou a suplementação do mosto com fubá de milho, não obtendo alterações significativas na viabilidade celular. O autor observou um menor teor de acidez no mosto suplementado com fubá, resultando também numa cachaça com menor acidez total.

Os ácidos graxos insaturados podem ser sintetizados pelas células, sendo indispensáveis para garantir sua viabilidade. Contudo, nas condições da fermentação alcoólica a incorporação de suplementos nutricionais ricos em ácidos graxos insaturados favorece nitidamente a fisiologia das células. Usualmente são empregados farelo de arroz, farinha de soja e o fubá. Dentre estes, o mais rico em ácidos graxos insaturados é a farinha de soja (OLIVEIRA, 1998; MAIA, RIBEIRO E SILVEIRA, 1995).

#### 2.3.2.3.4. Fonte de Minerais:

As leveduras exigem diversos íons inorgânicos (minerais) em concentrações tanto micro como milimolar para manifestarem ótimos crescimentos e rendimento fermentativo. Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais, ou seja, um desequilíbrio entre os nutrientes minerais provocam alterações metabólicas significativas (BASSO *et al.*, 1996).

Microelementos têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004). Aparentemente, íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase. Todavia, quantidades excessivas destes mesmos íons são tóxicos e podem causar danos às funções às quais se prestam (NELSON, 1999; COHEN *et al.*, 2000 citado por STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004). Em sua revisão, JONES & GREENFIELD (1984) dividem as funções destes íons em duas: enzimática e estrutural. Na função enzimática, alguns íons são o centro catalítico de uma enzima, como um ativador ou estabilizador da função enzimática, ou mantêm controle fisiológico por antagonismo entre ativadores e desativadores. Dentre estes,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  são comumente centros catalíticos. A função estrutural é desempenhada pelos íons que agem neutralizando forças eletrostáticas presentes nas muitas unidades celulares aniônicas. Na maioria das vezes,  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  são encontrados em polifosfatos, RNA, DNA e proteínas. Segundo LIMA (2001), a adição de sais minerais é vantajosa para corrigir deficiências que o caldo normalmente apresenta. De um modo geral, a adição não é feita em todo o volume do mosto, mas nos “pés de cuba”, ou periodicamente, nas dornas de fermentação.

A composição elementar de uma célula microbiana depende de muitos fatores, como condições de cultivo, espécie do microorganismo, e até mesmo do substrato utilizado para seu crescimento (CARVALHO & SATO, 2001). Zinco, cobre e manganês são muito interessantes devido ao efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento de *S. cerevisiae* (JONES & GADD, 1990, citados por STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004).

Segundo AIBA *et al.* (1973), fósforo, potássio enxofre e magnésio são os minerais mais encontrados na composição de microrganismos, e estes e outros elementos presentes em quantidades significativas devem ser suplementados ao meio de cultura. A seguir, são mostrados na TABELA 4 os constituintes inorgânicos de leveduras, segundo

estes autores e uma comparação com a composição descrita em REED & NAGODAWITHANA (1991).

**TABELA 4: Constituintes inorgânicos das leveduras**

| Elementos<br>(g/100g peso seco) | AIBA <i>et al.</i><br>(1973) | REED AND NAGODAWITHANA<br>(1991) |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Fósforo                         | 0,8 – 2,6                    | 1,35                             |
| Enxofre                         | 0,01 – 0,24                  | 0,39                             |
| Potássio                        | 1,0 – 4,0                    | 2,1                              |
| Magnésio                        | 0,1 – 0,5                    | 0,165                            |
| Sódio                           | 0,01 – 0,1                   | 0,012                            |
| Cálcio                          | 0,1 – 0,3                    | 0,075                            |
| Ferro                           | 0,01 – 0,5                   | 0,002                            |
| Zinco                           |                              | 0,017                            |
| Cobre                           | 0,002 – 0,01                 | 0,0008                           |
| Manganês                        | 0,0005 – 0,007               | 0,000002                         |
| Molibdênio                      | 0,0001 – 0,0002              | 0,00004                          |
| Total de Minerais               | 5 - 10                       |                                  |

- Zinco

Segundo STEHLIK-TOMAS *et al.* (2004), o zinco, na sua forma biologicamente mais relevante (íons  $Zn^{2+}$ ) é essencial como cofator catalítico em várias enzimas, inclusive álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, anidrase carbônica e várias carboxipeptidases, não sendo substituído por nenhum outro íon em suas funções (JONES & GREENFIELD, 1984). Tem sido apontado que a presença de íons  $Zn^{2+}$  em quantidades de 5-15  $\mu M$  no meio nutriente otimizam o fator de crescimento de células de levedura, assim como a produção de etanol. De forma oposta, sua deficiência paralisa o crescimento celular e atividade fermentativa. Todavia, altas concentrações de zinco no meio de crescimento podem ser tóxicas, uma vez que o zinco afeta a permeabilidade das membranas ao potássio, causando um efeito antagonista no crescimento e fermentação (JONES & GADD, 1990; LIU *et al.*, 1997, citados por STEHLIK-TOMAS *et al.* (2004).

- Cobre

O cobre também é um cátion divalente vital para células de leveduras, agindo como cofator de algumas enzimas como citocromo c-oxidase, lactase e Cu-Zn superóxido dismutase (STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004). A concentração ótima no meio nutritivo para crescimento da levedura e atividade fermentativa está na faixa de 1-10  $\mu M$ . Segundo JONES & GREENFIELD (1984), a concentração de 10  $\mu M$  já pode inibir o crescimento, estando a concentração ótima entre 1-1,5  $\mu M$ .

- Manganês

Segundo JONES & GADD (1990) e LIU *et al.* (1997), citados por STEHLIK-TOMAS *et al.* (2004), células de levedura requerem manganês como um elemento traço essencial a uma concentração de 2-10  $\mu\text{M}$  para otimizar o crescimento. O manganês tem uma função importante no metabolismo de *S. cerevisiae* como parte de algumas enzimas, por exemplo, piruvato descarboxilase. Segundo JONES & GREENFIELD (1984), manganês na concentração de 7  $\mu\text{M}$  estimula os efeitos do Zn.

STEHLIK-TOMAS *et al.* (2004) conduziram um experimento visando estudar a incorporação de alguns microelementos a células de *S. cerevisiae* e o impacto no estado fisiológico das células. A adição de 0,1 g/L de cada um dos sais  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$  aumentou o rendimento em biomassa celular em 30% em condições semiaeróbias. Em condições de anaerobiose, o rendimento de biomassa aumentou 10%, e a produção de álcool aumentou 20%.

- Ferro:

JONES & GREENFIELD (1984) citam que a presença de ferro na concentração de 1 a 3  $\mu\text{M}$  parece ser a concentração ótima para o crescimento. Apenas pequenas concentrações deste íon são requeridas na função de heme-enzimas. Apesar disso, segundo estes autores, não tem sido reportados efeitos sobre o fator  $Y_{x/s}$ . BACH *et al.* (1978) utilizaram 0,01g/100 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  em meio de cultivo aeróbio de *S. cerevisiae*. AIBA (1976) e OURA (1974) utilizaram 0,03 g/100mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  em cultivos em batelada alimentada desta mesma levedura, ambos obtiveram resultados de  $Y_{x/s}$  acima de 0,5.

### 2.3.3. Parâmetros Cinéticos

Segundo HISS (2001), o estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes, o microrganismo (ou biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõe o meio de cultura.

O perfil cinético representa o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação, sem o conhecimento cinético torna-se inviável a transposição de um experimento para a escala industrial. Afirmar que certa composição do mosto, por

exemplo, é melhor do que a outra, equivale a dizer que um fator de conversão (substrato em células, por exemplo) é maior no primeiro caso.

#### 2.3.4. Propagadores

Modernos biorreatores na forma de fermentadores são usados em produção em larga escala de produtos farmacêuticos e na indústria de alimentos, para produtos de fermentação (COONEY, 1983). Vários autores reportam trabalhos onde biorreatores são desenvolvidos e utilizados (RECH *et al.*, 2002; SCHIMIDELL, 2001; STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004; OURA, 1974) como forma de minimizar custos otimizando resultados, seja em produto ou massa celular.

A utilização de um biorreator com a função de propagar o fermento para a produção de cachaça permitiria a otimização do processo de produção de fermento. Quase a totalidade dos produtores de cachaça ainda efetua a propagação do fermento em recipientes improvisados ou dentro da própria dorna de fermentação. Nestas condições, a reprodução do fermento é mais lenta e muito mais suscetível a contaminações. O ideal é dispor-se de um equipamento especialmente destinado à propagação do fermento, onde se propiciem condições ótimas para as leveduras desejáveis e certo nível de proteção contra microrganismos invasores. Além disso, o propagador é indispensável para assegurar bons resultados no emprego de leveduras selecionadas (MAIA, 2002).

#### 2.3.5. Estratégias utilizadas para aprimorar a performance dos meios de fermentação

Diversos autores empregam numerosas técnicas para produção de biomassa, ou produtos produzidos por biotecnologia. Dentre vários, RECH *et al.* (2002), FERRARI *et al.* (2001), MISKIEWICZ & KASPERSKI (2000), e AIBA *et al.* (1976) utilizaram estratégias semelhantes às utilizadas neste trabalho.

Muitas técnicas são empregadas no desenvolvimento de fermentações industriais, sendo a composição do meio de importância crítica, que pode afetar a concentração do produto, rendimento e a produtividade volumétrica (KENNEDY & KROUSE, 1999). Dentre estas estratégias, as mais frequentemente utilizadas foram reunidas em um artigo

publicado por estes autores, as técnicas que serviram de suporte ao desenvolvimento da metodologia utilizada neste trabalho estão descritas a seguir.

#### 2.3.5.1. Estratégia aberta:

Define-se um número fixo de componentes a serem testados, na melhor combinação possível. Na estratégia aberta, não se faz um pressuposto de qual seriam os melhores componentes.

#### 2.3.5.2. Utilização dos resultados de testes conduzidos em *shaker* (equipamentos incubadores dotados de agitação constante):

Alguns autores assumem que o melhor meio escolhido dos testes em *shaker* vão ser os meios com melhores resultados posteriormente, em biorreatores.

#### 2.3.5.3. Aperfeiçoamento de meios já descritos na literatura:

Para crescimento de microrganismos de mesmas espécies ou gêneros já relatados na literatura científica, utiliza-se ou adapta-se meios previamente testados, também já descritos.

