

# O USO DE FERMENTO RECICLADO COM TEOR REDUZIDO EM METABÓLITOS E SEU EFEITO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

**TADEU ALCIDES MARQUES**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por TADEU ALCIDES MARQUES e aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de agosto de 1997.

Campinas, 07 de agosto de 1997.



Prof. Dr. GIL EDUARDO SERRA  
Presidente da Banca

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

CAMPINAS, 1997

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**O USO DE FERMENTO RECICLADO COM TEOR REDUZIDO EM  
METABÓLITOS E SEU EFEITO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**TADEU ALCIDES MARQUES †**

**Engenheiro Agrônomo**

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas

Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Gil Eduardo, Serra †

CAMPINAS, 1997

UNIDADE	100		
N.º CHAMADA:	Unicamp		
	M.348u		
V.	Ex.		
TEMPO BC/	31537		
PROC.	281197		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	30/08/97		
N.º CPD			

CM-00 099808-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M348u

Marques, Tadeu Alcides

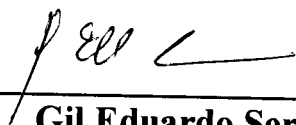
O uso de fermento reciclado com teor reduzido em metabólitos e seu efeito na fermentação alcoólica. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Gil Eduardo Serra

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

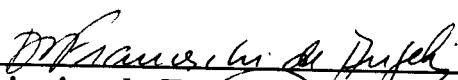
1.Cana de açúcar <sup>x</sup> - produtos agrícolas. 2.Fermentação. <sup>†</sup> 3.Células - crescimento. <sup>x</sup> 4.Melaço. <sup>x</sup> 5.Álcool. <sup>x</sup> 6.Metabolismo microbiano. <sup>†</sup>  
I.Serra, Gil Eduardo. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**



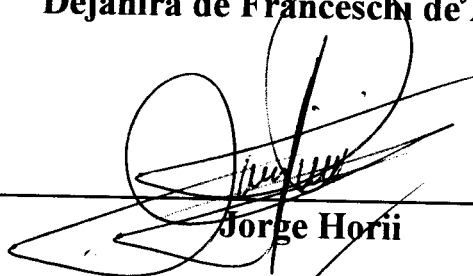
---

**Gil Eduardo Serra**



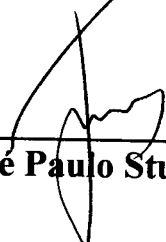
---

**Dejanira de Franceschi de Angelis**



---

**Jorge Horii**



---

**José Paulo Stupiello**



---

**Sílvio Roberto Andrietta**

---

**Marta Cristina T. Duarte**

---

**Maria Isabel Rodrigues**

**Campinas, 07 de agosto de 1997**

## OFEREÇO

A Deus,

A minha família,

A todos os meus professores,

**Pela minha existência e saber**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra, por sua orientação, amizade, responsabilidade e competência.

À minha esposa Patricia Angélica Alves Marques, por muito me ajudar durante esta árdua etapa de nossas vidas.

À UNIMAR - Universidade de Marília.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pelos conceitos e conhecimentos ensinados sobre Fermentações e sobre a vida.

Aos professores e aos colegas do Curso de Pós-graduação da Universidade Estadual de Campinas.

Aos funcionários do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas e Agrícolas, em especial ao Químico analista Adilson Sartoratto, pela valiosa colaboração neste trabalho.

À CAPES (Coordenadoria de Amparo à Pesquisa), pelo auxílio concedido em forma de bolsa de estudos.

À Prof. Sonia Maria De Stefano Piedade, do Departamento de Estatística da ESALQ/USP, pela ajuda nas análises estatísticas, regressões e correlações.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito desse trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xvii
SUMMARY .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	04
2.1. O processo de fermentação alcoólica com recuperação de levedura .....	04
2.2. O etanol e outros metabólitos da fermentação.....	07
2.3. Inibição da fermentação .....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1. Microrganismo e manutenção da cultura .....	19
3.2. Ativação da cultura, propagação das células e preparo do inóculo inicial	20
3.3. Delineamento experimental .....	21
3.3.1. Meio para fermentação .....	21
3.3.2. Fermentação com reciclo de células .....	22
3.3.3. Cinética da produção de CO <sub>2</sub> .....	24
3.3.4. Viabilidade de células e brotos .....	24



	Página
3.3.5. Determinação de açúcares redutores .....	25
3.3.6. Determinação de etanol e álcoois superiores.....	25
3.4. Reagentes, vidraria e equipamentos .....	26
3.5. Análise estatística .....	27
3.6. Balanço de massa .....	28
3.7. Cálculo da Eficiência da levedura .....	31
3.8. Cálculo do Rendimento da fermentação .....	32
3.9. Cálculo da Produtividade da fermentação .....	32
3.10. Cálculo da Produtividade específica da fermentação .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1. Ensaio com fermentações utilizando mosto com concentração de 180g ART/litro .....	33
4.1.1. Cinética da produção de CO <sub>2</sub> .....	34
4.1.2. Controle das fermentações .....	37
4.1.2.1. Açúcares redutores totais (residuais e consumidos) e tempo de fermentação .....	37
4.1.2.2. Etanol .....	39
4.1.2.3. Eficiência da levedura .....	41
4.1.2.4. Rendimento da fermentação .....	41
4.1.2.5. Produtividade da fermentação .....	41

	Página
4.2. Ensaio com fermentações utilizando mosto com concentração de 310g ART/litro .....	45
4.2.1. Cinética da produção de CO <sub>2</sub> .....	45
4.2.2. Controle das fermentações .....	54
4.2.2.1 Açúcares redutores totais (residuais e consumidos) e tempo de fermentação .....	54
4.2.2.2. Etanol .....	56
4.2.2.3. Microbiologia .....	58
4.2.2.4. Componentes secundários .....	63
4.2.2.5. Eficiência da levedura .....	71
4.2.2.6. Rendimento da fermentação .....	73
4.2.2.7. Produtividade da fermentação .....	75
4.2.2.8. Produtividade específica da fermentação .....	77
4.2.3. Análise conjunta dos resultados através de correlação linear múltipla (stepwise) .....	79
5. CONCLUSÕES .....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
APÊNDICES .....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01. Detalhes de uma separadora centrífuga .....	02
02. Processo de fermentação Melle-Boinot, com reciclo de fermento .....	06
03. Vias biossintéticas para a formação de álcoois superiores .....	09
04. Cinética da velocidade de produção de CO <sub>2</sub> (g/h) das fermentações com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	35
05. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações (F1 a F8), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	36
06. Cinética da velocidade de produção de CO <sub>2</sub> (g/h) das fermentações com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	46
07a. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações iniciais (F1), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	47
07b. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações de primeiro reciclo (F2), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	48

Figura	Página
07c. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações de segundo reciclo (F3), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	49
07d. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações do terceiro reciclo (F4), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	50
07e. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações do quarto reciclo (F5), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	51
07.f. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações do quinto reciclo (F6), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaios ...	52
07.g. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações do sexto reciclo (F7), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	52
07.h. Cinética da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (g), média das fermentações do sétimo reciclo (F8), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio ....	53

Figura	Página
08. Resultado de concentração celular nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	58
09. Exemplo de cromatograma de alguns componentes secundários no vinho ...	63
10. Resultado de metanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	65
11. Resultado de n-propanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	66
12. Resultado de isobutanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	67
13. Resultado de n-butanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	68
14. Resultado de álcool amílico nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	69
15. Resultado de compostos secundários nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	70
16. Resultado de produtividade nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	75

## LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
01. Resultados de açúcares redutores residuais, açúcares redutores totais consumidos e tempo de fermentação, com o uso de inóculos convencional e beneficiado nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	38
02. Resultados de etanol no vinho e etanol produzido com uso de inóculos convencional e beneficiado nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	40
03a. Análise de variância (teste F), dos resultados de eficiência da levedura, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro .....	42
03b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de eficiência da levedura, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, com 3 repetições de ensaio ..	42
04a. Análise de variância (teste F), dos resultados de rendimento da fermentação, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro .....	43
04b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de rendimento da fermentação, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, com 3 repetições de ensaio	43
05a. Análise de variância (teste F), dos resultados de produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 180g ART/litro .....	44
05b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições .....	44

06. Resultados de açúcares redutores residuais, açúcares redutores totais consumidos e tempo de fermentação, com o uso de inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	55
07. Resultados de etanol no vinho, etanol produzido com uso de inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	57
08a. Análise de variância (teste F), dos resultados de concentração celular (g/L), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	60
08b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de concentração celular (g/L), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com de 3 repetições de ensaio .....	60
09a. Análise de variância (teste F), dos resultados de viabilidade celular (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	61
09b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de viabilidade celular (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com de 3 repetições de ensaio .....	61
10a. Análise de variância (teste F), dos resultados de viabilidade de brotos (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	62

TABELA	Página
10b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de viabilidade de brotos (%) , nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	62
11. Resultados (ppm) de componentes secundários totais, metanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol e álcool amílico em fermentações com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	64
12a. Análise de variância (teste F), dos resultados de eficiência das leveduras (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	72
12b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de eficiência da levedura (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com de 3 repetições de ensaio .....	72
13a. Análise de variância (teste F), dos resultados de rendimento da fermentação (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	74
13b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de rendimento da fermentação(%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	74
14a. Análise de variância (teste F), dos resultados de produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	76
14b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio .....	76



TABELA	Página
15a. Análise de variância (teste F), dos resultados de produtividade específica ( $h^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro .....	78
15b. Análise estatística (teste Duncan), dos resultados de produtividade específica ( $h^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições .....	78
16. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando a produtividade das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir na produtividade. Ensaio com inóculo convencional e mosto com 310g ART/litro .....	80
17. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando a produtividade das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir na produtividade. Ensaio com inóculo beneficiado e mosto com 310gART/litro .....	81
18. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando o rendimento das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir no rendimento. Ensaio com inóculo convencional e mosto com 310g ART/litro .....	83

19. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando o rendimento das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir no rendimento. Ensaio com inóculo beneficiado e mosto com 310g ART/litro .....	84
--	----

## RESUMO

Nas destilarias de álcool brasileiras utiliza-se o método de condução da fermentação denominado de "Melle-Boinot", que caracteriza-se pela recuperação e reciclagem de leveduras em ciclos de fermentações subsequentes. Contudo, juntamente com a reciclagem das leveduras ocorre a reciclagem de etanol e de outros componentes, que ao longo do processo ocorre de forma acumulativa. Ao final da fermentação o vinho é passado em centrífugas contínuas de pratos, para a separação do fermento, que contém as células de levedura, e da sua fase líquida que contém todos os componentes do vinho como água, etanol e metabólitos da fermentação, como metanol, propanol, butanol e álcool amílico. Da mesma forma, em fermentações contínuas o fermento centrifugado apresenta as mesmas características. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a interferência do etanol e metabólitos reciclados com o vinho sobre a performance fermentativa. As fermentações foram conduzidas em laboratório empregando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* catalogada pela ESALQ/USP como IZ 1904, e mosto preparado a partir de melaço. Foram conduzidos dois ensaios empregando-se mosto com concentrações nominais de 180 e 310g/L de açúcares redutores totais. Os tratamentos empregados foram: a) fermento convencional: recuperação da biomassa de levedura e sua ressuspensão em vinho; b) fermento beneficiado: recuperação de biomassa de levedura e sua ressuspensão em água. A condução do ensaio deu-se ao longo de oito fermentações com sete ciclos de fermento com três repetições de ensaios. Empregando-se a menor concentração de ART no mosto (180g/L) observou-se efeitos discretos dos tratamentos testados. Nesse caso os teores de açúcares redutores residuais (ARR) foram maiores para os inóculos convencionais. Com o emprego de mosto com 310g/L de ART as diferenças foram maiores, destacando-se sempre o inóculo beneficiado. Dos resultados obtidos pode-se concluir que a reciclagem de vinho, através da centrifugação para a recuperação do fermento, ao final da fermentação, recicla também metabólitos que interferem na performance fermentativa. Essa interferência negativa acentua-se ao longo dos ciclos e com o aumento do teor de ART no mosto de alimentação. Os resultados permitem inferir que deve-se estudar uma reestruturação no tratamento do fermento nas destilarias, de acordo com as possibilidades do uso de equipamentos ou processos, que permitam uma melhor separação do vinho das células de leveduras.

## SUMMARY

This trial was conducted to evaluate the influence of metabolites presents in wine, from separated materials by Melle-Boinot process in the parameters of alcoholic fermentation simulated in laboratory conditions. The experiments were taken using *Saccharomyces cerevisiae* (IZ 1904) and juice of molasse from Piracicaba County, State of São Paulo, Brazil, with two contents of Total Reducing Sugars in juice: 180 and 310g/L. The treatments were: yeast dispel in water (optimized culture) and yeast dispel in water and wine (conventional culture). The seven recycles were taken of yeast after the turn on the alcoholic fermentation. Using juice with 180g/L of TRS, the residual sugar contents in wine were greatest when conventional culture was used. Several differences were observed when the content of TRS in juice was 310g/L. From the results it can be concluded which: 1)The interference of the wine recycled on the metabolism of yeast is easily detected when the greatest sugar content in juice was used.2)The effects of metabolites on the metabolism of yeasts were verified. It is an indication of which the Melle-Boinot process may be optimized in industrials conditions.

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte das destilarias brasileiras utilizam o processo de fermentação denominado de "Melle-Boinot", de batelada alimentada com reciclagem da levedura em sucessivas fermentações. Mesmo em destilarias com processo de fermentação contínua é necessário o reaproveitamento de células de levedura do vinho fermentado. Tal reaproveitamento é realizado através da utilização de centrífugas, que promovem a separação de partículas pelos seus tamanhos ou por diferença de densidade. A centrífuga é composta por um conjunto de pratos superpostos, ficando a câmara de separação subdividida em diversos ambientes individuais. O vinho é alimentado pelo eixo central, de baixo para cima, e as partículas sólidas juntam-se na parede superior de cada ambiente e deslizam lateralmente em direção ao recinto de "lodo", sendo descarregadas da centrífuga através de bicos ejetores. A quantidade e o diâmetro do orifício dos bicos permitem a concentração dos sólidos em diferentes proporções; bicos com orifícios menores proporcionam maior concentração, contudo o problema de entupimento é maior.

O esquema ilustrativo dos componentes de uma separadora centrífuga pode ser visto na Figura 1.