#### 2.3.5.4. Troca de componentes:

Utiliza-se uma composição de meio como padrão e troca-se um componente por vez, como por exemplo, a fonte de nitrogênio ou carbono. Desta forma, é possível avaliar especificamente a influência daquele componente.

#### 2.3.5.5. “Cópia” biológica:

Baseia-se no conceito que a célula vai crescer melhor no meio que contenha todos os componentes que ela precise nas proporções corretas. Utiliza-se a composição da célula, índices de rendimento celular, entre outros, para calcular quantos componentes terá o meio de cultura e sua concentração. WANG *et al.* (1979), citado por CARVALHO & SATO (2001), sugerem que a formação de um meio de cultivo leva em conta a composição celular, o requerimento energético e a necessidade de substâncias específicas.

### 3 .MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Leveduras

No primeiro teste exploratório foi utilizado o fermento seco liofilizado, composto por células de *S. cerevisiae*. Nos demais testes, foi utilizado o fermento comercial prensado fresco, marca Itaiquara, também constituído de células de *S. cerevisiae*., contendo 30-31% de massa seca. Antes da utilização, o fermento foi submetido ao teste de viabilidade celular.

Apenas no Teste 09 foi utilizada, para fins de comparação, uma linhagem selecionada de *S. cerevisiae* (Sc 19), da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Industrial da Faculdade de Farmácia/UFMG, isolada de uma unidade produtora de cachaça de alambique, do estado de Minas Gerais por OLIVEIRA (2002). A linhagem de levedura foi armazenada sob refrigeração em ágar GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5 %, extrato de malte 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2% e ágar 2% e coberta com óleo mineral. Antes do uso esta levedura foi pré ativada no mesmo ágar GYMP, a 30 °C por 24 horas, e em seguida crescida em meio PDA (ágar batata) a 30 °C por 24 horas. As células de leveduras foram ressuspensas em água destilada estéril antes de serem inoculadas.

##### 3.1.2. Propagadores

Foram utilizados três diferentes modelos de propagadores com aeração, aqui descritos como Modelos A, B e C. Os propagadores testados neste trabalho podem ser definidos como reatores agitados pneumaticamente, que se caracterizam basicamente pela ausência de agitador mecânico. Resultam neste tipo de reator menores tensões de cisalhamento (SCHMIDELL & FACCIOTI, 2001). Segundo estes autores, os modelos testados neste trabalho seriam do tipo “coluna de bolhas”, onde tem-se um movimento aleatório do líquido dentro do reator.

O Modelo A consistiu de um equipamento de aço inox, cilíndrico, com capacidade aproximada de 20 L, base com 20 cm de diâmetro e altura de 66 cm. A aeração foi feita através de injeção de ar comprimido, por cinco bicos porosos (vela sinterizada) presos na base do propagador, como mostrado na FIGURA 2. Os Testes 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram conduzidos neste equipamento, conforme descrito no item 3.4.1; adiante.

Os Testes 7, 8 e 9 foram realizados em incubadora com agitação orbital (*shaker*), à temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

O Modelo B consistiu de um frasco de vidro de base retangular (base medindo 11x 8 cm, 26 cm de altura), com capacidade para 0,8 L . A aeração foi feita na forma de microbolhas, utilizando-se uma bomba de aquário ligada a dois bicos porosos (vela sinterizada), como mostrado na FIGURA 3. Os Testes 10 e 11 foram conduzidos neste equipamento, conforme descrito no item 3.4.3; adiante.

O Modelo C consistiu de um equipamento cilíndrico de vidro borossilicato, com base em aço inox, de 32 cm de altura e 16 cm de diâmetro, com 5 L de capacidade útil. Este propagador foi construído para cultivo de *S. cerevisiae*. O difusor de ar constituiu-se de uma placa metálica de diâmetro 100 mm, com orifícios na parte superior de 1 mm. Um tubo metálico de diâmetro 12 mm foi soldado à placa na parte inferior e esse tubo foi conectado a uma linha de ar comprimido, de acordo com a FIGURA 4. Os Testes 12, 13, 14, 15 e 16 foram conduzidos neste equipamento, conforme descrito no item 3.4.4; adiante.



2 a



2 b



2 c

FIGURA 2: Propagador A - 2 a: Lateral do propagador; 2 b: Frente do propagador, com entrada p aeração; 2 c: Bicos aeradores.



3 a



3 b

FIGURA 3: Propagador B – 3 a: Foto da montagem do Modelo B; 3 b: Aeração com velas sinterizadas.



4 a



4 b



4 c

FIGURA 4: Propagador C – 4 a: Propagador C; 4 b: Aerador e Válvula de saída; 4 c: Aerador do Propagador C em destaque.

## 3.2. Métodos analíticos

### 3.2.1. Viabilidade celular

Foi determinada utilizando corante azul de metileno, segundo BONNEU *et al.* (1991). As células foram mantidas em contato durante 10 minutos com a solução azul de metileno, em seguida contadas ao microscópio (aumento de 400 X), em câmara de *Neubauer*. As células coradas foram consideradas mortas, as não coradas, vivas.

### 3.2.2. Determinação dos açúcares redutores totais (ART)

Nos testes preliminares foi utilizado refratômetro manual, escala 0-32°Brix.

Para a determinação dos açúcares redutores totais e residuais do mosto e do vinho, foi utilizada a metodologia do DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) de acordo com MILLER (1959). Quando necessário, as amostras eram previamente submetidas à hidrólise ácida da sacarose presente no meio de cultura, com HCl (ácido clorídrico), segundo metodologia descrita por SILVA (2003).

### 3.2.3. Acidez total do mosto e do vinho

Foi determinada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,025 mol/L, segundo ABNT (1997).

### 3.2.4. Dosagem de etanol no vinho

A concentração de etanol foi determinada pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio (ABNT, 1997). O preparo das amostras para dosagem de etanol foi feito conforme descrito por OLIVEIRA (2001). Alíquotas de 25 mL das amostras foram previamente destiladas por arraste de vapor em microdestilador de álcool Tecnal (Modelo TE-012).

### 3.2.5. Determinação de massa seca celular (g de matéria seca/L):

Para esta determinação, uma alíquota da amostra foi centrifugada (caldo fermentado) a 6000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi separado para as outras análises (etanol, acidez, ART) e a massa celular foi ressuspensa em água destilada e centrifugada. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. A matéria seca (biomassa centrifugada) foi determinada por secagem de biomassa das leveduras em estufa a 105 °C, até peso constante.

### 3.2.6. Determinação de pH:

Foi utilizado pHmetro eletrônico digital, marca QUIMIS, modelo Q400A. As amostras foram submetidas à leitura direta no aparelho, depois da calibração do mesmo.

## 3.3. Cálculos dos parâmetros de crescimento celular

### 3.3.1. Fator de conversão de substrato células ( $Y_{x/s}$ )

Expressa a massa celular produzida em relação a massa de ART consumida. Este parâmetro fornece a quantidade de massa celular produzida por grama de açúcar consumido (HISS, 2001 e SILVA, 2003). Fórmula utilizada para o cálculo:

$$Y_{x/s} = \frac{X_F - X_O}{S_T - S_R}$$

Onde:

$S_R$  (g) = massa de substrato residual no meio

$S_T$  (g) = massa de substrato total adicionada ao meio

$X_O$  (g) = massa seca inicial, expressa em g

$X_F$  (g) = massa seca final, expressa em g

### 3.3.2. Fator de conversão de substrato em etanol ( $Y_{p/s}$ )

Expressa a quantidade de etanol formada por unidade de açúcar consumido.

$$Y_{p/s} = \frac{P_F - P_O}{S_T - S_R}$$

Onde:

$P_F$  (g) = massa de etanol final

$P_O$  (g) = massa de etanol inicial

### 3.3.3. Fator de conversão de substrato em acidez ( $Y_{ac/s}$ )

Expressa a quantidade de ácido formada por unidade de açúcar consumido.

$$Y_{p/s} = \frac{Ac_F - Ac_O}{S_T - S_R}$$

$Ac_F$  (g) = massa de ácido final

$Ac_O$  (g) = massa de ácido inicial

### 3.3.4. Aumento de biomassa (em número de vezes)

O aumento de biomassa foi determinado pela quantidade de biomassa formada ( $X_F$ ) em relação àquela inicialmente inoculada ( $X_0$ ), expressa em número de vezes. O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\text{Aumento de biomassa} = \frac{\text{Massa seca final (após a propagação)}}{\text{Massa seca inicial}}$$

### 3.4. Metodologia utilizada nos ensaios de propagação

- Preparo do caldo e inoculação:

Em todos os ensaios, o caldo ou meio de cultivo, de composição variada conforme o teste, foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Depois de resfriado até 25-28 °C, o meio de cultivo foi inoculado, e aerado de forma contínua.

- Adições intermediárias de meio de cultivo:

Durante o período de propagação em batelada alimentada, com exceção dos Testes 8 e 9, foram feitas adições periódicas de meio de cultivo (descritos em cada teste), com o objetivo de manter a concentração de açúcares em torno de 1-2 °Brix (ou 10 a 20 g/L). As adições foram sucessivas, a intervalos de aproximadamente 2 horas, em volumes crescentes. O meio de cultivo adicionado nestes intervalos continha teor de açúcar mais elevado que o mosto inicial (em torno de 10 a 25 g/100 mL, conforme o teste), de modo a adicionar pequenas quantidades que não aumentassem muito o volume final. Por este motivo, foi aqui denominado xarope.

O volume de xarope a ser adicionado foi calculado por balanço de massa, de acordo com o volume de meio contido no propagador e o açúcar residual. O balanço de massa foi calculado da seguinte forma:

$$(S_0 * V_0) + (S_x * V_x) = (V_0 + V_x) * S_F$$

Onde:

$S_R$  = Concentração de açúcar residual no propagador (g/L)

$V_0$  = volume inicial (L)

$S_x$  = Concentração de açúcar no xarope a ser adicionado

$V_0 + V_x$  = Volume final (L)

$S_F$  = Concentração desejada final de açúcar (g/L)

$V_x$  = Volume de xarope

Quando necessário, adicionou-se como antiespumante, dimeticona (em gotas, 75 mg/mL, laboratório Medley).

Todos os testes foram conduzidos em temperatura ambiente, que variou entre 20 e 23 °C. Apenas o teste de número 11 foi realizado em estufa, a 30 °C, e os testes 7, 8 e 9 em incubadora com agitação, a temperatura também controlada de 30 °C.

As particularidades de cada teste serão descritas a seguir.

#### 3.4.1. Ensaio preliminares – cultivos realizados no propagador A

Os ensaios preliminares englobaram os Testes 1 até 6. Dentre os métodos descritos por KENNEDY & KROUSE (1999), o método utilizado nestes testes preliminares foi a estratégia aberta, a fim de conhecer o comportamento da levedura *S. cerevisiae* sob aeração, em meios de crescimento, neste propagador.

A composição dos meios de cultura utilizados nestes experimentos encontram-se na TABELA 5, assim como os meios (xaropes) utilizados nas adições intermediárias se encontram na TABELA 6.

**TABELA 5 - Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios preliminares – Propagador A.**

| Componentes                                     | Concentração g/100 mL |         |         |         |         |         |
|---|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|   | Teste 1               | Teste 2 | Teste 3 | Teste 4 | Teste 5 | Teste 6 |
| Caldo de cana diluído (ART)                     | 1,80*                 | 2,00*   | 1,90    | 2,80    | 0,60    | 1,10    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,38                  | 0,60    | 1,34    | 1,34    | --      | --      |
| Extrato de levedura                             | --                    | --      | --      | --      | 0,90    | 0,90    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | --                    | --      | 0,40    | 0,40    | 0,50    | 0,27    |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | --                    | --      | 0,16    | 0,16    | 0,10    | 0,05    |
| KCl   | --                    | --      | --      | --      | 0,10    | 0,05    |
| Fermento (mx)                                   | 0,12                  | 0,12    | 0,40    | 0,40    | 0,40    | 0,20    |
| Volume inicial de meio ( mL)                    | 5000                  | 5000    | 10000   | 10000   | 3000    | 5600    |

\*Resultados obtidos em °Brix

**TABELA 6 - Composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias das propagações - ensaios preliminares.**

| Componentes                          | Concentração g/100 mL |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                      | Teste 1               | Teste 2 | Teste 3 | Teste 4 | Teste 5 | Teste 6 |
| Caldo de cana diluído (ART)          | 16,00*                | 16,00*  | 22,00   | 23,00   | 18,50   | 20,00   |
| Extrato de levedura                  | 0,38                  | 0,60    | --      | --      | 0,90    | 0,90    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | --                    | --      | --      | --      | 0,50    | 0,60    |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | --                    | --      | --      | --      | 0,10    | 0,10    |
| KCl                                  | --                    | --      | --      | --      | 0,10    | 0,10    |
| Volume adicionado(mL)                | 320                   | 800     | 2830    | 2500    | 330     | 390     |

\*Resultados obtidos em °Brix

#### TESTES 1 e 2

O meio de cultura utilizado nos Testes 1 e 2 foi caldo de cana-de-açúcar diluído, adicionado de sulfato de amônio. O inóculo utilizado foi fermento liofilizado (*S. cerevisiae*). No Teste 2 o fermento úmido prensado (*S. cerevisiae*) foi escolhido em substituição ao liofilizado (Teste 1) por apresentar uma viabilidade inicial maior que o fermento liofilizado granulado. O caldo de cana-de-açúcar foi adicionado de sulfato de amônio (TABELA 5). A concentração de açúcares no meio de propagação foi estimada pelo °Brix, em refratômetro manual. Em ambos os testes, foram feitas adições sucessivas de caldo de cana-de-açúcar a 16 ° Brix, a cada 2 horas.

#### TESTES 3 e 4

Foi adotada a estratégia de aperfeiçoamento de meios de cultivo descritos na literatura (KENNEDY & KROUSE, 1999). Nestas propagações, o caldo de cana-de-açúcar foi suplementado com alguns sais, segundo algumas referências: OURA (1974) utilizou 1,2% p/v de sulfato de amônio no meio, e segundo REED & PEEPLER (1973) o fosfato deve corresponder a 1/3 do sulfato adicionado. Adicionou-se, então, 1,3% p/v de sulfato de amônio, e 0,4% p/v de fosfato diácido de potássio. Os meios de cultura utilizados nos Testes 3 e 4 tiveram a mesma composição, variando apenas a concentração inicial de açúcar.

O consumo de açúcar pela levedura passou então a ser acompanhado por análise de ART (método DNS), uma vez que os sais adicionados interferem na leitura do °Brix pelo refratômetro. Nas primeiras doze horas foram feitas adições de caldo de cana-de-açúcar (a 22 °Brix). Nas quatorze horas restantes, nada foi adicionado ao propagador.

No Teste 4, periodicamente foram retiradas amostras de apenas seis mL, as quais foram centrifugadas em tubos Eppendorf para separação de células e determinação posterior de ART no sobrenadante. Este procedimento reduziu sensivelmente o volume de amostra retirado durante a propagação, em comparação com os testes anteriores (1, 2

e 3), cujos volumes de amostras retiradas foram de aproximadamente 200 mL por intervalo de tempo.

#### TESTE 5

Neste teste a fonte de nitrogênio foi substituída por extrato de levedura ao invés de sulfato de amônio com o objetivo de verificar a sua influência na viabilidade celular. Com o intuito de melhorar a aeração, e conseqüentemente, o crescimento celular, o volume inicial de meio de cultura utilizado nessa propagação foi diminuído de 10 litros (como nos Testes 3 e 4), e 5 litros (Testes 1 e 2) para 3 litros neste teste. A composição do meio de cultura foi corrigida, de acordo com JERÔNIMO (2004), conforme estratégia descrita por KENNEDY & KROUSE, 1999, e mostrado na TABELA 04.

#### TESTE 6

A quantidade de inóculo inicial foi modificada de 0,4 g/100 mL de massa seca para 0,2 g/100 mL de massa seca e a concentração dos sais adicionados foi reduzida. O volume inicial de meio de cultura utilizado neste experimento foi de 5,6 litros.

#### 3.4.2. Testes conduzidos em incubadora com agitação e temperatura controlada (*shaker*)

Os Testes 7, 8 e 9 descritos a seguir, foram conduzidos em incubadora com agitação orbital, a 150 rpm e temperatura controlada a 30 °C, largamente utilizada por pesquisadores para testes em pequena escala, seja com o objetivo de produzir massa celular, ou algum produto metabólico do microrganismo em questão (KENNEDY & KROUSE, 1999). A composição dos meios usados nestes dois testes se encontra na TABELA 7.

No Teste 7, apenas um tipo de meio foi utilizado. No Teste 08, foram preparados e testados 4 diferentes meios de cultivo. No Teste 09, foram utilizadas duas leveduras (*S. cerevisiae*): fermento úmido prensado e cultura pura selecionada (Sc 19).

**TABELA 7 – Composição dos meios de cultura utilizados nas propagações conduzidas em *shaker***

| Componentes                                     | Concentração g/100 mL |         |          |
|---|-----------------------|---------|----------|
|   | Teste 7               | Teste 8 | Teste 9  |
| Caldo de cana diluído (ART)                     | 1,60                  | 3,20    | 11,00(*) |
| pH  | 4,5                   | 4,5     | 6,00     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,20                  | 0,20    | --       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Cl              | --                    | --      | 0,50     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,04                  | 0,04    | 0,10     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,50                  | 0,50    | 0,50     |
| KCl   | 0,05                  | 0,05    | 0,10     |
| Fermento (mx)                                   | 0,40                  | 0,40    | 0,012    |
| Farinha de soja                                 | 0,50                  | ---     | --       |
| Nitrogênio protéico                             | --                    | (**)    | 0,90     |

(\*) Foi utilizada glicose na concentração descrita, ao invés de caldo de cana-de-açúcar diluído.

(\*\*)Foram utilizadas como fontes de nitrogênio protéico:

Meio 1: Extrato de Levedura 0,9 g/100 mL (JERÔNIMO, 2004; OLIVEIRA 2001 e PULZATTO 2000).

Meio 2: Isolado Protéico de Soja 0,4 g/100 mL (produto comercial, fornecido pela Bunge alimentos), segundo JERÔNIMO (2004).

Meio 3: Farinha de Soja 0,5 g/100 mL (segundo MAIA, 1992).

Meio 4: Isolado Protéico de Soja 0,4 g/100 mL + Farinha de Soja 0,5 g/100 mL.

TESTE 09: Extrato de Levedura 0,9 g/100 mL

## TESTE 7

O objetivo deste teste foi verificar se adições periódicas de meio de cultivo, de forma a manter a concentração de açúcares entre 5-20 g/L, melhorariam a conversão de substrato em células e o rendimento em massa celular, em condições controladas de temperatura e agitação. Este experimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos foram inoculados e incubados sob agitação orbital de 150 rpm a 30 °C, por doze horas. Este teste foi conduzido em batelada alimentada, e foram feitas adições de caldo de cana-de-açúcar puro (19,5 °Brix) a cada 2 horas.

Foi escolhido um meio de cultura descrito por MAIA (1992), contendo farinha de soja. A farinha de soja tem seu uso conhecido como suplemento nutricional no início do processo de propagação das leveduras, nos alambiques de cachaça de alambique e em pesquisas com *S. cerevisiae* (OLIVEIRA, 1988; MAIA, 1992; RIBEIRO 2002 ).

## TESTE 8:

No intuito de determinar a melhor fonte de nitrogênio para propagação de *S. cerevisiae*, foi feito um teste com quatro meios de composição base idêntica, e variadas

fontes de nitrogênio, identificados como meio 1, 2, 3, 4. A composição dos meios se encontra descrita na TABELA 07.

Os meios foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos foram inoculados e incubados em incubadora com agitação orbital de 150 rpm, a temperatura controlada de 30 °C por 7 horas. Os testes foram conduzidos em batelada simples, ou seja, não foram feitas adições de meio de cultivo durante a propagação. A cada hora, identificada como tempo 0, 1, 2, 3, e assim sucessivamente, uma amostra de cada meio foi coletada e centrifugada para determinação de massa celular (expressa em g massa seca) e do teor de ART residual.

## TESTE 9

Este teste foi realizado com o objetivo de verificar a influência da concentração inicial do inóculo, a influência do tipo de fermento utilizado e comparar resultados com os obtidos por ALVES *et al.* (2005).

O meio de cultura foi preparado segundo metodologia descrita por OLIVEIRA (2001), com formulação descrita na TABELA 7. Os meios foram distribuídos em frascos de *Erlenmeyer* de 250 mL, cada um contendo 100 mL de meio de cultura. Os frascos foram inoculados e incubados em incubadora com agitação orbital de 150 rpm, a temperatura controlada de 30 °C por 24 horas.