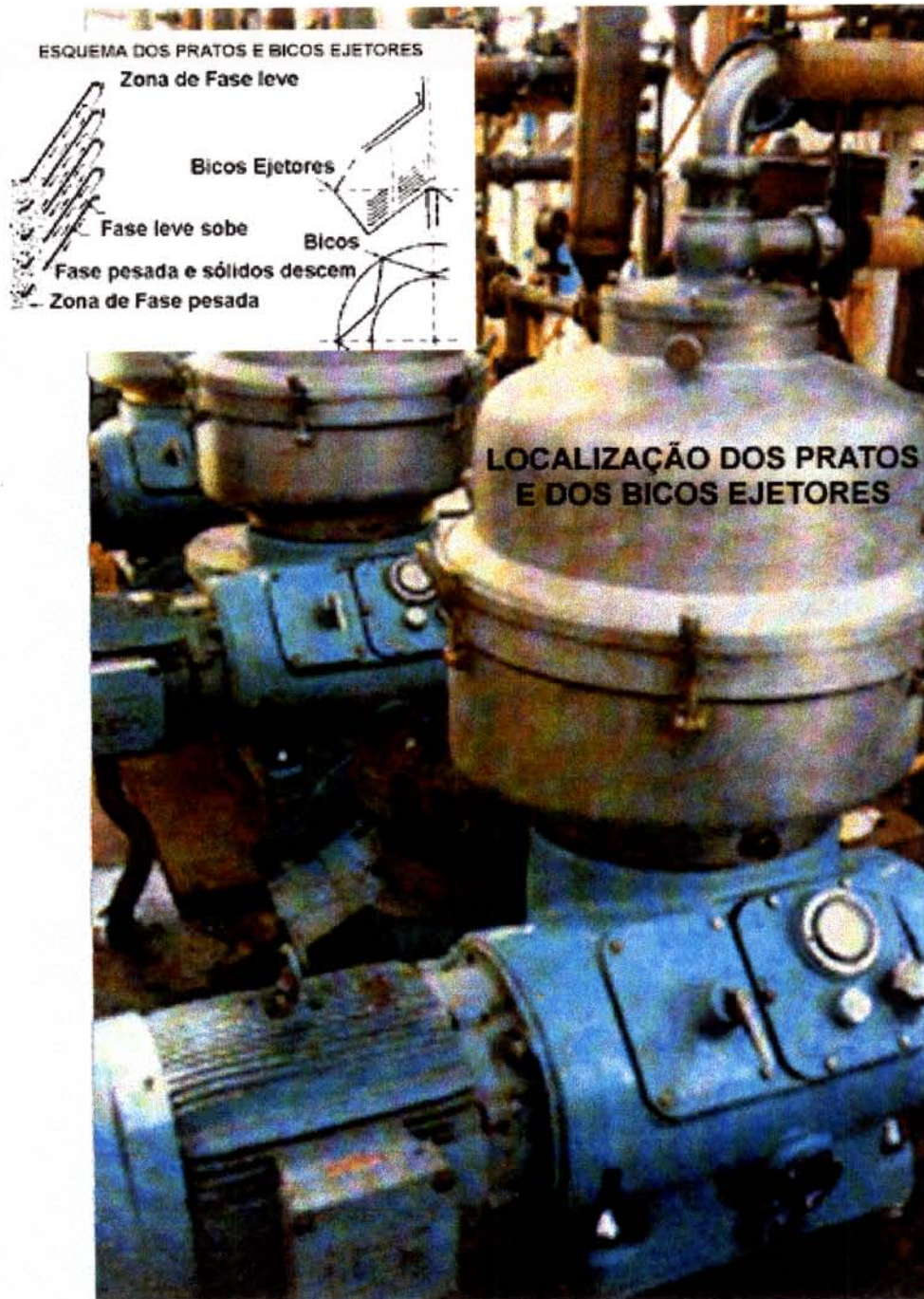


Figura 1. Detalhes de uma separadora centrífuga

A utilização da centrifugação, representou um grande avanço para o processo fermentativo, em relação aos processos clássicos de fermentação, utilizados anteriormente, como os processos de corte, de decantação das células de levedura ou de inóculos individuais; nesses processos as leveduras eram enviadas, parcial ou totalmente com o vinho, para a fase de destilação.

É fato notório que a utilização da separadora centrífuga nas destilarias de álcool proporciona, juntamente com a reciclagem de células, a reciclagem de etanol e outros metabólitos. O leite de levedura apresenta uma concentração alcoólica que pode até ultrapassar 4,5%, dependendo do teor de fermento no vinho.

A reciclagem de metabólitos, principalmente etanol, pode causar interferência no processo, contribuindo para a inibição da levedura e menor produtividade da fermentação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de fermento sem etanol e outros metabólitos e demonstrar o efeito negativo destes produtos, para propor o beneficiamento do fermento com vistas a obter-se fermentações mais rápidas, com maior produtividade e possibilitando maior vigor com menor índice de contaminação e até mesmo melhores rendimentos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O processo de fermentação alcoólica com recuperação de levedura**

As leveduras, por serem microrganismos anaeróbios facultativos quanto ao catabolismo de carboidratos, podem respirar e fermentar o substrato; a contribuição de cada um destes eventos depende das condições do meio (GANCEDO & SERRANO, 1989).

A utilização do substrato inicia-se pela sua absorção. A sacarose é absorvida na forma de glicose e frutose após a hidrólise pela invertase, tendo a absorção facilitada por enzimas permeases específicas (CARTWRIGHT et al., 1989).

O caldo de cana-de-açúcar e o melaço possuem todos os elementos minerais e alguns cofatores orgânicos de que a levedura necessita para a manutenção, multiplicação e fermentação alcoólica; para cada elemento existe uma faixa de concentração que beneficiará a multiplicação celular ou otimizará a fermentação (AMORIM, 1985). Ainda LIMA (1954) cita que a composição química da levedura é extremamente variável. Depende da linhagem, idade, do meio nutritivo e das condições em que é mantida a cultura. O conhecimento da composição química da levedura fornece a indicação dos elementos que deverão estar presentes nos meios nutritivos, bem como serve de base para a correção dos mostos das indústrias de fermentação em geral.



Segundo VASCONCELOS & VILELA FILHO (1988), à medida que se adiciona mosto à dorna de fermentação, a concentração de células vai diminuindo devido ao efeito da diluição ser significativamente maior que ao da multiplicação celular. Verificaram ainda que a produção percentual de etanol, na fase de alimentação do fermentador, representou uma média de cerca de 70% do total (com um mínimo de 62,80% e máximo de 75,25%).

HSIE (1981) relata que o efeito da quantidade do inóculo entre 5 - 10% v/v foi considerado satisfatório, e que inóculo acima de 10% não provoca aumento de eficiência porém o tempo de fermentação é reduzido. O inóculo pode ser diminuído a 1% v/v quando a fermentação se realiza em agitação de 100rpm.

Segundo AMORIM (1982) o tempo de fermentação está diretamente associado à quantidade de fermento na dorna, além de outros fatores. A redução do tempo de fermentação além de proporcionar uma economia significativa em dornas de fermentação reduz a chance de contaminações. Ainda PANCHAL & TAVARES (1990) relatam que em condições industriais de fabricação do etanol combustível, a fermentação é rápida devido às altas concentrações de inóculo utilizadas e às altas temperaturas.

Segundo LEME et al. (1984) o fermento obtido através das separadoras centrífugas em fermentação alcoólica industrial, tem as seguintes características gerais: concentração de células, 4 - 8%; teor alcoólico, 2 - 3%; viabilidade celular acima de 95%.

A reciclagem da levedura permite manter alta concentração celular e maior eficiência decorrente do menor consumo de açúcar para formação de células (CASEY et al., 1984; AMORIM et al., 1985).

RHEINBOLDT et al. (1987) citam que para a sangria da levedura ser viável é necessário realizar-se a recuperação de etanol, visto que em média tem-se 1 litro de etanol por 3kg de levedura seca no creme de levedura.

CASTRO (1985) cita que existem basicamente 3 métodos de fermentação: batelada, semi-contínua e contínua, sendo que, para produção de etanol os dois primeiros são os mais utilizados; em condições típicas a concentração de substrato gira em torno de 14 - 18% de açúcares fermentescíveis e o inóculo em torno de  $10^7$  células por mL, com o etanol numa faixa de 6 - 9 % p/v e com um rendimento teórico de 80 %.

Segundo NOVAES et al. (1974), o processo de fermentação com recuperação de leveduras, ou processo Melle-Boinot, consiste no reaproveitamento das células de leveduras de uma fermentação terminada, sendo que o esquema do processo pode ser visualizado na Figura 2.

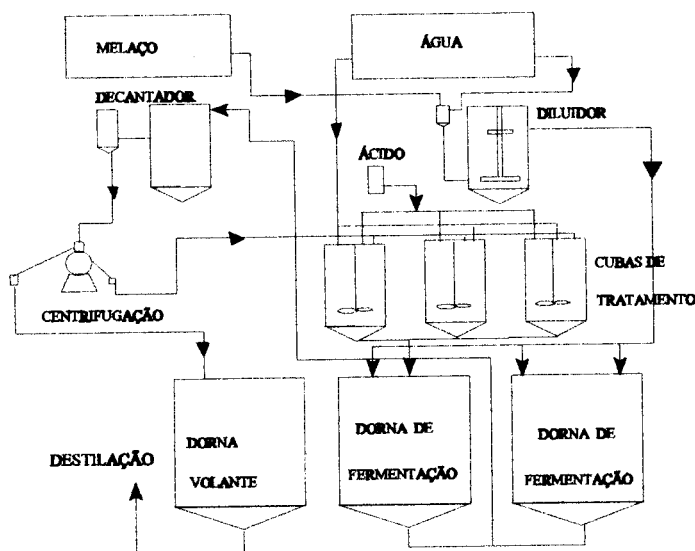


Figura 2. Processo de fermentação Melle-Boinot, com reciclo de fermento.

A produção de álcool é proporcional ao teor de fermento vivo nas dornas, ou seja, o aumento de produção deve seguir o aumento da massa de leveduras, até que se atinja uma concentração na faixa de 6 a 12% v/v (COPERSUCAR, 1987).

## **2.2. O Etanol e outros metabólitos da fermentação**

OURA (1977) cita que uma grande variedade de compostos, além do etanol e CO<sub>2</sub>, são produzidos durante a fermentação alcoólica, e ainda que alguns destes metabólitos estejam presentes apenas em pequenas concentrações no meio em fermentação, são de grande importância para os produtos fermentados.

O etanol é o metabólito produzido em maior quantidade pela levedura durante a fermentação, podendo tornar-se tóxico ocasionando queda na viabilidade celular (BROWN et al., 1981). Ainda NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1990) e HOPPE & HANSFORD (1982) citam que o etanol é mais tóxico quando gerado endogenamente do que quando adicionado ao meio, pois NAVARRO (1980) e NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1990) citam que ele acumula no interior celular. Contudo, parece haver consenso que o etanol não se acumula internamente (LOUREIRO & FERREIRA, 1983; VAN UDEN, 1985; D'AMORE et al., 1987; D'AMORE et al., 1988 e LEITE & FRANÇA, 1990), a não ser nos estágios iniciais da fermentação (D'AMORE et al., 1987; D'AMORE et al., 1988).

Segundo KUNKEE & AMERINE (1970), os principais álcoois superiores são n-propanol, isobutanol, isoamílico e amílico e estes estão presentes em vinhos em concentrações muito baixas, e podem contribuir para o estabelecimento de sua qualidade.

A adição de certos aminoácidos como: leucina, valina, isoleucina e treonina em fermentação alcoólica conduz a transformação destes nos seus correspondentes álcoois superiores (CACHOT et al., 1991).

Segundo WEEB & INGRAHAM (1963) os maiores componentes do óleo fúsel podem ser sintetizados a partir de aminoácidos por transaminação, descarboxilação e redução; sugerem que os componentes do óleo fúsel são subprodutos de metabolismo anaeróbico do nitrogênio, e ressaltam que álcoois superiores também podem ser produzidos por metabolismo direto das leveduras no açúcar, em pequenas proporções, e sugerem vias biossintéticas para formação de álcoois superiores, as quais podem ser visualizadas na Figura 3. GUTIERREZ (1994) cita que se o meio não apresentar aminoácidos, todos os álcoois superiores serão provenientes do açúcar.

Quando o meio fermentativo é aerado ocorre o favorecimento da formação de álcoois superiores, e os tipos que serão formados são influenciados pelo substrato e pelo potencial redox (GUYMON et al., 1961).

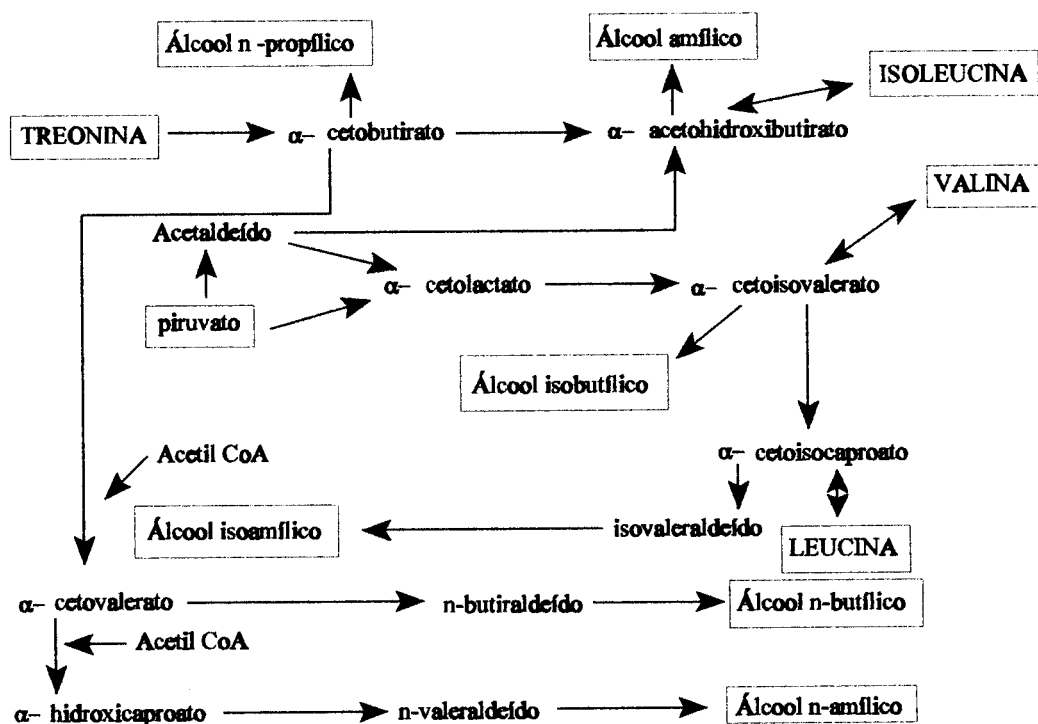


Figura 3. Vias biossintéticas para a formação de álcoois superiores (WEEB & INGRAHAM, 1963).

AMERINE & CRUESS (1960), relatam que o metanol não é produzido pela levedura em fermentação e sim derivado de hidrólises, principalmente da pectina.

MAIORELLA et al. (1983) estudando o efeito dos álcoois superiores nas células de leveduras, estabeleceram o início de inibição quando ocorria morte de 20% das células e inibição total quando mais de 80% das células morriam. Determinaram os valores relacionados à inibição inicial e total, para 1-propanol e 2-metil-1-butanol, obtendo os seguintes resultados:

Componentes	Inibição	
	inicial	total
1-propanol (g/L)	2,0	12,0
2-metil-1-butanol (g/L)	2,8	3,5

OKOLO et al. (1987) determinaram para *Saccharomyces cerevisiae* a DL20 e DL50 para os álcoois superiores n-butanol e isoamílico, obtendo os seguintes valores:

Componentes	DL20	DL50
n-butanol (g/L)	6,4	11,8
isoamílico (g/L)	1,9	4,3

BUENO NETO (1982) concluiu que o teor de etanol inibitório do crescimento celular foi de 56,6 g/L e que a variação em massa da produção de etanol obedece a uma regressão linear com o tempo durante o enchimento da dorna. Também concluiu que a produção de etanol está associada ao crescimento celular e que aumentando a produtividade tende a cair o rendimento das fermentações.

Segundo CACHOT et al. (1991) o teor de acetaldeído pode atingir no máximo cerca de 0,6 g/L, enquanto que para o isobutanol os valores giram em torno de 0,06 a 0,11 g/L. Segundo DRYSDALE & FLEET (1989), em fermentações para produção de vinho através de *Saccharomyces cerevisiae*, são normais os teores (g/L) de: ácido acético, 0,27; ácido láctico, 1,58; acetaldeído, 0,06; etanol, 95,2; álcool isoamílico, 0,37; glicerol, 1,17. Alguns componentes atingem valores máximos, quando em presença de bactérias contaminantes: ácido acético, 2,45; ácido láctico, 2,25; acetaldeído, 0,19.

LINDÉN et al. (1992) demonstraram que quanto maior o teor de ácido acético menor a concentração de etanol, nas faixas estudadas de ácido acético entre 0,5 a 2,4 g/L. Deve-se aceitar, também, que a produção de outros metabólitos é realizada em prejuízo do etanol, além de apresentarem interferência no processo fermentativo.

Cioffi, citado por MAYNARD (1954), encontrou teores de 0,14 a 1,72 g/L de álcoois superiores em vinhos de uva comercial.

Segundo MAIORELLA et al. (1983) a produtividade de uma fermentação pode ser limitada por produtos secundários. Novos processos estão sendo desenvolvidos, nos quais o etanol é removido do meio para evitar seu efeito inibidor. Exemplo são as fermentações a vácuo, com a concentração, no meio, dos produtos não voláteis; também o sistema de filtração em membranas, que pode concentrar moléculas grandes.

FUKUDA et al. (1993) citam que os teores para álcool amílico ativo e n-propanol em *sake* tem sido descrito em torno de 0,03 - 0,08 g/L e 0,008 - 0,120 g/L, respectivamente.

Durante o processo de fermentação alcoólica ocorre produção de massa celular, glicerol, ácido succínico, ácido acético, álcoois superiores, etc, que contribuem para menor eficiência da fermentação (GUTIERREZ, 1994).

LUONG (1985) cita que o valor máximo de etanol acima do qual as células não cresceram foi de 112 g/L, e que a capacidade de produção de etanol foi completamente inibida com 115 g/L de etanol.

### 2.3. Inibição da fermentação

PONS et al. (1989) trabalhando com fermentação alcoólica de sucos de frutas, em meio sintético, em fermentadores de 2 litros e utilizando mosto com 100g/L de ART, determinaram cinéticas de produção para diversos componentes, utilizando técnicas cromatográficas, chegando aos seguintes resultados:

-o primeiro componente a ser produzido é o aldeído acético,

-a maior velocidade de produção de etanol é obtida quando o teor de aldeído acético atinge seu máximo,

-para os sucos naturais, as velocidades de produção de etanol são ligeiramente menores que nos meios sintéticos.

GRAY (1945) cita que a capacidade de utilizar glucose para quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* variou com a concentração inicial do açúcar, afirmando que a inibição em altas concentrações de glucose é devida em parte ao fenômeno osmótico.

Em concentrações a partir de 2g/L de glucose ocorre repressão catabólica das enzimas respiratórias, tornando a fermentação a via principal de degradação do açúcar, mesmo em condições aeróbicas (CHAPMAN & BARTLEY, 1968). Esse fenômeno também é denominado de efeito Crabtree (RATLEDG & EVANS, 1989). Essa repressão pode chegar até a perda total das mitocôndrias (DUNTZE et al., 1969).



VEGA et al. (1987) estudaram o efeito de níveis de inóculo de levedura sobre a inibição da fermentação pelo etanol e concluíram que o substrato pode atuar sinergisticamente com o etanol provocando forte inibição. MOULIN et al. (1980) ressaltam que este efeito é variável de acordo com o açúcar do substrato. LETORNEAU & VILLA (1987) determinaram, em mosto de beterraba, que a partir de 177 g/L de açúcar, as velocidades específicas de crescimento sofrem quedas significativas.

ALMEIDA (1980) comparou os processos de batelada e batelada alimentada, em fermentações para a produção de etanol, por *Saccharomyces cerevisiae*. A concentração de açúcares de 270 g/L inibiram a fermentação no processo de batelada convencional, ou seja quando todo o açúcar foi introduzido no início da fermentação. A concentração de 25 g/L de etanol determinou o término da fase exponencial de crescimento, mesmo com adições de açúcares e de 80 g/L apresentou uma inibição total. Concluiu também que o processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibidor do açúcar na fase exponencial, visto que neste caso a adição de açúcar é distribuída durante o tempo de enchimento. Estudando o mesmo fenômeno WADA et al. (1981) aumentaram de 10% para 25% a glucose no meio e verificaram que ocorreu uma redução no crescimento de células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*, e a alimentação gradual reduziu este efeito. PEISINO (1987), por sua vez, verificou que as melhores condições para utilização de açúcar e manutenção da viabilidade celular acima de 80% para a levedura M-300-A e 90% para a Fleischmann, foi de 12,3% de açúcar na temperatura de 30°C.

D'AMORE et al. (1988) verificaram que aumentando a concentração de glucose de 10 para 20% houve redução da biomassa, enquanto houve aumento de produção de glicerol, de 0,34 para 1,01%. Entretanto, D'AMORE et al. (1987) não encontraram efeito negativo do aumento da concentração de açúcar sobre as velocidades de crescimento e de fermentação, tendo observado aumento na eficiência da produção de etanol, embora o glicerol tenha aumentado.

Com o aumento de 25 para 35% na concentração de sacarose, BAJPAI et al. (1988) verificaram uma redução na eficiência da fermentação de 91,6 para 78,9%, em células imobilizadas.

SWEERE et al. (1988) estudando o efeito da variação do teor de glucose sobre a produção de fermento de panificação chegaram à conclusão que a relação biomassa/etanol está intimamente ligada ao nível de glucose.

Segundo GUTIERREZ (1989), aumentando a concentração de sacarose diminui a eficiência das leveduras M-300-A, Fleischmann e Itaiquara, enquanto que as leveduras IZ 1904 e IZ 270 não sofreram efeitos dos níveis de sacarose, sendo que a faixa ensaiada foi de 8% a 16% de sacarose.

OMORI et al. (1995) relatam que a atividade da desidrogenase alcoólica em leveduras é menor quando a produção de glicerol é maior e isto ocorre quando o meio contém N inorgânico e citam também que a quantidade de álcool isoamílico aumenta com o aumento do glicerol produzido.

OHBUCHI et al. (1996) citam que a levedura utilizada para a produção de sake (*Saccharomyces cerevisiae*) é capaz de produzir mais que 20% (v/v) de etanol em cultura, e que a atividade da desidrogenase alcoólica é a chave na produção de álcool.

Segundo FERRARI et al. (1980), as linhagens de leveduras utilizadas na indústria são selecionadas para altas velocidades de fermentações, elevada eficiência, tolerância à glucose e etanol, baixo pH de fermentação e elevadas temperaturas de fermentação.

Segundo JIMENEZ & BENITEZ (1988), a tolerância ao etanol em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* é controlada geneticamente por um grande número de genes; conseqüentemente, é muito difícil obter leveduras mutantes altamente tolerantes ao etanol. Também é conhecido que alguns genes limitam a proliferação de células na presença de etanol.

O etanol age nas membranas lipoproteicas acarretando um enrijecimento INGRAM (1985) e afetando vários sistemas de transporte (LOUREIRO DIAS & PEINADO, 1982; LEÃO & VAN UDEN, 1982; PASCUAL et al., 1988 e PERLOT, 1989).

AIBA et al. (1968) estudaram o efeito da concentração de etanol sobre a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e produção de etanol, e confirmaram a influência do etanol na cinética fermentativa.

GHOSE & TYAGI (1979) provaram que em elevadas concentrações de etanol (87g/L) ocorre uma parada no crescimento celular e que acima de 114g/L cessa a produção de etanol, e propuseram as seguintes equações para a inibição:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left[ 1 - \frac{P}{P_m} \right]$$

$$v = v_{\max} \cdot \left[ 1 - \frac{P}{P_{me}} \right]$$

onde,

P = concentração de etanol (g/L)

$\mu$  max. = velocidade específica máxima de crescimento

$v$  max. = velocidade específica máxima de formação do produto

$\mu$  = velocidade específica de crescimento

$v$  = velocidade específica de formação do produto

$P_m$  = concentração de etanol, acima da qual as células não crescem (g/L)

$P_{me}$  = concentração de etanol acima da qual o etanol não é produzido

OKOLO et al. (1987) observaram que existe uma maior toxicidade quando álcoois superiores e o etanol encontram-se no meio, do que quando estão no meio isolados, pois as somas das toxicidades dos álcoois superiores dos ensaios onde foram aplicados isolados com as toxicidades do etanol quando também foram aplicados isolados, resultou em valores menores do que quando eram aplicados em conjunto.

NAGADOWITHANA & STEINKRAUS (1990) observaram uma queda de viabilidade em fermentações rápidas e consideraram que esse efeito fosse devido à toxidez do etanol intracelular. Contudo VEGA et al. (1987) haviam concluído anteriormente que com o aumento da concentração de inóculo, ocorria diminuição na severidade da inibição pelo etanol, sugerindo que essa variável era importante em modelo cinético de inibição da fermentação.

MILLAR et al. (1982) citam que enzimas glicolíticas são inibidas por concentrações altas de etanol (12% v/v) e podem ser responsáveis pelo declínio da fermentação.

LEÃO & VAN UDEN (1982) citam que o álcool produzido pela levedura na fermentação, exerce também um forte efeito tóxico sobre a mesma, causando uma inibição do tipo não competitiva.

LEÃO & VAN UDEN (1984) relatam que o etanol, isopropanol, propanol e butanol afetam a membrana lipoproteica, podendo assim comprometer a viabilidade celular.

LUONG (1985) estudou o efeito inibidor do etanol sobre o crescimento e fermentação de leveduras da cepa ATCC 4126 de *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições de batelada anaeróbia e os resultados obtidos revelam que não há grande diferença entre a resposta ao crescimento e fermentação alcoólica; propôs dois modelos de cinética de inibição de crescimento celular e de produção de etanol:

$$\frac{\mu_i}{\mu_0} = 1 - \left( \frac{P}{P_m} \right)^\alpha \quad (\text{crescimento})$$

$$\frac{\mu_i}{\mu_0} = 1 - \left( \frac{P}{P'_m} \right)^\beta \quad (\text{produção de etanol})$$

onde:

$\mu_i$  = velocidade de crescimento específico na presença de etanol (1/h),

$\mu_0$  = velocidade de crescimento específico com teor de etanol igual a zero (1/h),

P = concentração de etanol (g/L),

$P_m$  = concentração de etanol acima da qual não há crescimento de células (g/L),

$P'_m$  = concentração de etanol acima da qual não ocorre produção de etanol (g/L),

$\alpha$  e  $\beta$  = constantes da equação.

OKOLO et al. (1987) trabalhando com meio sintético, e utilizando linhagens de leveduras utilizadas em destilarias da Escócia, na concentração de  $10^6$  células por mL, e glucose na concentração de 200 g/L, agitação de 250 rpm e temperatura mantida a 30°C, determinaram que o aumento do teor de etanol provoca um decréscimo exponencial no número de células de levedura. Este fato alerta para a possibilidade de que, em meios onde a concentração de açúcares seja maior, possa ocorrer uma maior produção de etanol e outros produtos, os quais levariam a uma inibição ou até mesmo em uma diminuição da população de leveduras em fermentação, podendo provocar situações indesejadas, como por exemplo menor eficiência, devido a maior possibilidade de contaminação por bactérias, menor produtividade, devido aos menores teores de fermento no vinho, e outros tantos problemas oriundos de uma menor porcentagem de leveduras.

Há efeito inibidor do etanol e outros metabólitos na própria fermentação, visto que AIBA et al. (1968), estudando o efeito da concentração de etanol no meio confirmaram que a produção do próprio etanol e de células são influenciadas pelo etanol do meio.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Microrganismo e manutenção da cultura**

Durante o estudo foi utilizado o mesmo microrganismo e os mesmos procedimentos de manutenção.

##### **Microrganismo**

A levedura utilizada para a condução da fermentação alcoólica foi a *Saccharomyces cerevisiae* (IZ 1904), proveniente do Instituto Zimotécnico da ESALQ - USP, Piracicaba - SP, e segundo PLANALSUCAR (1994) esta levedura tem melhores características fermentativas (eficiência e produtividade) quando comparada com fermentos de panificação.

##### **Meio para manutenção**

Foi utilizado o meio YEPD sólido, contendo (g/L): glicose-20,0; peptona-20,0; extrato de levedura-10,0; ágar-18,0; água destilada para 1000mL.

## **Manutenção da cultura**

A cultura de *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1904 foi preservada em tubos com meio YEPD sólido inclinado, sob refrigeração a 5°C. A renovação da cultura foi realizada antes da ativação, por repicagem de células no meio, e incubação a 30°C durante 48 horas.

### **3.2. Ativação da cultura, propagação das células e preparo do inóculo inicial**

#### **Meio para propagação**

Melaço oriundo da fabricação de açúcar, sem sulfitação, fornecido pela Usina Costa Pinto (Piracicaba, SP) com Brix de 74,7°B e 68,2% de ART, foi diluído na concentração de 10° Brix e utilizado para obtenção de inóculo.

#### **Ativação da cultura**

A cultura foi ativada antes da fase de produção de inóculo para os experimentos de fermentação. Após crescimento da cultura no meio de manutenção, com auxílio da alça de inoculação, células foram transferidas para frasco de erlenmeyer com capacidade para 500mL, contendo 100mL do meio de propagação e incubadas a 30°C sob agitação de 250rpm, durante 24 horas.



## **Propagação de células para obtenção de inóculo**

Para obtenção de inóculo em quantidade adequada para a fermentação, a propagação foi realizada em dois ciclos. Aliquotas da cultura ativada foram transferidas para frascos erlenmeyer de 250mL contendo 100 mL do meio de propagação. O número de frascos utilizados nesta fase foi sempre igual ao número de frascos que foram usados na fermentação. As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação de 250rpm, durante 24 horas. A massa celular obtida foi separada por centrifugação (5600 x g, 10°C, 10min.), com cuidados de assepsia. As células oriundas de cada um dos frascos foram reinoculadas em condições idênticas, em frasco correspondente, e submetidas a crescimento como anteriormente. Após 24 horas as culturas foram novamente centrifugadas, e as biomassas combinadas e ressuspensas no volume total de meio necessário para o 1º ciclo fermentativo, para assegurar um inóculo inicial homogêneo, distribuindo-se, a seguir, volumes iguais nos frascos de fermentação.

### **3.3. Delineamento experimental**

#### **3.3.1. Meio para fermentação**

O melaço utilizado no item 3.2., foi diluído e esterilizado em autoclave (121°C, 1,0atm de pressão por 15 minutos) na concentração de 34° Brix, sendo posteriormente diluído a 180g de ART por litro, para o primeiro ensaio com reciclagem de levedura, e diluído a 310g de ART por litro para o segundo ensaio com reciclagem de levedura. Após a esterilização em autoclave foi determinado o teor de ART e este dado foi usado nos cálculos de balanço de massa.

### 3.3.2. Fermentação com reciclo de células

Os experimentos com 180 e com 310g de ART por litro no mosto, foram conduzidos de maneira análoga, por 8 ciclos consecutivos, através de reciclos sucessivos, em erlenmeyer de 250mL com 100g de mosto e 30g de inóculo. O final da fermentação foi determinado pelo peso constante, considerado término da liberação de CO<sub>2</sub>, medido por pesagens horárias.

O meio de fermentação após inoculado foi adequadamente homogeneizado e distribuído em erlenmeyer com 3 repetições de ensaio para cada tratamento. Os frascos permaneceram sob agitação de 80rpm e temperatura de 32°C até o final da fermentação, sendo que posteriormente foram retirados 10mL para efetuar as análises. O vinho remanescente foi separado por centrifugação (5600 x g, 10°C, 10min), e a biomassa coletada de cada frasco, foi ressuspensa em novo meio de fermentação, em frasco correspondente, iniciando-se o 2º ciclo fermentativo, sendo que houveram dois tratamentos conforme o preparo destes inóculos do 2º ciclo em diante.

No primeiro tratamento, após a fermentação inicial, os inóculos foram preparados com a massa celular obtida na centrifugação do vinho obtido na fermentação anterior, diluída com 15g de vinho centrifugado, acertando o pH a 2,5 com ác. sulfúrico e completando a massa a 40g com água destilada. Esse inóculo foi denominado de **inóculo convencional**.

No segundo tratamento, após a fermentação inicial, os inóculos foram preparados com a massa celular obtida na centrifugação do vinho obtido na fermentação anterior, completando a 40g com água destilada e acertado o pH a 2,5 com ác. sulfúrico. Esse inóculo preparado foi denominado de **inóculo beneficiado**.

Em ambos tratamentos foram usados 30g de inóculo dos 40g preparados.

Em resumo, os ensaios e tratamentos foram os seguintes:

1. Ensaio com mosto de 180g ART por litro.

8 ciclos com 2 tratamentos e 3 repetições de ensaio.

Tratamento 1: inóculo convencional

Tratamento 2: inóculo beneficiado

2. Ensaio com mosto de 310g ART por litro

8 ciclos com 2 tratamentos e 3 repetições de ensaio

Tratamento 1: inóculo convencional

Tratamento 2: inóculo beneficiado

Os ensaios com mosto de 180 e 310g ART/litro, foram realizados em condições idênticas e com igual número de fermentações com reciclo de fermento: F1 - fermentação inicial; F2 - fermentação de primeiro reciclo; F3 - fermentação de segundo reciclo; F4 - fermentação de terceiro reciclo; F5 - fermentação de quarto reciclo; F6 - fermentação de quinto reciclo; F7 - fermentação de sexto reciclo; F8 - fermentação de sétimo reciclo.