Foram testados dois tipos de leveduras *S. cerevisiae*. O fermento úmido prensado, o mesmo utilizado nos testes anteriores, na concentração de 0,012 g/100 mL e a levedura selecionada Sc 19 (*S. cerevisiae*), testada por ALVES *et al.* (2005) na mesma concentração inicial de 0,012 g/100 mL de inóculo .

### 3.4.3. Testes conduzidos no Propagador B

Este modelo de propagador foi testado devido à sua simplicidade de operação além de possibilitar o trabalho com menores volumes e com temperatura controlada. Para a formulação do meio de cultivo, utilizou-se a estratégia descrita por KENNEDY & KROUSE (1999) onde a composição da célula e o fator de rendimento celular são usados para se calcular a composição do meio. Os componentes e balanceamento do meio foram calculados da seguinte forma:

1º) De acordo com os testes preliminares realizados neste trabalho, calculou-se o volume de açúcar (em g) normalmente consumido pelas leveduras em propagações com 12 horas de duração.

2º) Considerou-se o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) teórico de 0,5 (OURA, 1974) e a partir deste fator, a massa celular teórica que seria obtida.

3º) Tendo como base a composição química de *S. cerevisiae*, descrita por AIBA *et al*, (1973) e REED & NAGODAWITHANA (1991), foi calculada a composição do meio necessária para se obter a massa celular calculada no item 2 acima.

Nestes experimentos foi utilizada a sacarose como fonte de carbono, ao invés do caldo de cana-de-açúcar, para uma melhor padronização do meio. O propagador foi colocado dentro de uma estufa e a temperatura foi mantida a 30 °C. O aerador (bomba de aquário) foi mantido ligado durante todo o tempo das propagações. Na TABELA 8 se encontra a descrição da composição dos meios utilizados nos Testes 10 e 11.

**TABELA 8 - Composição dos meios de cultura utilizados no Propagador B**

| Componentes  | Concentração g/100 mL |          |
|--|-----------------------|----------|
|  | Teste 10              | Teste 11 |
| Sacarose   | 1,00                  | 1,00     |
| Extrato de levedura                                | 0,90                  | 0,90     |
| (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO                 | 0,20                  | --       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Cl                 | ---                   | 0,20     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>    | ---                   | 0,40     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 0,10                  | 0,10     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O               | 0,10                  | 0,05     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | 0,10                  | --       |
| Farinha de soja                                    | 0,30                  | 1,20     |
| Fermento (mx)                                      | 0,40                  | 0,015    |
| Água – q.s.p.                                      | 500 mL                | 500 mL   |

Foram feitas adições de xarope de sacarose, complementado com sais, a cada 2 horas de propagação, dentro das doze primeiras horas do processo. Após as primeiras doze horas os meios de cultivo foram mantidos com a alimentação de ar ligada durante as doze horas seguintes. Na TABELA 9, a seguir, está descrita a composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias dos Testes 10 e 11.

**TABELA 9 - Composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias no Propagador B**

| Componentes                          | Concentração g/100 mL |          |
|--------------------------------------|-----------------------|----------|
|                                      | Teste 10              | Teste 11 |
| Sacarose                             | 10,00                 | 24,00    |
| Extrato de levedura comercial        | --                    | 2,60     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Cl   | --                    | 0,60     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | --                    | 0,30     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | --                    | 0,05     |
| (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO   | 0,70                  | ----     |
| Água – q.s.p.                        | 300 mL                | 220 mL   |

#### TESTE 10:

A fonte de nitrogênio escolhida neste teste foi a uréia ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), por ter mais nitrogênio por grama de peso, quando comparada com o sulfato de amônio. A uréia também não adiciona sulfato ao meio (ao contrário do sulfato de amônio), o que facilita cálculo do balanceamento. OURA (1974) e FERRARI *et al.* (2001) utilizaram uréia na composição dos seus meios de cultura para obtenção de massa celular.

#### TESTE 11

Neste teste, foram feitas modificações no balanceamento do meio de cultura, a uréia foi substituída por duas outras fontes de Nitrogênio, o cloreto de amônio e o sulfato de amônio. Conseqüentemente, outras modificações foram feitas na composição para que o balanceamento não fosse alterado. Novamente, foi adotada a estratégia de aperfeiçoamento de meios, descrita por KENNEDY & KROUSE (1999).

### 3.4.4. Testes conduzidos no Modelo C

Foi utilizado o propagador Modelo C, tipo coluna de bolhas, projetado e construído para o cultivo de leveduras em aerobiose.

**TABELA 10 - Composição dos meios de cultura utilizados no Propagador C**

| Componentes                                     | Concentração g/100 mL |             |          |              |              |
|---|-----------------------|-------------|----------|--------------|--------------|
|   | Teste 12              | Teste13     | Teste 14 | Teste 15     | Teste 16     |
| Glicose   | 1,00                  | 1,00        | 1,00     | 1,00**       | 1,00         |
| Extrato de levedura                             | 0,90                  | --          | 0,90     | 0,90         | 0,90         |
| Isolado Protéico de soja                        | --                    | <b>0,55</b> | --       | --           | --           |
| Farinha de soja                                 | 0,30                  | 0,30        | 0,30     | 0,30         | 0,30         |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,20                  | 0,20        | 0,20     | 0,20         | 0,20         |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Cl              | 0,20                  | 0,20        | 0,20     | 0,20         | 0,20         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,12                  | 0,12        | 0,12     | 0,12         | 0,12         |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,05                  | 0,05        | 0,05     | 0,05         | 0,05         |
| Fermento (mx)                                   | 0,20                  | 0,20        | 0,20     | <b>0,016</b> | <b>0,012</b> |
| Solução de micronutrientes                      | --                    | --          | (*)      | --           | --           |
| Água q.s.p.                                     | 2000 mL               | 2000 mL     | 2000 mL  | 2000 mL      | 2000 mL      |

\*No Teste 14, foi feita uma solução dos sais contendo os micronutrientes, sendo essa solução adicionada ao meio de propagação no tempo zero, ou seja, no início da propagação. Os micronutrientes e a concentração utilizada estão descritos na TABELA 10.

\*\*O açúcar utilizado no teste 15 foi sacarose

**TABELA 11 - Sais Minerais utilizados como micronutrientes na Teste 14**

| Cátion           | Sal utilizado                        | Concentração utilizada (µmol/L) |
|------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Cu <sup>2+</sup> | Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O | 1,5                             |
| Zn <sup>2+</sup> | ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O  | 5,0                             |
| Fe <sup>2+</sup> | FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O  | 1000                            |
| Mn <sup>2+</sup> | MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O  | 2000                            |

Fonte: JONES & GREENFIELD(1984)

**TABELA 12 - Composição dos xaropes utilizados nas adições intermediárias no Propagador C**

| Componentes                          | Concentração g/100 mL |             |          |               |                |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|----------|---------------|----------------|
|                                      | Teste 12              | Teste 13    | Teste 14 | Teste 15      | Teste 16       |
| Glicose                              | 10,0                  | 10,0        | 10,0     | <b>25,00*</b> | 25,00          |
| Extrato de levedura                  | 0,90                  | --          | 0,90     | 0,90          | 0,90           |
| Isolado protéico de soja             | --                    | <b>0,55</b> | --       | --            | --             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Cl   | 0,25                  | 0,25        | 0,25     | 0,25          | 0,25           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,12                  | 0,12        | 0,12     | 0,12          | 0,12           |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,20                  | 0,20        | 0,20     | 0,20          | 0,20           |
| Água q.s.p.                          | 500 mL                | 500 mL      | 500 mL   | <b>650 mL</b> | <b>1000 mL</b> |

\*O açúcar utilizado no teste 15 foi sacarose

## TESTES 12, 13, 14

Dentre as estratégias descritas por KENNEDY & KROUSE (1999), consta a troca de componentes do meio como forma de verificar a influência sobre o crescimento celular. Desta forma foram conduzidos os Testes 12 e 13, a fim de verificar a influência de duas diferentes fontes protéicas sobre o crescimento. No Teste 12, foi feita a propagação, em triplicata, utilizando o extrato de levedura como fonte principal de nitrogênio. No Teste 13, a formulação do meio utilizado foi idêntica à do experimento 12, com exceção da fonte de nitrogênio protéico, que foi substituída por isolado protéico de soja –SUPRO 780 (90% de proteína), fornecido pela Bunge Alimentos. A quantidade utilizada de isolado protéico foi calculada de forma a adicionar a mesma quantidade de nitrogênio que o extrato de levedura do experimento anterior, variando assim, apenas a fonte de nitrogênio. Este teste também foi realizado em triplicata.

No Teste 14 a composição do meio de cultivo foi idêntica à do meio do Teste 12, acrescida de micronutrientes. O objetivo foi verificar a influência de sais minerais descritos na literatura como micronutrientes sobre o crescimento e viabilidade celular. Foram testados:  $\text{Cu}^{2+}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . Depois de preparados e esterilizados os meios, os sais foram adicionados e então iniciada a propagação. O teste também foi realizado em triplicata.

Nos Testes 12, 13 e 14, foram feitas adições de xarope de glicose, complementado com sais, com formulação descrita na TABELA 12, a cada duas horas de propagação, dentro das doze primeiras horas do processo. Nas doze horas seguintes, não foi adicionado meio de cultivo ao propagador e o aerador foi mantido ligado, borbulhando ar comprimido.

## TESTES 15 e 16

Estes testes foram planejados para que fosse possível comparar melhor os resultados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por ALVES *et al.* (2005). O meio de cultivo utilizado foi basicamente o mesmo utilizado nos Testes 12, 13 e 14. O inóculo foi reduzido de 0,20 g/100 mL (Testes 12, 13 e 14) para 0,016 g/100 mL (Teste 15) e 0,012g/100 mL (Teste 16) como no Teste 09 realizado anteriormente. A composição dos meios é mostrada na TABELA 10, assim como a composição do xarope utilizado nas adições intermediárias na TABELA 12.

O teste 15 foi realizado para estudar a influência da concentração inicial de células na propagação. Como nos testes 12, 13 e 14, foram feitas adições de meio de cultivo a

cada duas horas, durante as primeiras 12 horas de propagação. O aerador foi então, mantido ligado durante 12 horas.

O teste 16 foi feito com o objetivo de verificar a influência da redução da concentração inicial de inóculo e do aumento do tempo de alimentação (de 12 para 24 horas). Neste teste, foram feitas adições de meio de cultivo a cada duas horas, durante as 24 horas de propagação.

### 3.5. Análise estatística:

Os resultados obtidos nos Testes 12, 13 e 14 (feitos em triplicata) foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Duncan, adotando-se o nível de significância de 5% para ambos os casos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio preliminares – Propagações conduzidas no propagador Modelo A em sistema de batelada alimentada.

Com exceção dos Testes 1 e 2, todas as outras propagações dos ensaios preliminares foram conduzidas por 12 horas.

Os resultados destes testes estão resumidos na TABELA 13.

**TABELA 13 – Resultados dos parâmetros fermentativos do Propagador A**

| Testes | $Y_{p/s}$<br>g/g | $Y_{ac/s}$<br>g/g | $Y_{x/s}$<br>g/g | Viabilidade<br>(%) | $X_f / X_o$ |
|--------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------|
| 3      | 0,007            | 0,031             | 0,07             | 80                 | 2,4         |
| 4      | 0,008            | 0,037             | 0,10             | 63                 | 3,0         |
| 5      | Nd               | 0,004             | 0,22             | 99                 | 2,2         |
| 6      | 0,024            | 0,027             | <b>0,36</b>      | 98                 | 5,5         |

Nd.=Não determinado

### TESTES 1 e 2

No Teste 1, o tempo de propagação foi de 6 horas e 30 minutos. Durante o processo de propagação, a acidez total produzida aumentou em 3,9 g ácido acético/L. A viabilidade inicial era de 77,9%, e se manteve ao final do processo de propagação (78%). Por apresentar uma viabilidade inicial baixa, o fermento liofilizado foi substituído pelo fermento prensado úmido nos testes seguintes.

No Teste 2, o tempo de propagação foi de 7 horas e 30 minutos. Durante o processo de propagação, a acidez total produzida aumentou em 2,7 g ácido acético/L. A viabilidade inicial das células era de 96% caiu muito durante o tempo de propagação, terminando 20% menor (79%). O aumento de massa não pode ser verificado nestes dois testes devido à retirada de amostras volumosas (cerca de 200 mL a cada 2 horas) durante a propagação.

Estes dois testes foram exploratórios, e foi possível fazer algumas observações: Apesar da determinação do °Brix oferecer apenas uma estimativa do teor de açúcar, sua utilização permitiu observar que todo o açúcar adicionado foi consumido (leitura açúcar residual 0,5 °Brix). O refratômetro utilizado apresenta limitações com relação à interpretação do resultado na escala do aparelho, uma vez que o teste foi conduzido com

um baixo teor de açúcar. A viabilidade celular não se manteve ao final do Teste 2, o que sugere que o uso de sulfato de amônio não foi suficiente para manter as células viáveis.

Com relação à acidez titulável total, o comportamento observado era esperado, sendo o sulfato de amônio a única fonte de nitrogênio. BASSO *et al.* (1996) comentam que, em meios de cultivo onde a única fonte de nitrogênio é amoniacal, ocorre uma acidificação do meio pelas leveduras, que ao absorverem o  $\text{NH}_4^+$ , liberam o íon  $\text{H}^+$  no meio. Em um trabalho de acompanhamento do processo de propagação do fermento, MORAIS *et al.* (1997) citam que durante a propagação do fermento (preparo do “pé-de-cuba”), a atividade das leveduras promoveu a acidificação do mosto. A acidez total correspondeu a 0,110 g de ácido acético/litro no primeiro dia de propagação e à 0,461 g/litro no quinto dia, valores bastante inferiores aos resultados encontrados nos testes 1 e 2.

#### TESTES 3 e 4

No Teste 3, a massa celular seca final aumentou 2,4 vezes (de 39 g iniciais para 93 g ao fim do processo), o  $Y_{x/s}$  obtido foi 0,07. A viabilidade diminuiu 20% de 99% no início da propagação para 80% no final do processo.

A cada intervalo de propagação, um volume significativo de amostra era retirado (200 ml), o que dificultou a interpretação dos resultados, uma vez que a retirada da amostra implica também na retirada de células. No Teste 4, a amostragem foi reduzida (6 mL a cada duas horas), para evitar o problema descrito.

A massa celular seca no Teste 4 aumentou de 42 g inicial para 124 g final, ou seja, 34%, mas apesar disso a viabilidade diminuiu de 99% no início da propagação para 63% no final do processo. Em ambos os testes, pode-se observar que apenas a presença dos sais nas concentrações testadas não foram suficientes para manter a viabilidade das células durante a propagação.

Apesar dessa queda na viabilidade no Teste 4, o  $Y_{x/s}$  foi de 0,10; ou seja, melhorou quando comparado ao teste anterior. A acidez total aumentou dentro do esperado, de 1,6g ácido acético/L para 3,8 g ácido acético/L, sendo o nitrogênio amoniacal a única fonte de nitrogênio disponível no meio.

#### TESTE 5

Houve um aumento de 2,2 vezes da massa celular. O fator de conversão ( $Y_{x/s}$ ) foi de 0,22. Ao término da propagação, a viabilidade se manteve constante (99%), o que pode ser atribuído à adição do extrato de levedura ao meio de cultivo, conforme

observado por JERONIMO (2004), que relatou queda na viabilidade celular na ausência de nitrogênio protéico no mosto. A acidez aumentou menos quando comparada aos valores das propagações anteriores (acidez inicial de 2,3 g ácido acético/L; acidez final de 2,2 g ácido acético/L), que pode ser devido à ausência do sulfato de amônio na composição do meio de cultura.

## TESTE 6

O  $Y_{x/s}$  obtido de 0,36, o que pode ser considerada uma boa conversão de substrato em células. A massa inicial foi aumentada 5,5 vezes ao final do experimento. Observou-se que a diminuição da concentração de sais minerais no meio de cultivo em relação ao experimento anterior (Teste 5) e a presença do extrato de levedura como fonte protéica melhoraram sensivelmente os resultados, mantendo as células viáveis, aumentando a massa celular e o  $Y_{x/s}$ .

Ao término da propagação, a acidez apresentou um pequeno acréscimo (início 1,6 g ácido acético/litro; final da propagação 2,2 g ácido acético/litro), a viabilidade se manteve constante (início 99,3% final da propagação 98,4% de células viáveis). Com estes resultados, pode-se verificar que a presença do extrato de levedura no meio de cultura manteve a viabilidade celular, aspecto importante quando se trata de propagação de células de levedura para a produção de cachaça. Observando a TABELA 13, os fatores de conversão de substrato em ácido acético ( $Y_{ac/s}$ ) dos testes 3 (0,031), 4 (0,037), 5 (0,004) e 6 (0,027) se encontram abaixo do valor encontrado para este fator por OLIVEIRA (2001), em fermentações alcoólicas, que foi de 0,080.

Dentre os testes preliminares, verifica-se que o Teste 6 foi o que proporcionou maior aumento de massa celular (5,5 vezes) e também foi obtido um valor de  $Y_{x/s}$  0,36. É importante comentar que, apesar do Teste 4 ter apresentado um maior aumento de massa celular (3 vezes) do que o Teste 5 (2,2 vezes), ocorreu uma grande perda de viabilidade celular durante o experimento (caiu para 63,3%). Houve um efeito positivo da adição de extrato de levedura aos meios de cultivo como fonte de nitrogênio. JERÔNIMO (2004), explica que na ausência de suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura durante a fermentação alcoólica, a viabilidade celular diminui drasticamente, podendo comprometer a utilização do fermento.

A queda de viabilidade nos Testes 1, 2, 3 e 4 pode ser devido à ausência de nitrogênio protéico. Segundo BASSO *et al.* (1996), a acidez resultante da utilização do sulfato de amônio causa estresse à levedura diminuindo a viabilidade e multiplicação.

REED & NAGODAWITHANA (1991) comentam que, sob condições estritamente aeróbias, o melhor fator de conversão ( $Y_{x/s}$ ) obtido é 0,54. É importante comentar que este fator é atingido quando se trabalha com reatores totalmente automatizados, com todas as condições bem controladas (temperatura, oxigênio dissolvido no meio, pH, formação de etanol, consumo de açúcar). Este dado nos sugere que as condições estudadas devem ser aprimoradas.

4.2. Testes de propagação conduzidos em incubadora com agitação e temperatura controladas (*shaker*)

**TABELA 14 – Resultados dos parâmetros fermentativos - *shaker***

| Testes     | $Y_{p/s}$ | $Y_{ac/s}$ | $Y_{x/s}$ | Viabilidade(%) | $X_f / X_o$ |
|------------|-----------|------------|-----------|----------------|-------------|
| 7          | Nd        | 0,013      | 0,08      | 87             | 3,3         |
| 8 - Meio 1 | Nd        | 0,038      | 0,20      | 96             | 2,65        |
| 8 - Meio 2 | Nd        | 0,027      | 0,11      | 88             | 1,67        |
| 8 - Meio 3 | Nd        | 0,050      | 0,15      | 90             | 1,99        |
| 8 - Meio 4 | Nd        | 0,041      | 0,11      | 95             | 1,53        |
| 9 a*       | 0,023     | 0,008      | 0,070     | 98             | <b>52</b>   |
| 9 b**      | 0,025     | 0,005      | 0,074     | 98             | <b>57</b>   |

nd.=Não determinado

Meio 1: Extrato de Levedura 0,9 g/100; Meio 2: Isolado Protéico de Soja 0,4 g/100 mL; Meio 3: Farinha de Soja 0,5 g/100 mL; Meio 4: Isolado Protéico de Soja 0,4 g/100 mL + Farinha de Soja 0,5 g/100 mL.

9a \* Sc 19 Levedura selecionada para produção de cachaça *S. cerevisiae*

9b \*\* Fermento úmido prensado.

## TESTE 7

Observa-se na TABELA 14, que a massa celular aumentou 3,3 vezes ao final da propagação, resultado próximo à faixa de aumento obtida nos experimentos anteriores, em propagador aerado tipo coluna de bolhas. O  $Y_{x/s}$  obtido foi baixo em se tratando de propagação de células de levedura, já que as condições de cultivo foram controladas (temperatura e agitação), e a concentração de substrato foi mantida baixa (entre 1 a 2% p/v) durante o experimento. Em estudo com fermentação alcoólica com *S. cerevisiae*, SILVA (2003) encontrou valores para  $Y_{x/s}$  entre 0,039 a 0,072, semelhantes aos

resultados obtidos neste teste, e nos testes 3 e 4, sugerindo que o meio e as condições de cultivo ainda não foram adequadas ao cultivo das células.