### **3.3.3. Cinética da produção de CO<sub>2</sub>**

A determinação de CO<sub>2</sub> produzido foi realizada por pesagens horárias em balança digital, sendo que o final da fermentação foi considerado quando cessava a produção de CO<sub>2</sub>, ou seja, quando o valor da pesagem repetia-se. O procedimento de balanço de massa para as fermentações é descrito por COPERSUCAR (1987).

### **3.3.4. Viabilidade de células e brotos**

A viabilidade de células foi feita em microscópio, em câmara de Neubauer espelhada, determinando-se o número de células vivas, células mortas, e de brotos (vivos e mortos) na cultura. Após homogeneização adequada dos frascos, amostras de 1mL foram colhidas e diluídas em água destilada, de modo a ter sempre um número de células superior a 200 em cada campo. A uma amostra da mistura diluída foi adicionada solução de eritrosina na proporção 1:1, para coloração de células mortas (SHARF, 1972). A determinação foi conduzida em seguida, contando-se 5 retículos de cada um dos dois campos da câmara.

Ao efetuar a determinação, os brotos foram considerados separadamente, e portanto, a viabilidade celular e a viabilidade dos brotos foram calculados em relação ao número total de células (vivas + mortas) ou de brotos (vivos + mortos).

### **3.3.5. Determinação de açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ADNS, segundo descrição de TRÍBOLI (1987). A quantificação foi conduzida com a prévia hidrólise da sacarose com ácido clorídrico 1,3N; 25mL deste ácido foram adicionados a 5mL da amostra, sendo a solução mantida a 60-65°C durante 15 minutos, seguida de neutralização com hidróxido de sódio 4N, tendo como indicador fenolftaleína.

### **3.3.6. Determinação de etanol e álcoois superiores**

Após centrifugação da cultura para a separação da biomassa entre os ciclos, amostras do vinho fermentado foram armazenadas a -15°C, e analisadas posteriormente para determinar o teor de etanol, n-propanol, isopropanol, metanol, isobutanol, n-butanol e álcool amílico, em cromatógrafo gasoso.

Soluções de etanol a 5 e 10% foram utilizadas como padrão externo. Acetona foi usada como padrão interno (10%), para corrigir possíveis erros na injeção das amostras.

As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes:

Coluna: HP-FFAP capilar, 50 m

Temperaturas de injeção: 120°C; rampa de 60°C a 200°C, elevando-se 2°C por minuto; detector a 220°C

Fluxo de He: 1 mL/min.

A partir da porcentagem de etanol produzido (% v/v), e das densidades do etanol, n-propanol, isopropanol, metanol, isobutanol, n-butanol e álcool amílico, e tabelas de %v/v de álcool e suas densidades, calculou-se o peso do etanol e dos demais componentes em gramas/100g.

### **3.4. Reagentes, vidraria e equipamentos**

#### **Reagentes**

Os principais reagentes utilizados foram o ácido 3,5-dinitrossalicílico ADNS (Merck) e eritrosina.

#### **Preparo da solução de eritrosina**

Uma solução estoque de eritrosina foi preparada dissolvendo-se 1 g de eritrosina B em 100 mL de água destilada esterilizada. Para coloração preparou-se uma solução de corante de concentração 1:5000, diluindo-se 1 mL da solução estoque em 50 mL de tampão fosfato 0,2M, pH 7,0.

## **Vidraria**

Foi utilizada vidraria de uso comum em laboratório de microbiologia. As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer, os quais receberam tampões de borracha adaptados com tubo de vidro em "L" para escape do CO<sub>2</sub>.

## **Equipamentos**

Incubadora New Brunswick Scientific G 27; cromatógrafo gasoso - HP 5890 acoplado a sistema integrador e impressora; capela de fluxo laminar horizontal - Veco; microscópio Balplan, Bausch & Lomb; centrífuga refrigerada Sorwall RC-5B, rotores GSA e SS 34; espectrofotômetro UV-VIS - Beckman DU-70; refratômetro Bausch & Lomb; banho-maria Contraves Rheotherm; balança analítica, balança digital, potenciômetro - Micronal.

### **3.5. Análise estatística**

Os parâmetros independentes e que refletem a ação dos tratamentos aplicados, foram submetidos a análise de variância (teste F) no delineamento de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo 2 tratamentos (inóculo convencional e inóculo beneficiado), 8 subtratamentos (as fermentações) e 3 blocos (as repetições dos ensaios), conforme GOMES (1990). A comparação de médias foi feita através do teste estatístico de Duncan (GOMES, 1990), com intervalos de confiança ao nível de 5%. Foi utilizado com este intuito o programa SANEST 2, segundo (SARRIES et al., 1992). Foram também analisadas correlações entre as variáveis estudadas pelo método "Stepwise"(passo a passo).

### 3.6. Balanço de massa

Com o auxílio de planilhas eletrônicas confeccionadas no Microsoft Excel 5.0, foram realizados os seguintes cálculos:

Para cada fermentação, de posse dos valores obtidos nas pesagens horárias, foram calculados os valores de CO<sub>2</sub> liberado de hora em hora, bem como o valor total de CO<sub>2</sub> liberado, tempo total de fermentação e obtidos os valores das velocidades de liberação de CO<sub>2</sub> (r), sendo que:

$$r = \frac{\text{CO}_2 \text{ liberado até o momento (g)}}{\text{tempo (h)}}$$

A partir de análises cromatográficas, calculou-se os valores de etanol, metanol, n-propanol, i-butanol, n-butanol e amílico em %volume para as fermentações com 310gART/L no mosto e apenas etanol em %volume para as fermentações com 180gART/L no mosto.

De acordo com as análises do vinho e com o procedimento de preparo do inóculo (adição ou não de vinho), foi calculada a composição do inóculo para a fermentação subsequente (C<sub>produto</sub>) com relação ao etanol, metanol, n-propanol, i-butanol, n-butanol e amílico:

$$C_{\text{produto}} = \frac{\text{vinho utilizado (g)} \times \text{Concentração no vinho (g/100g)}}{\text{inóculo final (g)}}$$



Para as fermentações com 310g ART/L no mosto foram determinadas viabilidade e viabilidade de broto, bem como a % de células em volume e a concentração celular em g/L.

Determinou-se os teores de ARR (g/L) no vinho centrifugado e os valores de ART nos mostos utilizados em g/100g de mosto.

Com auxílio de um programa específico desenvolvido em Turbo Pascal 7.0 (APÊNDICE 1), o qual utilizando tabelas de % volume (INPM, 1967) de etanol foram calculados os teores de etanol em %peso para todas as amostras.

Utilizando-se de um programa desenvolvido em Turbo Pascal 7.0 (APÊNDICE 2) calculou-se as massas específicas de cada mosto utilizado de acordo com seu Brix refratométrico de acordo com tabelas de COPERSUCAR (1987).

Com os valores obtidos de %v e utilizando as densidades segundo ASSUMPÇÃO & MORITA (1968),  $d_{\text{etanol}} = 0,78934$ ;  $d_{\text{metanol}} = 0,7915$ ;  $d_{\text{n-propanol}} = 0,8035$ ;  $d_{\text{i-butanol}} = 0,80196$ ;  $d_{\text{n-butanol}} = 0,80961$ ;  $d_{\text{amílico}} = 0,81206$ , e de um programa (ANEXO 3), o qual calculou as densidades das soluções ( $d_{\text{solução}}$ ) através de seu teor alcoólico, utilizando tabelas de INPM (1967), pôde-se então calcular os teores destes componentes em  $C_{(g/100g)}$  e em  $C_{\text{ppm}}$ .

$$C_{g/100g} = C_{\%v/v} \times \frac{d_{\text{composto}}}{d_{\text{solução}}} \quad \text{e} \quad C_{\text{ppm}} = C_{g/100g} \times 10.000$$

Para calcular a densidade do vinho bruto ( $d_{\text{vb}}$ ) utilizou-se a média ponderada entre a densidade da levedura 1,08, segundo COPERSUCAR (1987) e a densidade obtida de acordo com o teor alcoólico no vinho delevurado ( $d_{\text{vd}}$ ). A ponderação foi realizada utilizando-se a concentração celular ( $C_{\text{cel.}}$ ), obtida em análise em (g/L).

$$d_{vb} = \frac{\left( \frac{C. cel. (g/L)}{10} \right) \times 1,08 + \left[ 100 - \left( \frac{C. cel. (g/L)}{10} \right) \right] \times d_{vd}}{100}$$

Com a densidade do vinho bruto ( $d_{vb}$ ) e a concentração celular (C) em (g/L), calculou-se a concentração celular (C) em (g/100g).

$$C_{(g/100g)} = \frac{C_{(g/L)}}{10 \times d_{(vb)}}$$

De posse do valor do peso final do vinho bruto ( $P_{vb}$ ), dado obtido por pesagem, e com a concentração celular (C) em g/100g, obteve-se o peso de levedura em g no final da fermentação ( $P_{lev}$ ), bem como o peso de vinho delevurado ( $P_{vd}$ ) em (g).

$$P_{lev} (g) = \frac{C_{g/100g} \times P_{vb} (g)}{100} \quad e \quad P_{vd} (g) = P_{vb} (g) - P_{lev} (g)$$

Como o ARR em (g/L), foi analisado no vinho delevurado, com a densidade do vinho delevurado ( $d_{vd}$ ) e o peso ( $P_{vd}$ ) pôde ser calculado ARR (g/100g) e ARR (g).

$$ARR_{(g/100g)} = \frac{ARR_{(g/L)}}{10 \times d_{vd}} \quad e \quad ARR_{(g)} = \frac{ARR_{(g/100g)} \times P_{vd}}{100}$$

Com os valores medidos de peso de mosto ( $P_m$ ) e a concentração de ART no mosto em (g/100g), calculou-se o valor de ART em (g) fornecido e determinou-se o valor de ART consumido (g) pela diferença com o ARR (g).

$$ART_{fornecido (g)} = \frac{ART_{(g/100g)} \times P_m(g)}{100} \quad e \quad ART_{consumido(g)} = ART_{fornecido (g)} - ARR_{(g)}$$

Com os valores de etanol (g) ( $E_{ferm(i)}$ ), o peso de vinho adicionado no inóculo ( $P_{v.ferm(i-1)}$ ) e etanol no vinho adicionado ao inóculo ( $E_{(g/100g) \text{ no vinho } (i-1)}$ ), pode ser calculado o valor de etanol produzido ( $E_{produzido \text{ ferm. } (i)}$ ).

$$E_{produzido \text{ ferm. } (i)} (g) = E_{ferm. (i)} (g) - \left[ \frac{P_{v. \text{ ferm. } (i-1)} \text{ adicionado ao inóculo} \times E_{(g/100g) \text{ no vinho da ferm. } (i-1)}}{100} \right]$$

### 3.7. Cálculo da eficiência da levedura

A eficiência da levedura (%) no presente trabalho, foi calculada utilizando-se dos valores de etanol produzido (g) e de ART consumido (g), pela seguinte equação:

$$Eficiência = \frac{Etanol \text{ produzido } (g) \times 10.000}{ART \text{ consumido } (g) \times 51,11} \%$$

### 3.8. Cálculo do rendimento da fermentação

O rendimento da fermentação no presente trabalho, foi calculado utilizando-se dos valores de etanol produzido (g) e de ART no mosto (g), pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Etanol produzido (g)} \times 10.000}{\text{ART no mosto (g)} \times 51,11} \%$$

### 3.9. Cálculo da produtividade da fermentação

A produtividade da fermentação no presente trabalho foi calculada utilizando o etanol produzido em (g/L) e o tempo total de fermentação (h), pela seguinte equação:

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Etanol produzido (g/L)}}{\text{Tempo total (h)}} \quad (\text{g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1})$$

### 3.10. Cálculo da produtividade específica da fermentação

A produtividade específica da fermentação somente foi calculada para os ensaios com mosto de concentração de 310g de ART/L, pois somente nestes ensaios foram determinadas as concentrações celulares, o cálculo utilizou o etanol produzido (g/L), a concentração celular (g/L) e o tempo total de fermentação (h), segundo a equação:

$$\text{Produtividade específica} = \frac{\text{Etanol produzido (g/L)}}{\text{Concentração celular (g/L)} \times \text{Tempo total (h)}} \quad (\text{h}^{-1})$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Ensaio com fermentações utilizando mosto com concentração de 180g ART/Litro

Com 180g ART/L obteve-se um teor alcoólico final médio calculado de 5,3g/100g (cerca de 6,8% v/v), no tratamento com reciclo de inóculo convencional, o que leva a concluir que estes teores alcoólicos são insuficientes para causar inibição significativa da levedura em fermentação. BUENO NETO (1982) relata que somente o teor de 7,2% v/v foi inibitório para o crescimento celular. GHOSE & TYAGY (1979), por sua vez, relataram que o teor de etanol de 11,1% v/v causa parada no crescimento celular e acima de 14,5% não há mais produção de etanol.

Os resultados de produção de CO<sub>2</sub> indicam, na Figura 5, que nas fermentações realizadas nestes ensaios não ocorreram inibição da levedura, fato que está em concordância com BUENO NETO (1982), o qual cita que o etanol torna-se inibitório acima de aproximadamente 7,2 %v/v. Por outro lado, os dados de CO<sub>2</sub> indicam que com mosto de 180g ART/L a fermentação desenvolveu-se dentro dos parâmetros normais, o que está em concordância com CASTRO (1985), que relata fermentações normais com substrato variando de 14-18%, resultando em etanol no meio de 6-9% v/v e rendimento teórico de 80%

#### **4.1.1. Cinética da produção de CO<sub>2</sub>**

Nestes ensaios (mosto com 180g ART/L) não ocorreram diferenças entre as médias dos tratamentos 1 e 2 (inóculo convencional e beneficiado, respectivamente), como pode ser visualizado na Figura 4 na qual são apresentadas as curvas de velocidade de produção de CO<sub>2</sub> no decorrer das fermentações realizadas com o reciclo de fermento. Na Figura 5 são apresentadas as médias de CO<sub>2</sub> acumulado das diversas fermentações (F1 a F8), no decorrer da fermentação.