Ao fim das 12 horas de propagação, a viabilidade celular foi de 87% (viabilidade inicial era 98%). Neste teste o meio foi adicionado de sulfato de amônio (entre outros sais) e farinha de soja. Segundo MAIA (1992) esta última tem efeito positivo sobre a viabilidade das células, mas nas condições deste experimento isto não se comprovou, já que ao final das 12 horas de propagação, a viabilidade que era inicialmente de 98% caiu para 87%.

#### TESTES 8 (Meios 1, 2, 3 e 4)

Durante a propagação, o teor de açúcar (ART) foi todo consumido ao final de quatro horas, o que determinou o fim do experimento, uma vez que este teste foi conduzido em batelada.

Observando-se a TABELA 14 verifica-se que, dentre os meios testados, os resultados obtidos com o Meio 3 (com 5 g/L de farinha de soja) foram satisfatórios, por apresentar resultados semelhantes aos obtidos com o meio 1 (com 9 g/L de extrato de levedura). Estes meios apresentaram os maiores valores de  $Y_{x/s}$ , maiores aumentos em massa celular, assim como maior percentagem de células viáveis. Os resultados corroboram com MAIA (1992), que testou a adição de farinha de soja em meios para fermentação alcoólica, conseguindo manter a viabilidade inicial do fermento. Por estes motivos e também por ser um substrato de baixo custo, a farinha de soja foi incorporada aos meios de cultivo testados neste trabalho.

#### TESTE 9

Os resultados dos testes feitos com a levedura selecionada *S. cerevisiae* Sc 19 e com fermento úmido prensado estão apresentados na TABELA 14. A viabilidade inicial do fermento selecionado era de 100%, e ao final da propagação era de 98,5%. A viabilidade final do fermento úmido prensado manteve-se em 98%.

Ambos os fermentos testados apresentaram baixos fatores de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$  de 0,070 e 0,074). O teste foi conduzido em batelada, com alta concentração inicial de açúcares (11 g/100 mL), que segundo REED & PEPPLER, (1973), também desfavorece o ciclo metabólico respiratório, e conseqüentemente, uma menor conversão de substrato em massa celular. Este teste, assim como nos estudos desenvolvidos por ALVES *et al.* (2005), tiveram um nível inicial de açúcares elevado (7 g/100 mL), e foram conduzidos em batelada. O nível elevado de açúcares pode ter

interferido negativamente numa melhor conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ). Segundo PRESCOTT & DUNN (1959) níveis de açúcares abaixo de 1,5% favorecem a produção de células. No entanto, estes foram os maiores aumentos de massa celular conseguidos até então (52 e 57 vezes), valores muito superiores aos encontrados nos testes anteriores, o que sugere que a concentração inicial do inóculo teve influência direta no aumento de massa celular de *S. cerevisiae*, nas condições avaliadas.

Os testes conduzidos em incubadora de agitação orbital nos sugerem a ineficiência da aeração dos meios, pois os Testes 07 e 09 apresentaram resultados de  $Y_{x/s}$  muito baixos (0,079, 0,070 e 0,074), assim como os meios 2 e 4 do Teste 08, que foram de 0,11. Os resultados de  $Y_{ac/s}$  encontrados nos testes em *shaker* podem ser comparados com os resultados em fermentação alcoólica obtidos por OLIVEIRA (2001) e SILVA (2003), que utilizaram a classificação proposta por ANDRIETTA (1999), onde os resultados dos parâmetros fermentativos são divididos entre níveis que vão de muito baixo a muito alto. Os fatores  $Y_{ac/s}$  dos Testes 7, e 9 se encaixam nos níveis baixo (0,005 a 0,0079) e médio (0,0080 a 0,013) desta classificação. Os resultados do Teste 8 se encontram acima do nível definido como muito alto (>0,024) por este autor.

Observou-se que é necessário verificar o desempenho de formulações mais complexas e elaboradas em um propagador que tenha um sistema de aeração mais eficiente, uma vez que a incubadora com agitação orbital não permite uma aeração eficiente do meio

#### 4.3. Testes de propagação conduzidos no Propagador B

Os resultados dos Testes 10 e 11 estão apresentados na Tabela 15. Ambas propagações tiveram 12 horas de duração.

**TABELA 15 – Resultados dos parâmetros fermentativos do Propagador B**

| Teste | $Y_{p/s}$ | $Y_{ac/s}$ | $Y_{x/s}$ | Viabilidade (%) | $X_f / X_o$ |
|-------|-----------|------------|-----------|-----------------|-------------|
| 10    | 0,036     | 0,003      | 0,12      | 97              | 2,0         |
| 11    | 0,015     | 0,028      | 0,06      | 51              | <b>40,0</b> |

## TESTE 10

A massa celular aumentou apenas 2,0 vezes, e o fator de conversão ( $Y_{x/s}$ ) obtido foi de 0,12 também não pode ser comparado com os índices considerados ideais e comentados por PRESCOTT & DUNN (1959) e REED & NAGODAWITHANA (1991). Estes autores citam que fatores de conversão de substrato em células entre 0,63 a 0,54 são possíveis. A viabilidade diminuiu de 99% no início para 97,4% ao fim do processo.

O resultado de  $Y_{ac/s}$  se encontra abaixo do nível considerado por ANDRIETTA (1999) como muito baixo.

Este teste foi o único feito com o meio de cultivo contendo uréia, e o primeiro a ser feito com balanceamento dos componentes, segundo a composição da célula de levedura. Em condições de fermentação com leveduras *S. cerevisiae*, existe a possibilidade de formação de carbamato de etila a partir da uréia e por este motivo, essa composição não foi mais utilizada. Segundo ANDRADE-SOBRINHO *et al.* (2002) e POLASTRO *et al.* (2001), a uréia é uma fonte de nitrogênio para as leveduras, que no passado era freqüentemente adicionada à dorna de fermentação, para produção de etanol, porém atualmente sabe-se que não é aconselhável, pois este composto pode reagir com o etanol produzindo carbamato de etila, o qual é considerado potencialmente carcinogênico. Passou-se, então a utilizar outras fontes de nitrogênio que pudessem atender aos propósitos do trabalho.

## TESTE 11

A massa inicial aumentou 40 vezes, mas o fator de conversão  $Y_{x/s}$  foi muito baixo (0,06). A viabilidade inicial foi de 97%, caiu para 51% ao final das 12 horas de propagação, o que pode ser atribuído à aeração ineficiente, ou à falta de algum nutriente na composição do meio. A temperatura de 30 °C, que foi mantida durante a propagação, pode ter piorado a solubilidade do oxigênio, que é sabidamente baixa, principalmente em se tratando de meios de cultivo à temperatura descrita (HISS, 2001).

O resultado de  $Y_{ac/s}$  se encontra acima do nível considerado por ANDRIETTA (1999) como muito alto. A concentração inicial de células foi de 0,015 g/100 mL, que pode ser comparada à concentração inicial de células do Teste 09 (0,012 g/100 mL), o que novamente nos sugere a influência da concentração inicial do inóculo sobre o aumento da massa celular.

#### 4.4. Testes de propagação conduzidos no Propagador C

Os resultados de cada experimento estão apresentados na TABELA 16.

**TABELA 16 – Resultados dos parâmetros fermentativos do Propagador C**

| Teste | $Y_{p/s}$ | $Y_{ac/s}$ | $Y_{x/s}$   | Viabilidade (%) | $X_f / X_o$ |
|-------|-----------|------------|-------------|-----------------|-------------|
| 12 *  | 0,005     | 0,011      | 0,26        | 95              | 4,4         |
| 13 *  | 0,009     | 0,021      | 0,17        | 86              | 2,0         |
| 14 *  | 0,019     | 0,010      | 0,22        | 98              | 3,5         |
| 15    | 0,167     | 0,031      | <b>0,39</b> | 83              | <b>50,5</b> |
| 16    | 0,022     | 0,020      | <b>0,17</b> | 97              | <b>75,4</b> |

\*Testes feitos em triplicata, valores médios

Como pode ser observado na TABELA 16, o fator de conversão de substrato em células obtido ( $Y_{x/s}$ ) foi menor para o Teste 13, no qual se utilizou isolado protéico de soja. O ganho de massa calculado em número de vezes (massa final / massa inicial) também foi inferior aos testes realizados com extrato de levedura (Teste 12) ou extrato de levedura adicionado de sais (Teste 14). JERONIMO (2004) propõe que o isolado protéico de soja possa ser utilizado em substituição ao extrato de levedura, mas no presente trabalho tal equivalência entre as duas fontes protéicas não foi verificada.

É também importante observar que a massa celular seca inicial, no tempo zero (logo após a inoculação) foi maior nos testes feitos com isolado protéico de soja (Teste 13), o que indica maior insolubilidade deste. Tal observação se torna mais pertinente devido ao fato de que a metodologia de análise abrange centrifugação, e o volume de centrifugado foi visivelmente diferente. Os resultados finais do Teste 14 mostraram uma maior produção de etanol quando comparados às propagações anteriores.

Os Testes 12, 13 e 14 foram realizados em triplicata e por este motivo, foi feita a análise de variância. As médias foram testadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os resultados estão mostrados na TABELA 17.

**TABELA 17 - Resultados dos testes de médias dos parâmetros fermentativos**

| Teste | Viabilidade       | $X_f - X_o$       | $X_f / X_o$       | $Y_{ac/s}$         | $Y_{x/s}$           | $Y_{p/s}$           |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| 12    | 95,0 <sub>a</sub> | 17,3 <sub>a</sub> | 4,4 <sub>a</sub>  | 0,011 <sub>b</sub> | 0,267 <sub>a</sub>  | 0,005 <sub>b</sub>  |
| 13    | 86,2 <sub>a</sub> | 13,0 <sub>a</sub> | 2,0 <sub>ab</sub> | 0,021 <sub>a</sub> | 0,176 <sub>b</sub>  | 0,009 <sub>ab</sub> |
| 14    | 98,3 <sub>a</sub> | 16,2 <sub>a</sub> | 3,5 <sub>a</sub>  | 0,010 <sub>b</sub> | 0,223 <sub>ab</sub> | 0,019 <sub>a</sub>  |

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ( teste de Duncan a 5%).