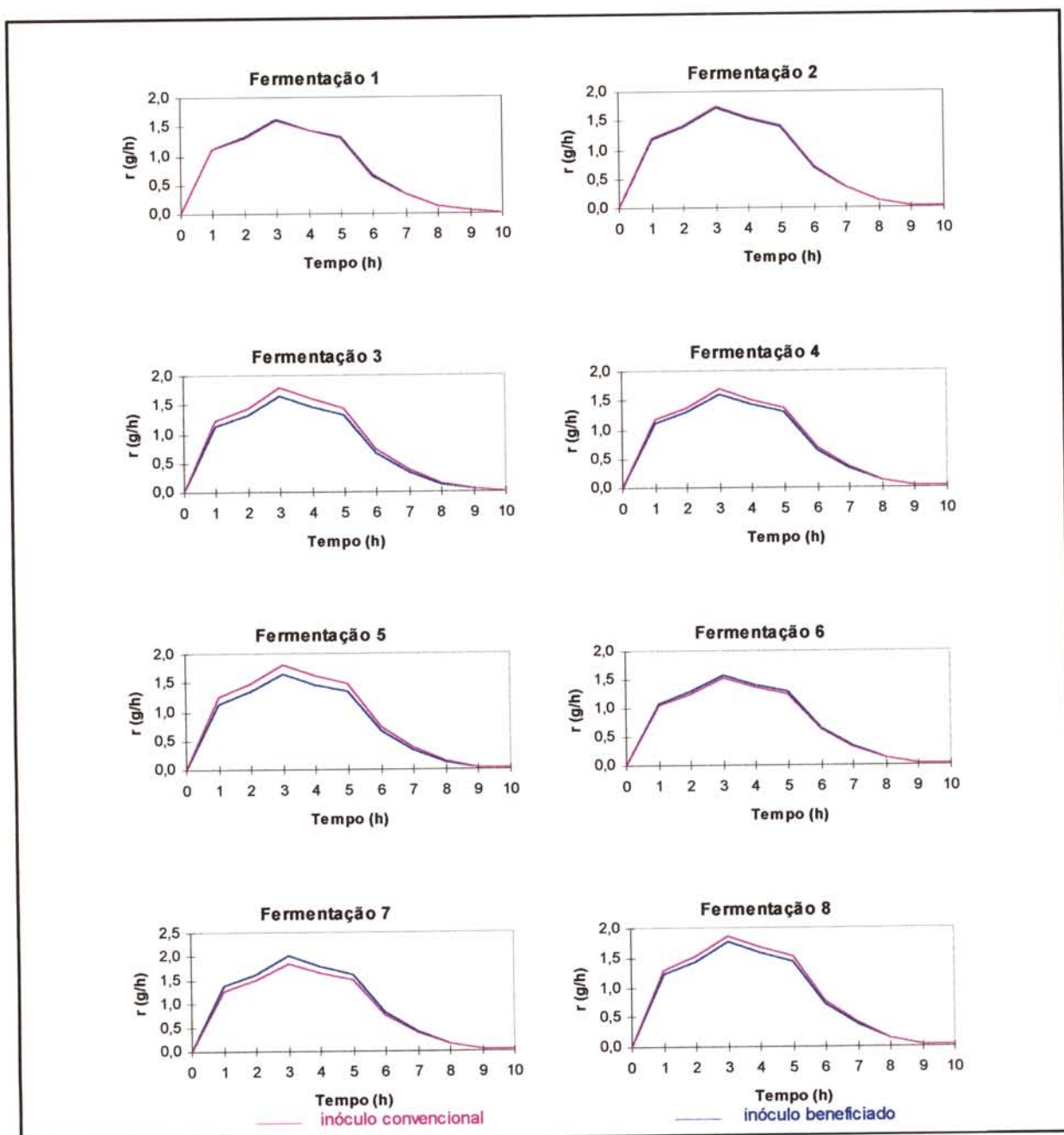


Figura 4. Cinética da velocidade de produção de CO<sub>2</sub> (g/h) das fermentações com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

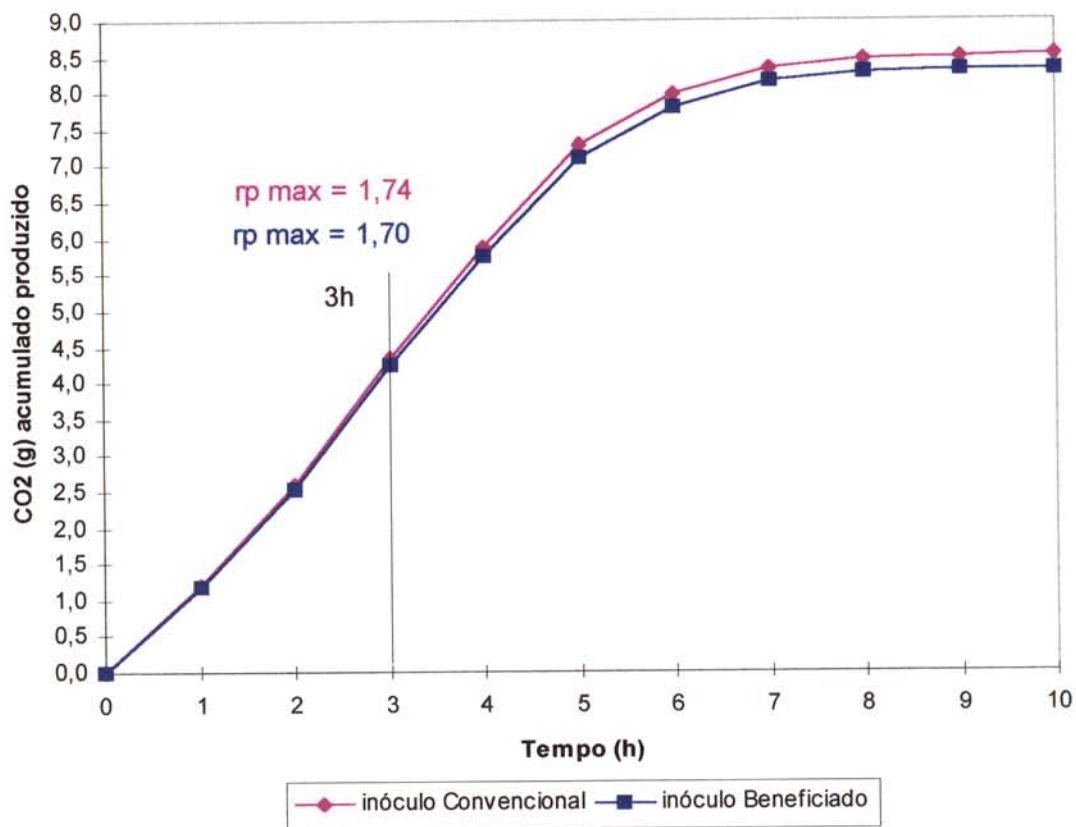


Figura 5. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações (F1 a F8) com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.



## **4.1.2. Controle das fermentações**

### **4.1.2.1. Açúcares Redutores Totais (residuais e consumidos) e tempo de fermentação**

Pode ser observado, na Tabela 1, que ocorreu uma tendência de aumento dos açúcares redutores residuais para as fermentações com inóculo convencional, até a quarta fermentação, sendo que para inóculo beneficiado apenas a primeira fermentação apresentou teor menor que as demais, sendo que da quarta fermentação em diante os teores de açúcares residuais foram menores que nas fermentações com inóculo convencional. Isto levou a uma média geral para fermentações com inóculo convencional bem maior que a média das fermentações com inóculo beneficiado.

Com relação aos açúcares redutores consumidos, é observado, na Tabela 1, que até a terceira fermentação não detectou-se diferença entre inóculo beneficiado e inóculo convencional. Após esta os teores de açúcares consumidos para as fermentações com inóculos convencionais foram sempre menores e para ambos tratamentos apresentaram uma tendência de diminuição com os ciclos, sendo na média o teor de açúcar redutor consumido para fermentações com inóculo beneficiado maior que para fermentações com inóculo convencional. Como citado por CARTWRIGHT et al. (1989), a utilização dos açúcares inicia-se pela absorção, fato que leva a conclusão que uma menor absorção de açúcares ocorreram nestes casos.

Tabela 1. Resultados de açúcares redutores residuais, açúcares redutores totais consumidos e tempo de fermentação, com o uso de inóculos convencional (c) e beneficiado (b), nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

Fermentação	Inóculo	ART		Tempo de fermentação (h)
		residual (g/L)	consumido (g/L)	
F1	c/b	3,90	174,85	9
	c/b	3,90	174,85	9
F2	c	8,30	203,93	10
	b	7,71	204,52	10
F3	c	8,02	170,74	9
	b	7,47	171,29	9
F4	c	12,67	168,22	10
	b	7,64	173,25	10
F5	c	12,50	169,36	10
	b	7,51	174,35	10
F6	c	12,70	169,12	10
	b	7,71	174,11	10
F7	c	12,55	168,97	10
	b	7,47	174,05	10
F8	c	12,30	169,55	10
	b	7,26	174,59	10

Com relação ao tempo de fermentação pode ser observado, na Tabela 1, que pouco variou, tendo o término da fermentação em 9 - 10 horas em ambos tratamentos e em todas as fermentações. Este relativamente curto tempo de fermentação alcoólica é citado por PANCHAL & TAVARES (1990), como resultado das altas concentrações de inóculo e altas temperaturas.

#### **4.1.2.2. Etanol**

Com relação a variável Etanol, pode ser observada, na Tabela 2, apenas que nas fermentações com inóculo convencional o teor de etanol foi maior, fato que é óbvio, visto que neste tratamento houve um reciclo de etanol para as fermentações. Consequentemente pode-se dizer que com relação ao teor de fermento também ocorreu o mesmo, pois COPERSUCAR (1987) cita que entre 6 - 12%v/v a produção de etanol é proporcional à produção de fermento.

Tabela 2. Resultados de etanol no vinho e etanol produzido com uso de inóculos convencional e beneficiado nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

Fermentação	inóculo	etanol			
		vinho		produzido	
		%v	% p	%v	% p
F1	c/b	6,20	4,97	6,20	4,97
	c/b	6,20	4,97	6,20	4,97
F2	c	7,52	6,01	6,97	5,57
	b	6,25	4,91	6,25	4,91
F3	c	7,52	5,97	6,87	5,46
	b	6,71	5,43	6,71	5,43
F4	c	6,4	5,1	5,76	4,59
	b	5,87	4,73	5,87	4,73
F5	c	6,37	5,11	5,83	4,68
	b	5,83	4,71	5,83	4,71
F6	c	6,55	5,3	6,01	4,86
	b	5,95	4,79	5,95	4,79
F7	c	6,53	5,27	5,96	4,81
	b	5,93	4,74	5,93	4,74
F8	c	6,34	5,14	5,79	4,70
	b	5,81	4,72	5,81	4,72

#### **4.1.2.3. Eficiência da levedura**

Na Tabela 3a observa-se que o teste F detectou diferenças a 1% de probabilidade com relação a eficiência da levedura, para as fermentações, contudo na Tabela 3b nota-se que o teste de Duncan não achou nenhuma diferença. Deve-se observar que esta variável eficiência da levedura leva em consideração o etanol produzido e o açúcar consumido para seu cálculo, podendo então concluir que o comportamento da levedura nestes ensaios foram idênticos.

#### **4.1.2.4. Rendimento da fermentação**

Com relação ao rendimento da fermentação, que leva em consideração o etanol produzido e o açúcar fornecido, observa-se na Tabela 4a que o teste F detectou diferenças apenas para as fermentações, contudo o teste de Duncan não detectou diferenças, Tabela 4b.

#### **4.1.2.5. Produtividade da fermentação**

Com relação à produtividade da fermentação, que leva em consideração o etanol produzido em relação ao tempo, observa-se na Tabela 5a que o teste F detectou diferenças apenas para as fermentações, contudo o teste de Duncan não detectou diferenças, Tabela 5b.

Tabela 3a. Análise de variância (teste F) dos resultados de eficiência da levedura, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	57,26	28,63	0,32 NS
Tratamentos	1	48,26	48,26	0,53 NS
Resíduo(A)	2	179,06	89,53	
Parcelas	5	284,59		
Fermentações	7	649,85	92,84	3,83**
Tratam. x Ferm.	7	63,36	9,05	0,37 NS
Resíduo(B)	28	679,61	24,27	
Total	47	1677,40		

Média Geral = 63,47 e Coeficiente de Variação(A) = 5,27% Coeficiente de Variação(B) = 7,76 %

Tabela 3b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de eficiência da levedura, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, com 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	eficiência (%)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	65,13	65,13
Segunda Fermentação	62,21	54,75
Terceira Fermentação	72,68	71,33
Quarta Fermentação	62,30	62,60
Quinta Fermentação	62,75	61,8
Sexta Fermentação	65,17	62,22
Sétima Fermentação	62,75	60,37
Oitava Fermentação	62,79	61,53
Médias	64,47 <sup>A</sup>	62,47 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

Tabela 4a. Análise de variância (teste F) dos resultados de rendimento da fermentação, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	58,51	29,26	0,36 NS
Tratamentos	1	7,44	7,44	0,09 NS
Resíduo(A)	2	165,05	82,53	
Parcelas	5	231,00		
Fermentações	7	673,52	96,22	4,37**
Tratam. x Ferm.	7	77,71	11,10	0,50 NS
Resíduo(B)	28	616,36	22,01	
Total	47	1598,60		

Média Geral = 60,46 e Coeficiente de Variação(A) = 5,31 e Coeficiente de Variação (B) = 7,76%

Tabela 4b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de rendimento da fermentação, nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, com 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	rendimento (%)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	63,71	63,71
Segunda Fermentação	59,78	52,76
Terceira Fermentação	69,41	68,36
Quarta Fermentação	57,93	59,95
Quinta Fermentação	58,44	59,24
Sexta Fermentação	60,63	59,58
Sétima Fermentação	58,42	57,88
Oitava Fermentação	58,54	59,07
Médias	60,86 <sup>A</sup>	60,07 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

Tabela 5a. Análise de variância (teste F) dos resultados de produtividade ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 180g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	0,104	0,052	0,11 NS
Tratamentos	1	0,090	0,090	0,18 NS
Resíduo(A)	2	1,000	0,499	
Parcelas	5	1,192		
Fermentações	7	10,939	1,563	8,79**
Tratam. x Ferm.	7	0,439	0,063	0,35 NS
Resíduo(B)	28	4,978	0,178	
Total	47	17,548		

Média Geral = 4,97 e Coeficiente de Variação(A) = 5,02 e Coeficiente de Variação(B) = 8,48%

Tabela 5b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de produtividade ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 180g ART/litro, média de 3 repetições.

Ordem da Fermentação	produtividade ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	5,43	5,43
Segunda Fermentação	5,50	4,94
Terceira Fermentação	6,03	5,88
Quarta Fermentação	4,55	4,63
Quinta Fermentação	4,60	4,6
Sexta Fermentação	4,75	4,7
Sétima Fermentação	4,71	4,68
Oitava Fermentação	4,57	4,58
Médias	5,02 <sup>A</sup>	4,93 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.



## **4.2. Ensaio com fermentações utilizando mosto com concentração de 310g ART/Litro**

### **4.2.1. Cinética da produção de CO<sub>2</sub>**

Na Figura 6 observa-se o comportamento da velocidade de produção de CO<sub>2</sub> para as médias das fermentações em relação ao tempo. Podendo ser observado que após a segunda fermentação as curvas para inóculos convencionais e beneficiados mostraram comportamento diferenciado entre si e também fugiram da curva característica, sugerindo que algum fator influenciou no desenrolar das fermentações, sendo que a diferença crucial entre estes ensaios e os citados anteriormente foi a concentração de açúcares no mosto, que naturalmente provoca alteração no processo fermentativo como citado por GRAY (1945). E segundo VEGA et al. (1987) o substrato pode atuar sinergisticamente com o etanol provocando forte inibição, fato que explicaria a diferença de comportamento entre os inóculos convencionais e beneficiados.

Pode ser observado na Figura 7a, que para a média das primeiras fermentações não houve diferença apreciável, tanto na tendência das curvas, bem como no valor de  $r_p$  máximo, os quais variaram entre 0,63, obtido com oito horas de fermentação, e 0,65, obtido com dez horas de fermentação. Estes valores representam as velocidades instantâneas de produção de CO<sub>2</sub>. Deve-se ressaltar que nesta primeira fermentação os inóculos foram preparados da mesma maneira, sendo a designação "inóculo beneficiado" e "inóculo convencional", apenas para separar os ensaios que foram realizados com os produtos desta primeira fermentação.