No tratamento com isolado protéico de soja (Teste 13), obteve-se maior fator de conversão de substrato em acidez, sendo que os outros dois tratamentos (Testes 12 e 14) não diferiram entre si. Os resultados de  $Y_{ac/s}$  se encontram entre os níveis médio (0,008 a 0,013) e muito alto (0,0201 a 0,024), na classificação de ANDRIETTA (1999), em fermentação alcoólica. Embora fermentação alcoólica e propagação sejam dois processos distintos, em ambos os casos não se deseja que o fator de conversão de substrato em ácido acético seja muito alto, o que implicaria na redução de outros fatores desejados em fermentação alcoólica (neste caso,  $Y_{p/s}$ ) ou em propagação (fator desejado  $Y_{x/s}$ ).

Entre os três tratamentos avaliados (Testes 12, 13 e 14), não se observa diferença significativa no parâmetro viabilidade celular. Este resultado pode ser atribuído à presença de nitrogênio protéico (como extrato de levedura ou isolado protéico) na formulação de todos os meios testados no propagador Modelo C. Segundo JERONIMO (2004), a adição de nitrogênio protéico influi positivamente na manutenção da viabilidade celular. Os resultados de viabilidade corroboram com os dados desta pesquisadora, que relata ter conseguido manter a viabilidade celular da levedura utilizada em fermentações utilizando o mesmo isolado protéico de soja utilizado no Teste 13.

No Teste 12, com adição de extrato de levedura ao meios de cultivo permitiu um maior aumento de massa celular, em número de vezes, do que o tratamento com isolado protéico de soja (Teste 13), como pode ser observado na TABELA 17. De acordo com STEHLIK-TOMAS *et al.* (2004), a adição de sais minerais (sulfatos de Zn, Cu e Mn 0,01 g/100 mL) aumentou em 30% o rendimento em biomassa em condições semiaeróbias. Na concentração de sais utilizada no presente trabalho, não conseguiu-se atingir este aumento de massa, discordando também de JONES & GREENFIELD (1984).

O tratamento com extrato de levedura (Teste 12) apresentou fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) significativamente maior do que o tratamento com isolado protéico de soja (Teste 13). O tratamento com extrato de levedura mais sais (Teste 14) apresentou maior fator de conversão de substrato em etanol ( $Y_{p/s}$ ) do que o tratamento com extrato de levedura (Teste 12).

#### TESTES 15 e 16:

No teste 15 a viabilidade inicial era de 97% e caiu para 83% ao final das 12 horas de propagação. Apesar desta queda de 15% da viabilidade, este foi o melhor fator de conversão ( $Y_{x/s}$ ) obtido neste trabalho (0,39). A massa foi aumentada 50,6 vezes em relação à massa inicial.

No teste 16 houve um aumento de 75 vezes a massa inicial. A viabilidade celular inicial era de 98%, caiu para 97,3% ao final das 24 horas de propagação em batelada alimentada. O fator de conversão de substrato em células (0,17) foi mais baixo que o encontrado no Teste 15 (0,39), mas ficou próximo dos valores encontrados nos Testes 12, 13 e 14 (0,26; 0,17; 0,22, respectivamente). No Teste 16 a batelada alimentada por 24 horas não interferiu na melhora deste fator, uma vez que o Teste 15 foi alimentado por 12 horas.

Os resultados de  $Y_{ac/s}$  nestes dois testes se encontram acima do nível muito alto (0,0201 a 0,024), na classificação proposta por ANDRIETTA (1999), em fermentação alcoólica. Não foram encontrados dados de  $Y_{ac/s}$  para propagação de *S. cerevisiae* para comparação com o presente trabalho.

Os resultados de aumento de massa encontrados nos Testes 09, 11, 15, e 16 nos sugerem que o aumento de massa celular final está diretamente relacionado com a baixa concentração do inóculo. Estes dados são confirmados pelos resultados encontrados por ALVES *et al.* (2005), que conseguiu aumentos de 30 a 80 vezes na massa celular, partindo de inóculo de 0,012g massa seca/100 mL meio de cultivo. A influência da quantidade de inóculo sobre a fermentação alcoólica com leveduras foi reportada por NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) citado por FERREIRA (2002) e no trabalho de STREHAIANO *et al.* (1983). Estes autores citam que, embora o rendimento em etanol permanecesse constante, a velocidade específica de crescimento e o rendimento em biomassa diminuíam com o aumento da concentração do inóculo inicial, dado que coincide com os resultados deste trabalho. STREHAIANO *et al.* (1983) conduziram um trabalho com quatro diferentes concentrações de inóculo (2, 10, 20 e 60% v/v), e

constataram que o rendimento em biomassa e a taxa específica de crescimento decresceram continuamente enquanto a concentração de inóculo era aumentada.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições avaliadas, o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio não foi capaz de manter a viabilidade das células durante o processo de propagação. Da mesma forma, a adição de fosfato diácido de potássio e sulfato de magnésio nos meios testados apenas com nitrogênio amoniacal (sulfato de amônio) também não foram suficientes para manter a viabilidade celular e promover o crescimento.

A viabilidade celular não sofreu interferência da presença dos micronutrientes (sais de Cu, Zn, Fe, Mn) nas condições avaliadas (Teste 14), no meio com extrato de levedura (Teste 12) e no meio com isolado protéico de soja (Teste 13). Também não interferiu na viabilidade das células.

Os melhores fatores de conversão de substrato em células foram obtidos nos testes 12, 14, 15 e 16, nos quais se adicionou extrato de levedura na concentração de 0,9 g/100 mL, em comparação com a outra fonte protéica testada (isolado protéico de soja), na mesma concentração de nitrogênio.

A concentração inicial de células do inóculo foi um como fator determinante no aumento de massa celular. Nos Testes 9, 11, 15 e 16, onde a concentração inicial de inóculo foi de no máximo 0,016 g/100 mL, o aumento de massa celular foi de 55; 40; 50,5 e 75,4 vezes; respectivamente.

O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) descrito na literatura, de aproximadamente 0,5, não foi atingido em nenhum dos testes feitos neste trabalho. Este fato sugere que as condições trabalhadas ainda não sejam as ideais. Este fator vem sendo reportado por vários autores, que de uma maneira geral utilizam reatores que operam de forma inteiramente controlada, inclusive com leituras instantâneas das concentrações de etanol, células, substrato e taxa respiratória.

## 6. PERSPECTIVAS

### Protocolo de propagação:

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se propor um protocolo de propagação de leveduras para produção de cachaça.

- Equipamento: o Propagador C utilizado neste trabalho foi facilmente operável, e seu modelo pode ser adaptado para outro equipamento de maior capacidade (volume);
- Aeração: aspersor em forma de chuveiro, ou de vela sinterizada. A aeração deve estar ligada de forma contínua (ar pressurizado) durante todo o tempo de propagação, de forma a aerar, movimentar o mosto, sem causar turbulência excessiva;
- Temperatura de operação: deve ser mantida entre 20 a 23 °C, por isso o propagador em maior escala deverá possuir dispositivos de resfriamento externo (tanque camisado);
- Composição do mosto:

Mosto composto por caldo de cana-de-açúcar, com seu teor de sacarose diluído entre 10 a 20 g/L (ou 1 a 2% p/v). A suplementação do caldo deve ser feita com extrato de levedura de uso industrial alimentício 9 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 g/L e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L. O mosto deve ser esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C, ou submetido à tratamento equivalente. Depois de resfriado até 25-28 °C, o mosto ou meio de cultivo deve ser inoculado, e aerado de forma contínua.;

- Tipo de Inóculo: fermento úmido prensado, de panificação, de aproximadamente 30% de massa seca, composto por leveduras *S.cerevisiae*. A concentração inicial de inóculo deve ficar na faixa de 0,12 g/L a 0,16 g/L;
- Metodologia de propagação: Após as primeiras duas horas de propagação, devem ser feitas adições sucessivas de caldo de cana-de-açúcar, sem diluição, a intervalos de aproximadamente 2 horas, em volumes crescentes. A propagação deve durar 12 horas, desta forma, neste intervalo é possível fazer de cinco a seis adições de caldo. Após a última adição deve-se aguardar mais duas horas, para que as leveduras consumam a sacarose adicionada, antes de encerrar a propagação;
- Cálculo da quantidade de caldo a ser adicionado: o caldo de cana-de-açúcar adicionado nestes intervalos deve ter teor de ART mais elevado que o mosto inicial

(em torno de 10 a 25 g/ L), o que pode ser verificado com o uso de um sacarímetro. O volume de caldo a ser adicionado deve ser calculado por balanço de massa, de acordo com o volume de meio contido no propagador e o açúcar residual. O balanço de massa pode ser feito de acordo com a metodologia exposta na página 37, item. 3.4.

Dentro das perspectivas de continuação dos estudos de propagação e ainda da adaptação deste protocolo para uso em maior escala, sugere-se:

- Deve ser adaptado um rotâmetro na linha de ar para melhor controle da vazão de ar, de forma que a aeração fique padronizada e constante;
- Deve-se também acompanhar a concentração de oxigênio dissolvido no meio;
- Usar uma bomba peristáltica para as adições intermediárias do meio de cultivo, de forma que o propagador seja vagarosa e continuamente alimentado durante todo o tempo da propagação.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *Acidez titulável total, volátil total e fixa* – NBR 13856. São Paulo: ABNT, 1997a.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *Determinação do teor alcoólico* – NBR 13920. São Paulo: ABNT, 1997c.
- AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N. *Biochemical Engineering*. 2nd edition. Academic Press, Inc., 1973, 434 p.
- AIBA, S.; NAGAI, S.; NISHI-ZAWA, Y. *Fed batch culture of Saccharomyces cerevisiae: a perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation*. *Biotechnology and bioengineering*, vol XVII, pag. 1001-1016,1976.
- ALVES, D.M.G. *Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. 1994, 128p. (Dissertação- Mestrado em Microbiologia).
- ALVES, J.G.L.F.; STROPPA, C.T.; PULZATTO, M.E.; LUNA, H.G.S.; OLIVEIRA, E.S.; ABREU-LIMA, T.L. *Desenvolvimento de equipamentos para Otimização da produção e melhoria da qualidade da cachaça artesanal*. Relatório parcial de resultados obtidos à FAPEMIG, 2005, processo nº CAG-678/04.UFMG/ Faculdade de Farmácia, UNIBH/Departamento de Ciências Exatas e Tecnologia.
- ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. *Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa)*. *Quim. Nova*, V. 25, N°. 6B, 1074-1077, 2002.
- ANDRADE, L.A.B.; ANJOS, I.A., FIGUEIREDO, P.A.M.; QUINTELA, A.C.R. *Utilização de variedades selecionadas de cana-de-açúcar na produção de cachaça de alambique*. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p.33-36, 2002.