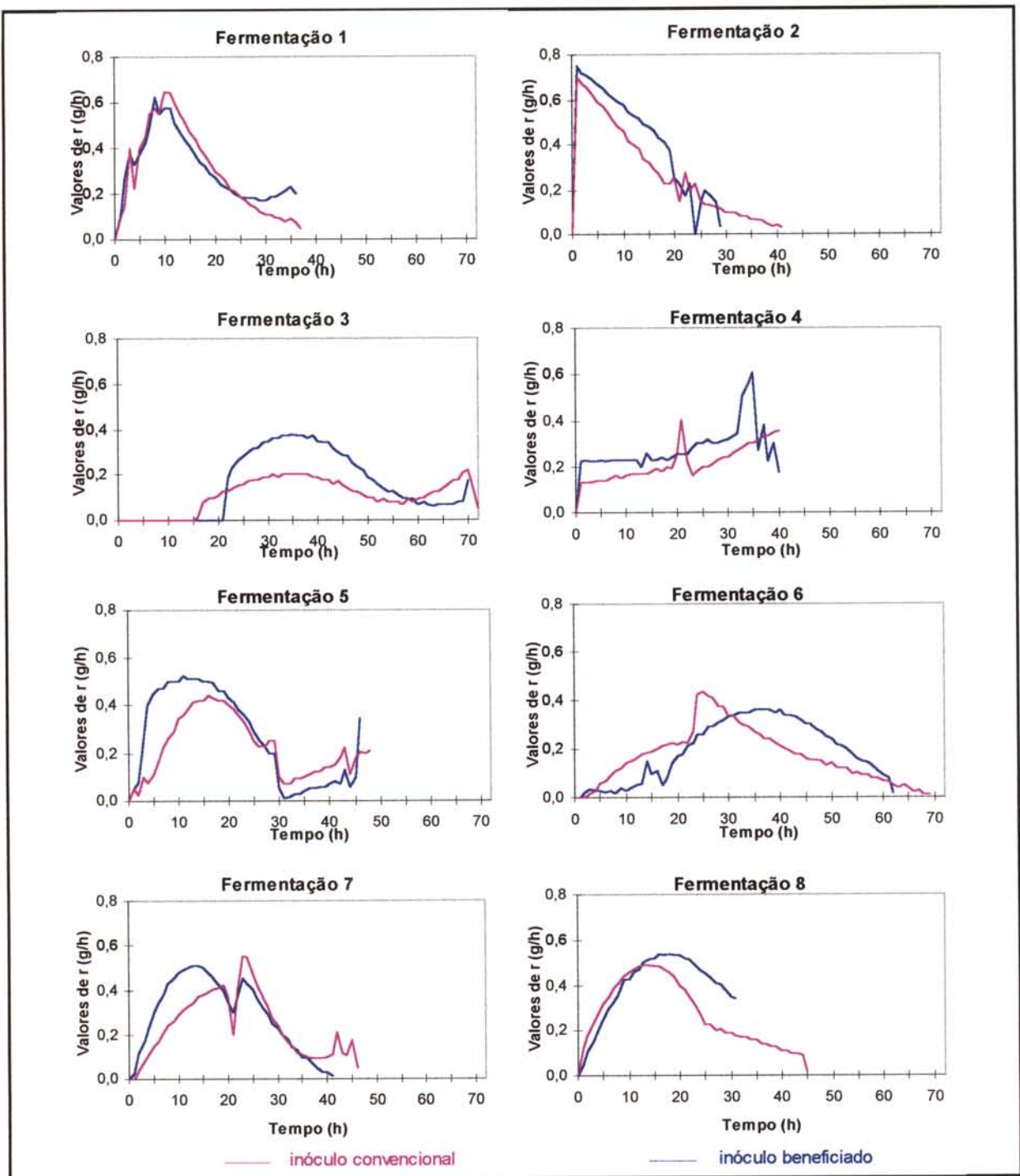


Figura 6. Cinética da velocidade de produção de  $\text{CO}_2$  (g/h) das fermentações com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310 g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

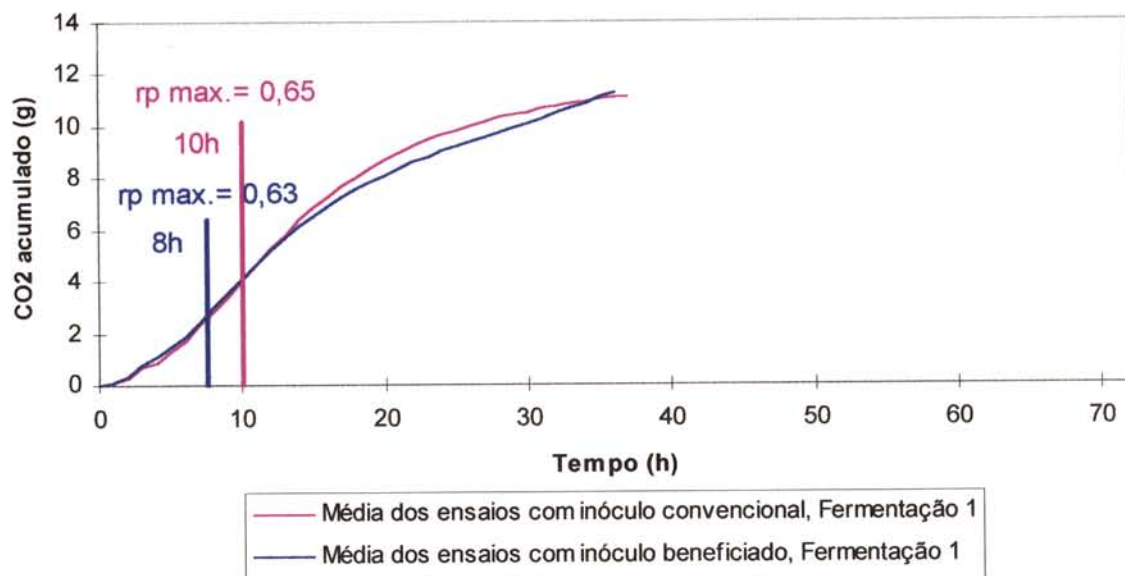


Figura 7a. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações iniciais (F1), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

Na Figura 7b, onde estão inseridos os resultados médios para a segunda rodada de fermentação, observa-se que os valores de  $r_p$  máximos são 0,75 e 0,70 para fermentações com inóculo beneficiado e inóculo convencional respectivamente, e que ambos foram obtidos com 1h de fermentação. Além do menor valor de  $r_p$  máximo para as médias de fermentações com inóculo convencional, pode ser observado que nestas fermentações, onde o inóculo foi obtido como se faz na prática industrial, os tempos de fermentação foram bem diferentes, sendo de 29 horas de fermentação total para fermentações com inóculo beneficiado e 41 horas para fermentações com inóculo convencional. Os valores de tempo são bem superiores aos das fermentações com 180g/L, contudo está em concordância com GRAY (1945) o qual relata que altas concentrações iniciais de açúcares podem ocorrer inibições, contudo como citado por BUENO NETO (1982), que o etanol começa a afetar as células na concentração de 7,2%v/v e que como citado por HOPPE & HANSFORD (1982) e NOGODAWITHANA & STEIKRAUS (1990) o etanol é mais tóxico quando gerado endogenamente e que OKOLO (1987) alerta para a possibilidade de em

concentrações maiores de açúcares possa ocorrer maior produção de etanol e outros componentes que levariam a inibição que é o objeto de estudo.

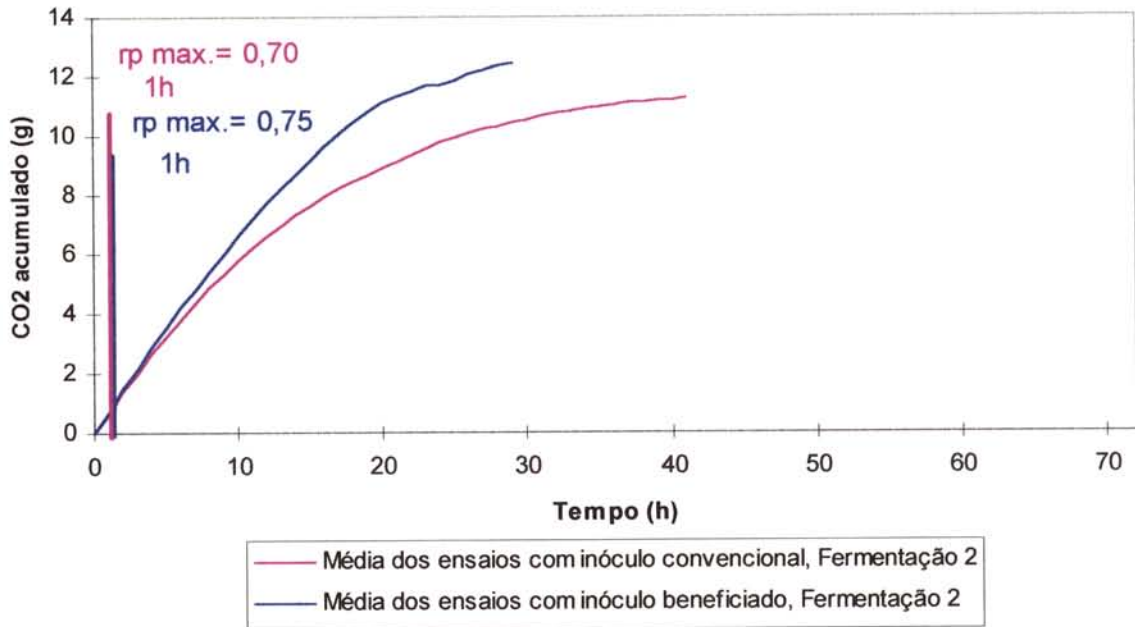


Figura 7b. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações de primeiro reciclo (F2), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

Os resultados para a produção de CO<sub>2</sub> na terceira fermentação podem ser visualizados na Figura 7c, onde observa-se que as fermentações com inóculo convencional alcançaram o  $r_p$  máximo (0,20) com 31 horas de fermentação, enquanto que as fermentações com inóculo beneficiado somente alcançaram o  $r_p$  máximo (0,38) com 35 horas de fermentação. Este tempo foi a única desvantagem obtida, visto que o valor alcançado para  $r_p$ , nas fermentações com inóculo beneficiado foram maiores, como citado anteriormente e o tempo total de fermentação ficou de 70 horas e atingiu o valor de 11g de CO<sub>2</sub> liberado contra 72 horas para inóculos convencionais atingindo o valor de 8g de CO<sub>2</sub> liberado. Deve-se ressaltar ainda que a diferença



observada com relação ao tempo de obtenção do  $r_p$  máximo deve estar ligada ao fato de que nas fermentações anteriores os tratamentos que utilizaram inóculos beneficiados obtiveram fim de fermentação bem mais rapidamente e as células de leveduras ficaram, portanto, expostas muito mais tempo em altas concentrações de etanol do vinho, visto que o processo de separação de leveduras para ambos tratamentos era realizado simultaneamente.

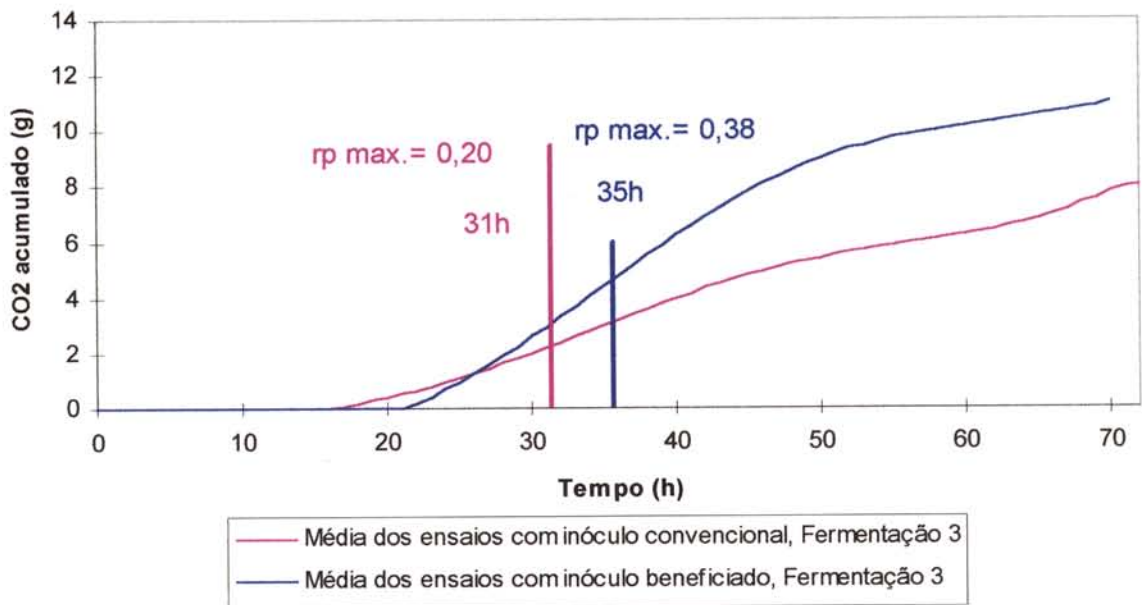


Figura 7c. Cinética da produção acumulada de  $\text{CO}_2$  (g), média das fermentações de segundo reciclo (F3), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

Na Figura 7d podem ser observados os resultados para o quarto reciclo, estas fermentações foram as únicas em que os dois tratamentos terminaram em tempos iguais de fermentação 40 horas, sendo os valores de  $r_p$  máximos de 0,61 e 0,40, para inóculo beneficiado e inóculo convencional, obtidos respectivamente com 35 e 21 horas de fermentação. Deve-se

salientar que a curva de produção de CO<sub>2</sub> para estas fermentações apresentaram um perfil atípico em relação as demais fermentações.

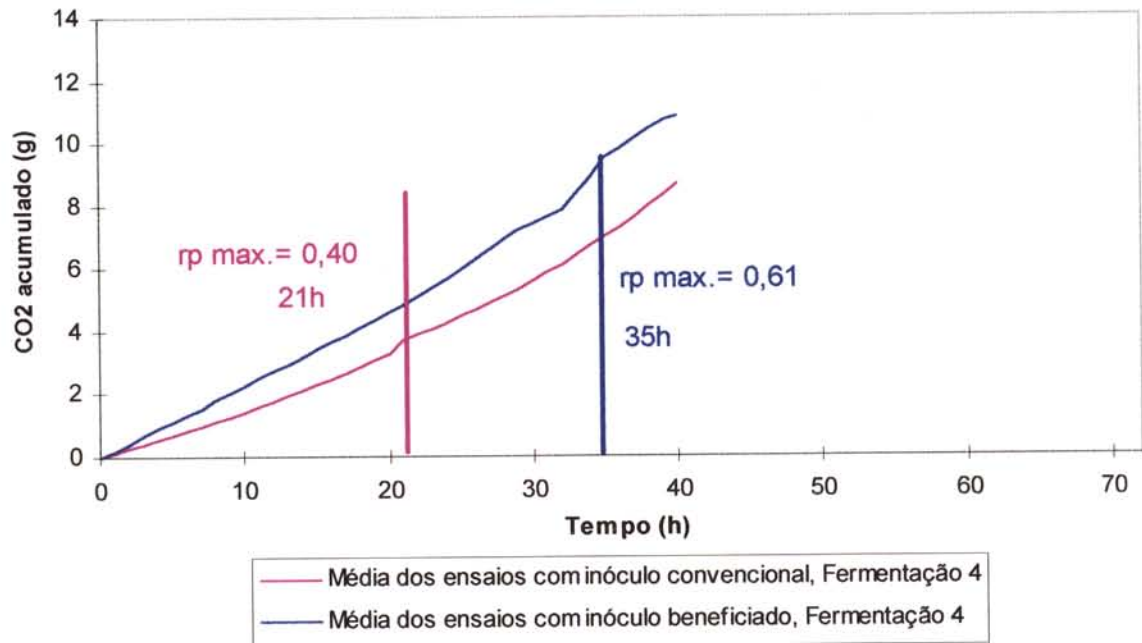


Figura 7d. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações do terceiro reciclo (F4), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaio com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

Nas Figuras 7e, 7f, 7g e 7h, referentes as fermentações 5, 6, 7 e 8, pode ser observado que o tempo das fermentações cujos tratamentos foram de inóculo beneficiado estiveram sempre abaixo dos tempos para aquelas com inóculo convencional. Sendo que segundo AMORIM (1982) a redução no tempo de fermentação proporciona a economia de dornas e reduz chance de contaminações microbianas em fermentações. Os valores de CO<sub>2</sub> liberado também foram maiores para as fermentações com inóculo beneficiado, sendo que com relação aos valores das

velocidades de produção apenas no sexto reciclo é que o valor obtido para inóculo convencional foi maior e obtido em tempo mais rápido.

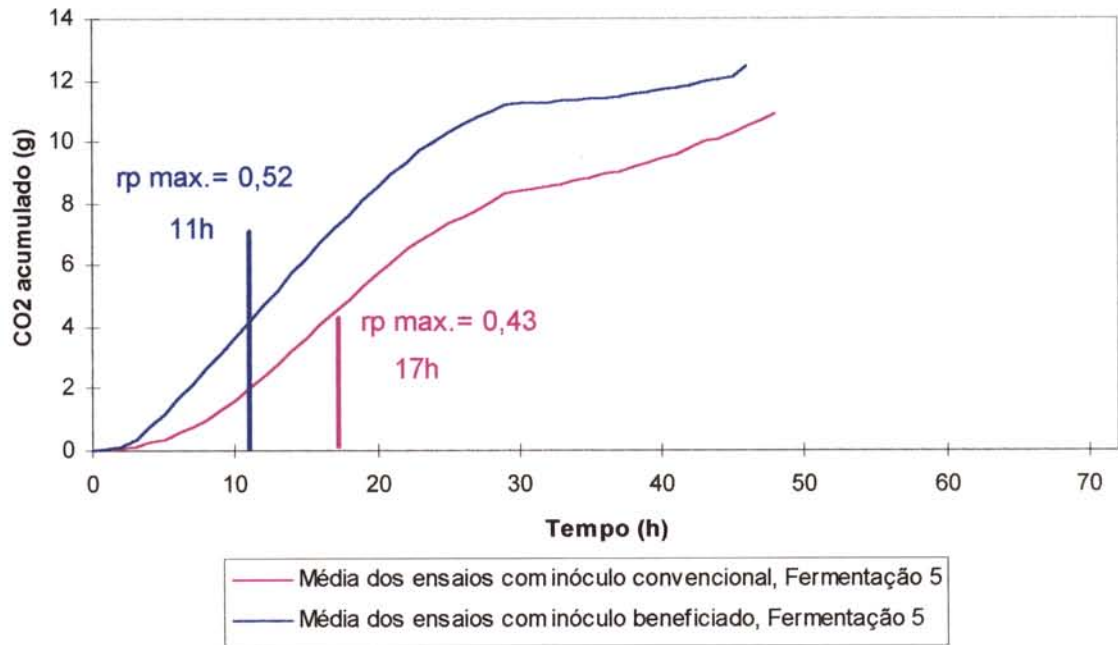


Figura 7e. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações do quarto reciclo (F5), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

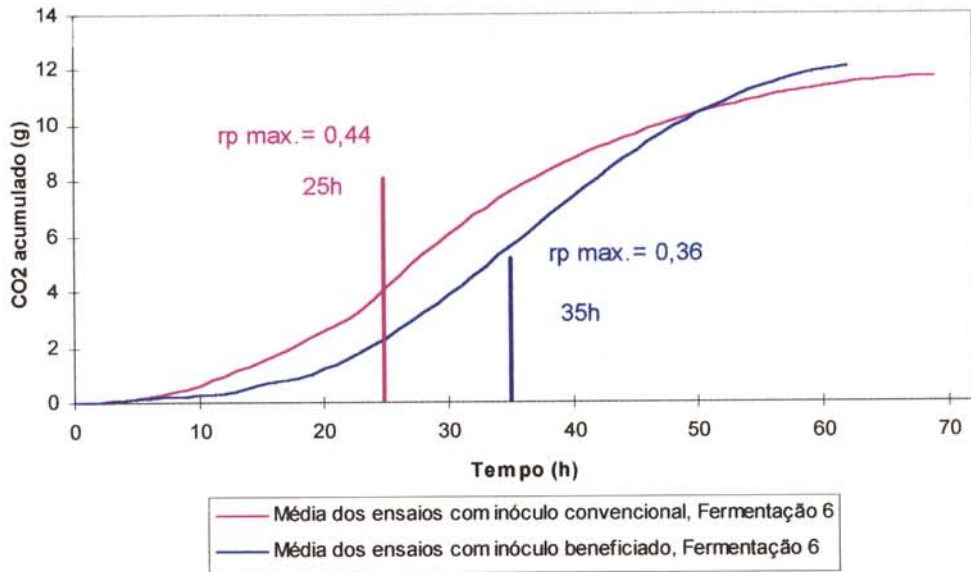


Figura 7f. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações do quinto reciclo (F6), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

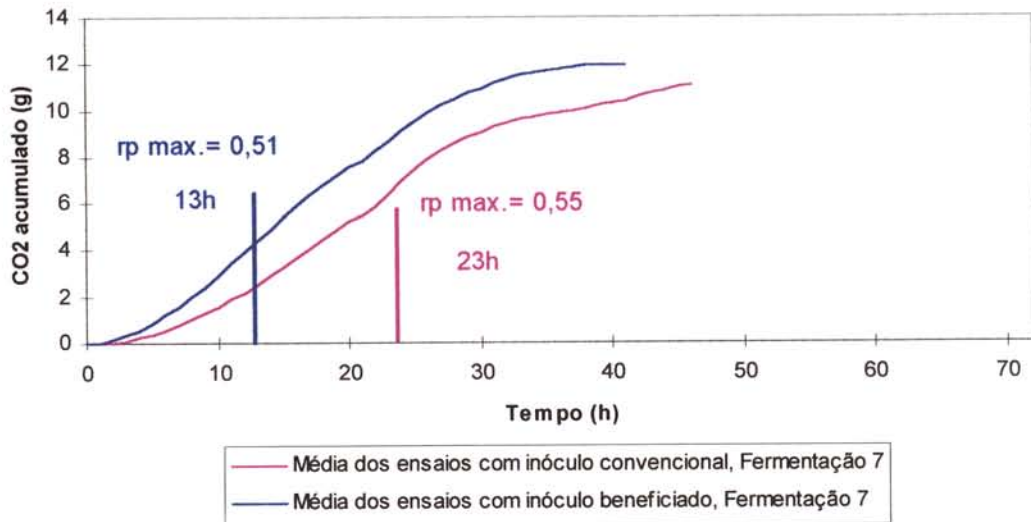


Figura 7g. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações do sexto reciclo (F7), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.



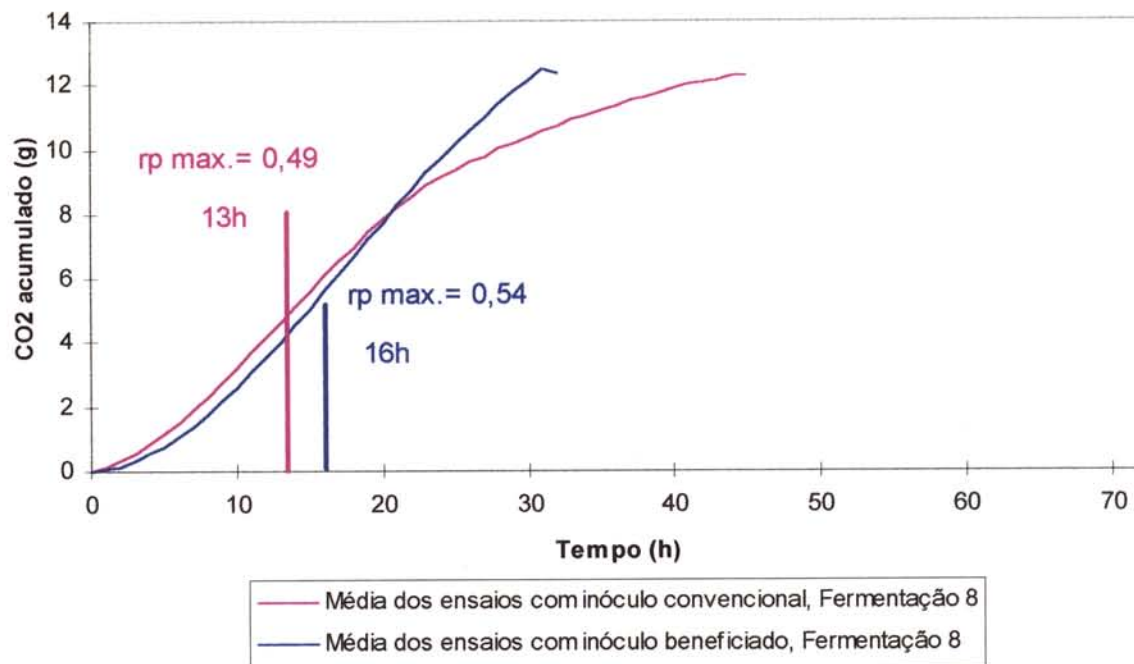


Figura 7h. Cinética da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (g), média das fermentações do sétimo reciclo (F8), com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio.

## **4.2.2. Controle das fermentações**

### **4.2.2.1. Açúcares redutores totais (residuais e consumidos) e tempo de fermentação**

Na Tabela 6, para a variável açúcares redutores residuais (ARR) observa-se que em média observou-se um valor maior destes açúcares nas fermentações que sofreram ciclos com inóculo convencional, mesmo havendo grande flutuação nas fermentações. O que leva a pensar que ocorreu inibição, pois segundo CARTWRIGHT et al. (1989) a utilização do substrato inicia-se pela absorção e segundo INGRAM (1985) o etanol quando tóxico age nas membranas lipoproteicas, acarretando enrijecimento.

Para açúcares redutores consumidos (ARC) pode ser observado na Tabela 6 que os valores para fermentações com inóculo beneficiado mantiveram-se sempre maiores que os valores para as fermentações com inóculo convencional que flutuavam durante as fermentações, o que provocou uma média inferior para o valor de ARC para as fermentações com inóculo convencional. O que concorda com o citado anteriormente.

Para a variável tempo de fermentação na Tabela 6 pode ser visto que em geral as fermentações com inóculo beneficiado tiveram um tempo de fermentação menor que as fermentações com inóculo convencional, e em ambos os tratamentos pode ser observado uma flutuação nos tempos. Este fato torna-se importante, pois segundo AMORIM (1982) tempos de fermentações menores proporciona economia de dornas e reduz chance de contaminações.

Tabela 6. Resultados de açúcares redutores residuais, açúcares redutores totais consumidos e tempo de fermentação, com o uso de inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

Fermentação	Inóculo	ART		Tempo de fermentação (h)
		residual (g/L)	consumido (g/L)	
F1	c/b	12,66	276,30	36
	c/b	12,66	276,30	36
F2	c	27,40	285,59	41
	b	3,83	309,16	28
F3	c	21,55	284,89	72
	b	20,54	285,89	71
F4	c	29,41	273,36	40
	b	14,43	288,34	40
F5	c	42,96	271,68	48
	b	6,32	308,33	46
F6	c	15,69	300,93	69
	b	10,52	306,10	61
F7	c	18,71	298,09	45
	b	8,89	307,91	41
F8	c	11,72	297,72	45
	b	6,73	302,70	32

#### 4.2.2.2. Etanol

Deve-se notar que na Tabela 7, valores de etanol %v, que em média as fermentações com inóculo beneficiado obtiveram valor de etanol maior que as fermentações com inóculo convencional, sem considerar ainda que nas fermentações com inóculo convencional havia também adição de etanol, fato que pode ser observado nos valores de etanol produzido. Para etanol produzido (%p), Tabela 7, as diferenças foram maiores ainda sendo que com exceção da segunda fermentação todas as demais foram maiores para o tratamento que realizou fermentações com inóculo beneficiado. Os valores de etanol foram superiores aos valores das fermentações com 180g/L, atingindo valores de até 12,48% v/v, bem superiores aos citados por BUENO NETO (1982) DE 7,2% v/v, os quais começam a inibir o crescimento celular, contudo LUONG (1985) relatou que leveduras não cresce quando etanol ultrapassa o valor de aproximadamente 13,7% v/v e MILLAR et al. (1982) citam que enzimas glicolíticas são inibidas em concentração de etanol de 12% v/v, contudo DRYSDALE & FLEET (1989) citam 12% v/v como teor normal de etanol em fermentação alcoólica.

Tabela 7. Resultados de etanol no vinho, etanol produzido com uso de inóculos convencional e beneficiado nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

Fermentação	inóculo	etanol			
		vinho		produzido	
		%v	%p	%v	%p
F1	c/b	11,65	9,36	11,65	9,36
	c/b	11,65	9,36	11,65	9,36
F2	c	10,27	8,24	8,93	7,34
	b	10,11	8,10	10,11	8,10
F3	c	8,81	7,06	7,64	6,26
	b	8,82	7,06	8,82	7,06
F4	c	7,84	6,26	6,89	5,65
	b	8,96	7,18	8,96	7,18
F5	c	9,16	7,35	8,58	7,01
	b	12,48	10,04	12,48	10,04
F6	c	11,79	9,49	10,39	8,65
	b	12,43	10,02	12,43	10,02
F7	c	7,83	6,21	6,49	5,38
	b	9,56	7,63	9,56	7,63
F8	c	6,42	5,16	5,83	4,84
	b	8,59	6,87	8,59	6,87

### 4.2.2.3. Microbiologia

Com relação a concentração celular (g/L), pode ser visto nas Tabelas 8a e 8b que as fermentações com inóculo beneficiado obtiveram maior média que as fermentações com inóculo convencional e que os valores de concentração celular (g/L) para fermentações com inóculo beneficiado sempre foi maior do que para as fermentações com inóculo convencional, fato que concorda com PANCHAL & TAVARES (1990), que relatam fermentações rápidas devido à altas concentrações de inóculo e as fermentações com inóculo beneficiado realmente foram mais rápidas. A maior concentração celular pode ser visualizado também na Figura 8, sendo que com inóculo beneficiado proporcionou uma regressão quadrática significativa com r de 0,866\*\* e com inóculo convencional de 0,780\*\*.

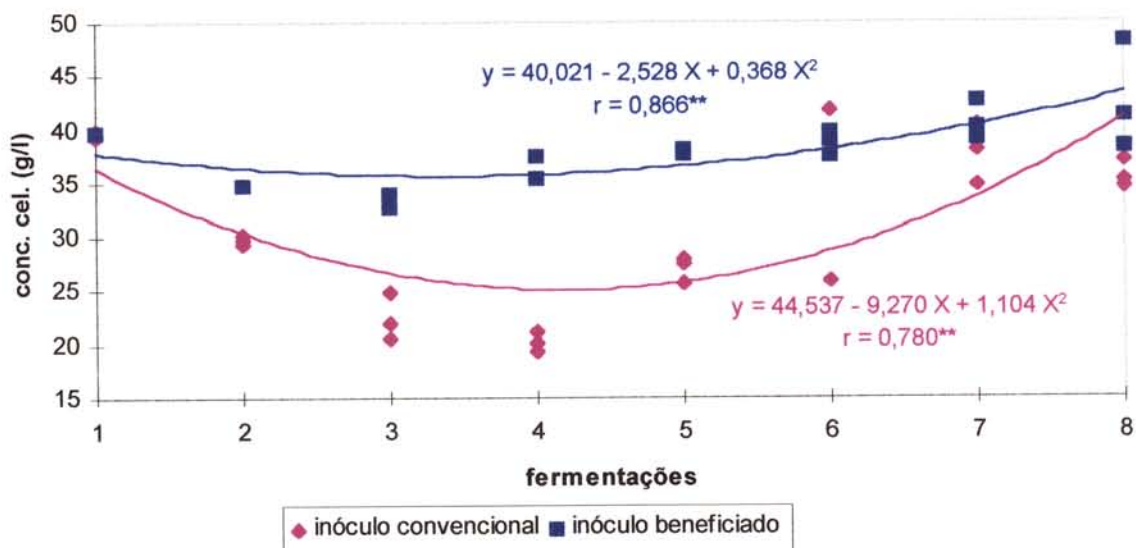


Figura.8. Resultado de concentração celular nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Nas Tabelas 9a e 9b pode-se observar que a viabilidade celular para as fermentações com inóculo beneficiado foi maior que para as fermentações com inóculo convencional e que a viabilidade caiu durante os ensaios, contudo para as fermentações com inóculo convencional a queda foi bem mais expressiva. Fato que concorda com BROWN et al. (1981) os quais citam que o etanol é o metabólito produzido em maior quantidade na fermentação e quando tóxico pode causar redução na viabilidade das leveduras. Para a variável viabilidade de brotos nas Tabelas 10a e 10b, pode ser notado que o comportamento foi semelhante ao da viabilidade.

Tabela 8a. Análise de variância (teste F) dos resultados de concentração celular (g/L), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	69,15	34,58	6,85 NS
Tratamentos	1	597,77	597,77	118,41**
Resíduo(A)	2	10,10	5,05	
Parcelas	5	677,02		
Fermentações	7	990,89	141,56	25,06**
Tratam.x Ferm.	7	302,28	43,18	7,64**
Resíduo(B)	28	158,15	5,65	
Total	47	2128,34		

Média Geral = 34,50 e Coeficiente de Variação(A) = 2,30 e Coeficiente de Variação(B) = 6,89%

Tabela 8b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de concentração celular (g/L), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	concentração celular (g/L)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	39,73 <sup>A a</sup>	39,73 <sup>A ab</sup>
Segunda Fermentação	29,79 <sup>B c</sup>	34,77 <sup>A cd</sup>
Terceira Fermentação	22,44 <sup>B d</sup>	33,29 <sup>A d</sup>
Quarta Fermentação	20,22 <sup>B d</sup>	36,76 <sup>A bcd</sup>
Quinta Fermentação	27,09 <sup>B c</sup>	37,90 <sup>A bc</sup>
Sexta Fermentação	35,20 <sup>A b</sup>	38,64 <sup>A abc</sup>
Sétima Fermentação	37,78 <sup>A ab</sup>	40,64 <sup>A ab</sup>
Oitava Fermentação	35,61 <sup>B ab</sup>	42,47 <sup>A a</sup>
Médias	30,98 <sup>B</sup>	38,02 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.