- ANDRIETTA, S.R., MIGLIARI, P.C., ANDRIETTA, M.G.S. *Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa*. STAB, Açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v.15, n. 5, p. 54-59, 1999.
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. e AMORIM, H.V. *Processos de produção de álcool – Controle e Monitoramento*, 2<sup>a</sup> ed. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ – USP. Piracicaba, 1996.
- BACH, H.P; WOEHRER, W. and ROEHR, M. *Continuous determination of ethanol during aerobic cultivation of Yeasts*. *Biotechnology and bioengineering*, vol XX, 799-807, 1978.
- BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. *Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by eritrosine B. staining*. *Analytical Biochemistry*, v.193, p.225-230, 1991.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, Página 3. disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br).
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. *Fermentação descontínua*. In: SCMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 193-204.
- CLETO, F.V.G. *Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da aguardente de cana*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. 1997. 109 p. (Tese, Mestrado em Agronomia).
- COONEY, C. *Bioreactors: design and operation*. *Science*, v. 219, p. 728(6), 1983 feb. 11.
- ETANISLAU, M.L.L.; CANÇADO JR., F.L.; PAIVA, B.M. *Mercado Atual e potencial da cachaça*. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p.19-24, 2002.

- FERRARI, M.D.; BIANCO, R.; FROCHE, C., LOPERENA, M.L. *Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures*. Biotechnology Letters, vol 23, pag 1-4, 2001.
- FERREIRA, L.V. *Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002, 266 p. (Tese, Doutor em Tecnologia de Alimentos).
- FIALHO, C.J. *Identificação de Saccharomyces cerevisiae por técnicas moleculares (PCR e PFGE) em uma fermentação de caldo de cana-de-açúcar*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, 76p. (Tese, Mestrado em Ciência de Alimentos, concentração em Microbiologia de Alimentos).
- GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C., ROSA, C.A. *Genetic diversity of Saccharomyces cerevisiae strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the arthisanal Brazilian cachaça*. Letters in Applied Microbiology, v.33, p.106-111, 2001.
- HENICK-KLING, T. *Yeast and Bacterial Control in Winemaking*. In: Modern methods of plant analysis, new series vol 6. Wine analysis. Edited by LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. Spring-Verlag Berlen Heidelberg, 1988.
- HISS, H. *Cinética de Processos fermentativos*. In: SCMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 93-122.
- JANZANTTI, N. S. *Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2004. 179 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- JERONIMO, E.M. *O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004. 119 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. *Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables*. Process Biochemistry, London, 1981, v.16, p-42-49
- JONES, R.P. and GREENFIELD, P.F. *A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation*. Process Biochemistry, april: p 48-60, 1984.
- JONES, R.P.; GADD, G.M. *Enzyme Microb. Technol.*, 1990. v. 12: 1-17 apud STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. *Zn, Cu and Mn Enrichment in S. cerevisiae*, Food Technology. Biotechnology. v.42 (2), p.115–120, 2004.
- KENNEDY, M.; KROUSE, D. *Strategies for improving fermentation medium performance: a review*. Journal of Microbiology & Biotechnology, vol 23, pág. 456-475, 1999.
- LIMA, U.A. *Aguardentes*. In: AQUARONE, E., LIMA, U.A.; BORZANI, W. (Coord.) *Biotechnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 5. p. 145-182.
- LIMA, U.A. *Aguardentes*. In: AQUARONE, E.; LIMA; U.A.; BORZANI, W. *Biotechnologia – Alimentos e Bebidas produzidas por fermentação*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 1983, vol 5, 243 p.
- LIU, F.X.; SUPEK, F.; NELSON, N.; CULOTTA, V.C. *J. Biol. Chem.* v.272 (1997) 11763-11769 apud STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. *Zn, Cu and Mn Enrichment in S. cerevisiae*, Food Technology. Biotechnology. v.42 (2), p.115–120, 2004.
- MAIA, A.B.R.A. *Fermentação alcoólica de Saccharomyces cerevisiae: desenvolvimento de um novo sistema e novas concepções sobre a formulação de meios*. Belo Horizonte: UFMG, 1992, 210 p. (Tese de doutorado – Microbiologia).
- MAIA, A.B.R.A; RIBEIRO, J.C.G.M; SILVEIRA, L.C.I. *1º Curso AMPAQ de Produção Artesanal de Aguardente de qualidade*. Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 106 p. Apostila.

- MAIA, A.B.R.A. *Equipamentos para a produção de cachaça*. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p.63-66, 2002.
- MILLER, G.L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem., v. 31, p. 426-428, 1959.
- MISKIEWICZ, T. KASPERSKI, A. *A fuzzy logic controller to control nutrient dosage in a fed-batch baker's yeast process*. Biotechnology letters, vol 22, pag 1685-1691, 2000.
- MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; LINARDI, V.R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. *Short Communication: Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, vol 13, p.211-213, 1997.
- NAGODAWITHANA, T.W.; STEINKRAUS, K.H. *Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in rapid fermentation*. Applied Environmental Microbiology, v. 31, p. 158-162, 1976 *apud* FERREIRA, L.V. *Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002, 266 p.
- NOVAES, F.V. *Produção e qualidade da aguardente de cana*. Apostila. Piracicaba: ESALQ, 1995. 27 p. *apud* JERONIMO, E.M. *O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004. 119 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- OLIVEIRA, E.S. *Efeito da adição de suplementos nutricionais na fermentação alcoólica de melão de cana-de-açúcar em diferentes temperaturas*. Viçosa: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, 1988, 63 p. (Dissertação Mestrado).
- OLIVEIRA, E.S. *Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da

Universidade Estadual de Campinas, 2001. 135 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

OLIVEIRA, S.G.; MAGALHÃES, M.A. *Procedimentos para produção da cachaça artesanal de Minas regulamentados pelo Decreto nº42.644 de 05/06/2002*. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p. 78-83, 2002.

OURA, E. *Effect of Aeration on the Biochemical Composition of Baker's Yeast*. Biotechnology and Bioengineering, vol XVI, pag 1197-1212, 1974.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. *Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in a cachaça distillery*. Rev. Microbiol., v.29, p. 69-79, 1998.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R. e ROSA, C.A. *Yeast communities and genetic polymorphism of Saccharomyces cerevisiae strains associated with artisanal fermentation in Brazil*. Journal of Applied Microbiology, v.89, p.24-31, 2000.

PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. *Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique*. Informe Agropecuário, EPAMIG, Belo Horizonte, v. 23, n 217, p. 37-43, 2002.

PINOTTI, R.F. *Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool*. STAB, Piracicaba, v.10, n.1, p.34-35, 1991.

POLASTRO, L.R.; BOSO, L.M.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. *Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(1): 78-81, jan.-abr. 2001.

PRESCOTT, C.; DUNN, C.G. *Industrial Microbiology*. 3 ed. New York: McGraw Hill, 1959. 923 p.

- PULZATTO, M.E. *Fatores que influem na obtenção de biomassa de Levedura Seca (Saccharomyces cerevisiae) na fermentação alcoólica*. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2000. 112 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- RECH, R.; FRANKEN, N.; ROSA, D.; AYUB, M.A.Z. *Estudo do tempo de alimentação em cultivos tipo batelada-alimentada para a produção de beta galactosidase*. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de alimentos, 2002, Porto Alegre.
- REED, G. and PEPLER, H.J. *Yeast technology*. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company, Inc., 1973. 378p.
- REED, G. and NAGODAWITHANA, T.W. *Yeast Technology*. New York: 2 ed. Van Nostrand Reinhold Book. 1991. 378 p.
- RIBEIRO, J.C.G.M. *Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira*. 2 ed. Belo Horizonte: O Lutador, 2002. 223 p.
- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P. & LEÃO, C. *Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism*. In: ROSA, C. A. & PETER G.(Eds), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts, The yeast Handbook*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2006, (579 p.) p. 101-121.
- SCHIMIDELL, W. *Agitação e aeração em biorreatores*. In: SCHMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2.; p.277-331.
- SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. *Biorreatores e processos fermentativos*. In: SCHMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 179-192.
- SCHWAN. R.F.; CASTRO, H.A. *Fermentação alcoólica*. In: CARDOSO, M.G. (Ed.) *Produção de cachaça de cana-de-açúcar*. Lavras: UFLA, 2001. p. 45-57.

- SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA JR., J.J.; RODRIGUES, V. e WHEALS, A.E. *Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations*. *Antonie van Leeuwenhoek* v. 79, p. 89–96, 2001.
- SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Plano de reestruturação da cadeia da cachaça de alambique de Minas Gerais. Disponível em: <[http://www.sebraemg.com.br/Geral/visualizadorConteudo.aspx?cod\\_areasuperior=2&cod\\_areaconteudo=40&cod\\_pasta=46](http://www.sebraemg.com.br/Geral/visualizadorConteudo.aspx?cod_areasuperior=2&cod_areaconteudo=40&cod_pasta=46)>. Março 2002. Acesso em: 14 nov. 2005
- SILVA, C.L.C. *Seleção de linhagens de Saccharomyces cerevisiae flocculantes e linhagens não produtoras de H<sub>2</sub>S e sua influência na qualidade da cachaça*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. 99p. (Tese, Mestre em Ciência de Alimentos).
- SILVEIRA, L.C.I.; BARBOSA, M.H.P.; OLIVEIRA, M.W. *Manejo de variedades de cana-de-açúcar predominantes nas principais regiões produtoras de cachaça em Minas Gerais*. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p.25-32, 2002.
- STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. *Zn, Cu and Mn Enrichment in S. cerevisiae*, *Food Technology. Biotechnology*. v.42 (2), p.115–120, 2004.
- STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. *Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation*. *Biotechnology Letters* v. 5 (nº2), p. 135-140, 1983.
- STUPIELLO, J.P.; HORII, J. *Condução da fermentação alcoólica*. *Saccharum*, v.4, n. 17, p. 43-46, 1981.
- STUPIELLO, J.P. *A cana-de-açúcar como material prima*. In: *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinas: Fundação Cargil, 1987, v. 2 p. 761-849 *apud* JERONIMO, E.M. *O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004. 119 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

WATSON, K. *Temperature Relations* In: *The Yeasts*., vol.2, c.3, p.41-71. Edited by ROSE, A. H. and HARRISON, J.S. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, 1987.