Tabela 9a. Análise de variância (teste F) dos resultados de viabilidade celular (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	53,47	26,73	4,95 NS
Tratamentos	1	3146,20	3146,20	582,14**
Resíduo(A)	2	10,81	5,40	
Parcelas	5	3210,48		
Fermentações	7	16173,25	2310,46	36,51**
Tratam.x Ferm.	7	3094,72	442,10	6,99**
Resíduo(B)	28	1772,09	63,29	
Total	47	24250,54		

Média Geral = 44,18 e Coeficiente de Variação(A) = 1,86 e Coeficiente de Variação(B) = 18,00%

Tabela 9b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de viabilidade celular (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	viabilidade celular (%)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	91,17 <sup>A a</sup>	91,17 <sup>A a</sup>
Segunda Fermentação	19,29 <sup>B c</sup>	58,65 <sup>A b</sup>
Terceira Fermentação	26,59 <sup>A c</sup>	30,35 <sup>A d</sup>
Quarta Fermentação	29,70 <sup>B c</sup>	54,75 <sup>A b</sup>
Quinta Fermentação	27,75 <sup>A c</sup>	35,73 <sup>A d</sup>
Sexta Fermentação	26,18 <sup>B c</sup>	50,50 <sup>A bc</sup>
Sétima Fermentação	46,60 <sup>A b</sup>	38,47 <sup>A cd</sup>
Oitava Fermentação	22,32 <sup>B c</sup>	57,61 <sup>A b</sup>
Médias	36,20 <sup>B</sup>	52,15 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

Tabela 10a. Análise de variância (teste F) dos resultados de viabilidade de brotos (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	42,07	21,03	0,92 NS
Tratamentos	1	2638,41	2638,41	115,12**
Resíduo(A)	2	45,84	22,92	
Parcelas	5	2726,31		
Fermentações	7	21764,61	3109,23	46,25**
Tratam.x Ferm.	7	4515,54	645,08	9,60**
Resíduo(B)	28	1882,52	67,23	
Total	47	30888,99		

Média Geral = 36,62 e Coeficiente de Variação(A) = 4,62 e Coeficiente de Variação(B) = 22,39%

Tabela 10b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de viabilidade de brotos (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	viabilidade de brotos (%)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	89,33 <sup>A a</sup>	89,33 <sup>A a</sup>
Segunda Fermentação	52,80 <sup>A bc</sup>	52,64 <sup>A bc</sup>
Terceira Fermentação	21,52 <sup>A d</sup>	20,76 <sup>A d</sup>
Quarta Fermentação	29,40 <sup>B d</sup>	47,18 <sup>A c</sup>
Quinta Fermentação	14,05 <sup>A de</sup>	23,92 <sup>A d</sup>
Sexta Fermentação	13,37 <sup>B de</sup>	32,47 <sup>A d</sup>
Sétima Fermentação	39,48 <sup>A c</sup>	23,93 <sup>B d</sup>
Oitava Fermentação	22,28 <sup>B d</sup>	61,03 <sup>A b</sup>
Médias	35,28 <sup>B</sup>	43,91 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

#### 4.2.2.4. Componentes secundários

As análises cromatográficas para os compostos secundários foram realizadas como citado em Material e Métodos, sendo uma análise cromatográfica para cada fermentação realizada, totalizando 96 análises cromatográficas e os resultados obtidos como o exemplo mostrado na Figura 9. Os dados são também apresentados na Tabela 11.

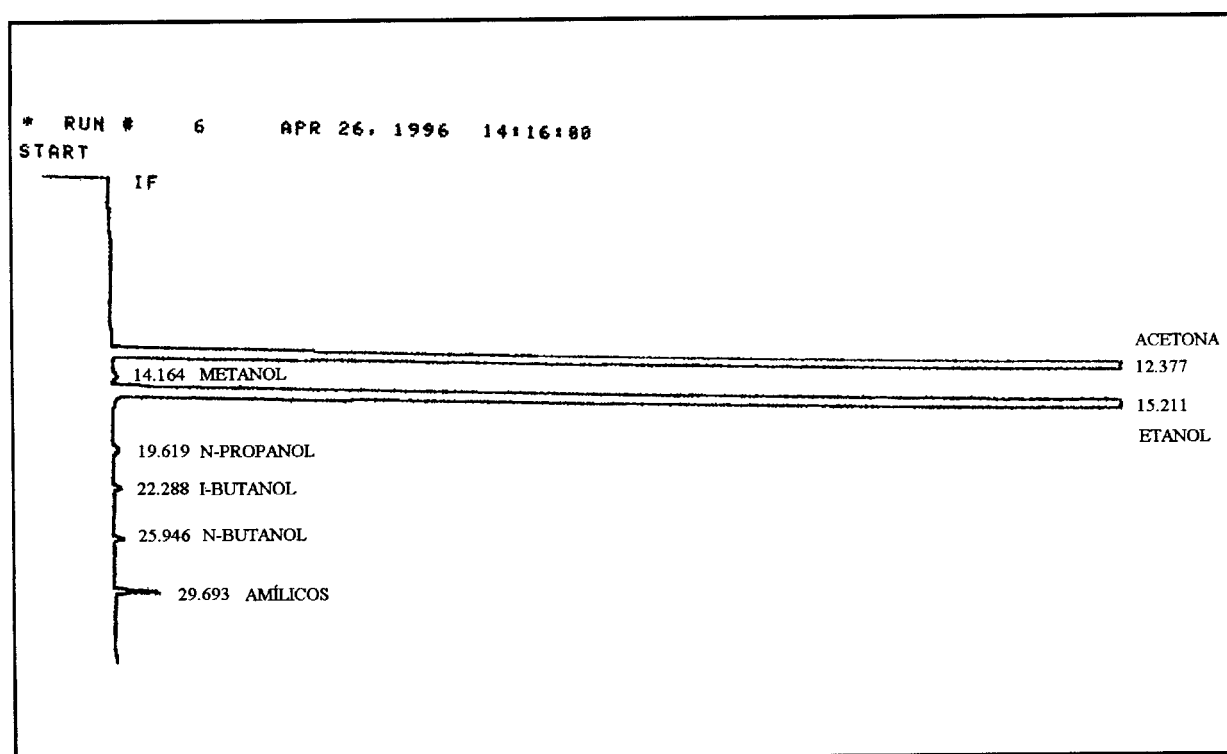


Figura 9. Exemplo de cromatograma de alguns componentes secundários no vinho.

Tabela 11. Resultados (ppm) de componentes secundários totais, metanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol e álcool amílico em fermentações com inóculos convencional e beneficiado, nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

Fermentação	Tipo de inóculo	metp pm	n-Pro ppm	i-but ppm	n-but ppm	amilp pm	sec ppm
F1	c/b	-	52	37	-	60	149
	c/b	-	52	37	-	60	149
F2	c	-	52	28	-	40	120
	b	-	57	27	-	56	140
F3	c	153	142	32	21	68	416
	b	103	42	27	16	53	241
F4	c	385	63	44	26	55	573
	b	107	50	18	27	58	260
F5	c	44	102	74	100	212	532
	b	-	87	35	218	204	544
F6	c	281	240	42	84	103	750
	b	-	154	62	45	146	407
F7	c	177	86	15	8	40	326
	b	54	77	89	67	127	414
F8	c	262	182	216	48	391	1099
	b	77	146	117	110	213	663

met = metanol; n-pro = n-propanol; i-but = isobutanol; n-but = n-butanol; amil = álcool amílico; sec = secundários.

As fermentações com inóculo beneficiado obtiveram menos metanol que aquelas com inóculo convencional, também é interessante observar que as duas primeiras fermentações não apresentaram metanol em nenhum dos tratamentos e que as fermentações realizadas com inóculo convencional apresentaram regressão quadrática significativa (metanol x fermentações sucessivas), com coeficiente de correlação (r) de 0,641\*\* e as realizadas com inóculo beneficiado mostraram um comportamento não definido (Figura 10). Este fato está em concordância com AMERINE & CRUESS (1960) os quais relatam que o metanol não é produzido pela levedura e sim por reduções principalmente de pectinas, sendo seus teores dependentes destes compostos.

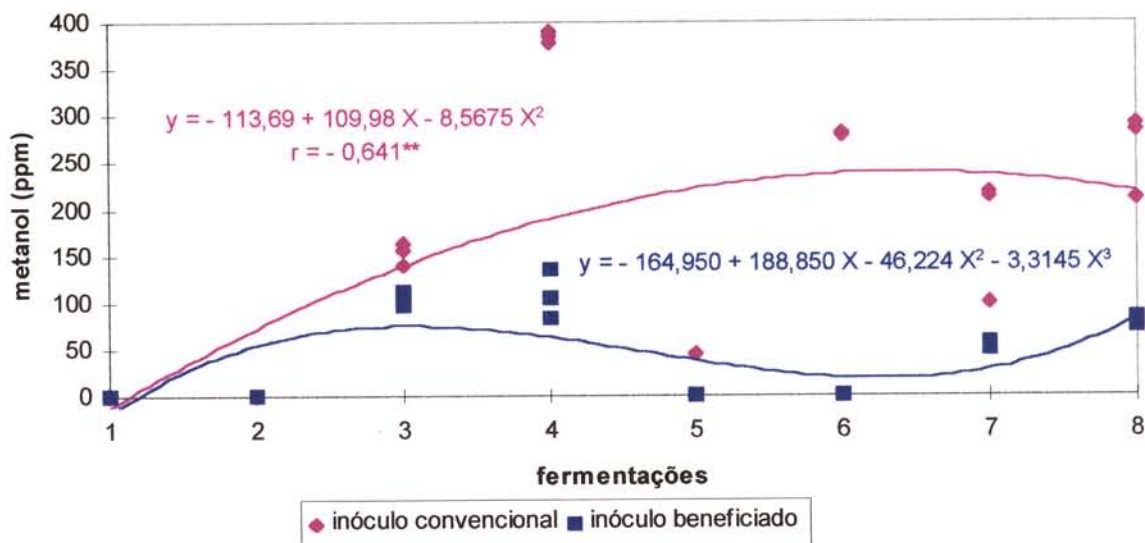


Figura 10. Resultado de metanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Para a variável n-propanol, em geral, as fermentações com inóculo beneficiado apresentaram menores valores que as fermentações com inóculo convencional, sendo que nas fermentações recicladas com inóculo beneficiado houve uma regressão linear significativa (n-propanol x fermentações sucessivas) com um coeficiente de correlação (r) de 0,753\*\* e para as

recicladas com inóculo convencional a regressão linear apresentou um coeficiente (r) de 0,606\*\* (Figura 11). Pode ser observado também que os valores obtidos nas duas fermentações são bem menores que os valores determinados por MAIORELLA et al. (1983) para 1-propanol como sendo de para inibição inicial de 2g/L ( $\approx$  2000ppm). Os valores normais de n-propanol citados por FUKUDA et al. (1993) são de 8-120ppm e os obtidos neste ensaio estão entre 50-240ppm.

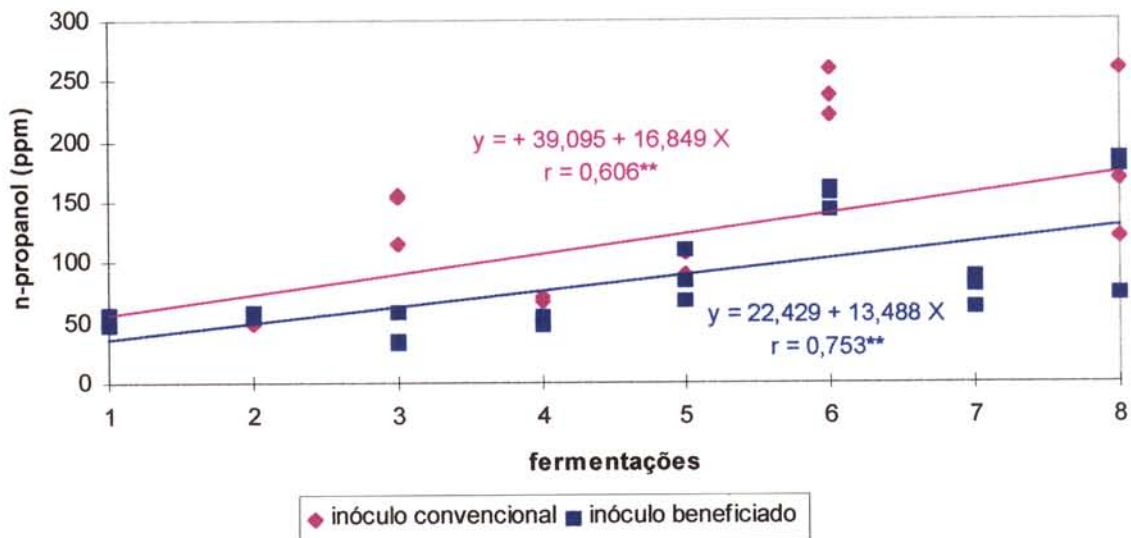


Figura 11. Resultado de n-propanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

A variável isobutanol nas fermentações com inóculo beneficiado mostrou menor teor quando comparada às fermentações com inóculo convencional e ainda as fermentações com inóculo beneficiado apresentaram uma regressão quadrática com coeficiente de correlação (r) de 0,991\*\*, sendo que para inóculo convencional o coeficiente de correlação quadrática (r) foi de 0,720\*\* (Figura 12). Os valores normais de isobutanol segundo CACHOT et al. (1997) estão entre 60-110ppm e os encontrados estão entre 15-216ppm.

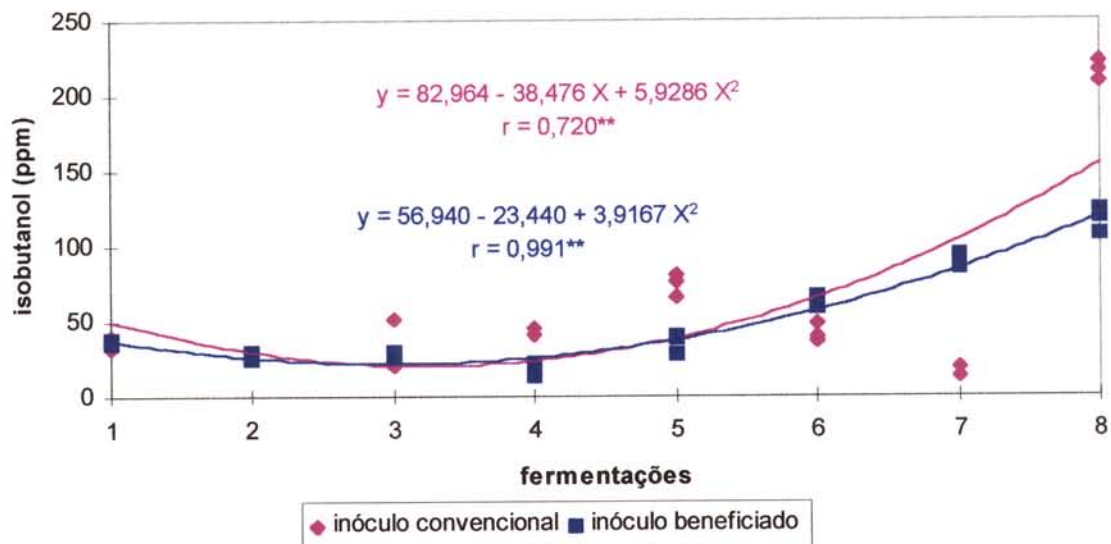


Figura 12. Resultado de isobutanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Para a variável n-butanol as fermentações com inóculo beneficiado apresentaram maior quantidade que as fermentações com inóculo convencional e que nos dois primeiros ciclos não ocorreu presença de n-butanol. Para inóculo beneficiado obteve-se uma regressão linear significativa com r de 0,547\*\* e para inóculo convencional obteve-se uma regressão linear com r de 0,480\* (Figura 13). Segundo OKOLO et al. (1987) o n-butanol promove inibição quando presente na concentração de 6400pp e os valores encontrados estão entre 8-218ppm.

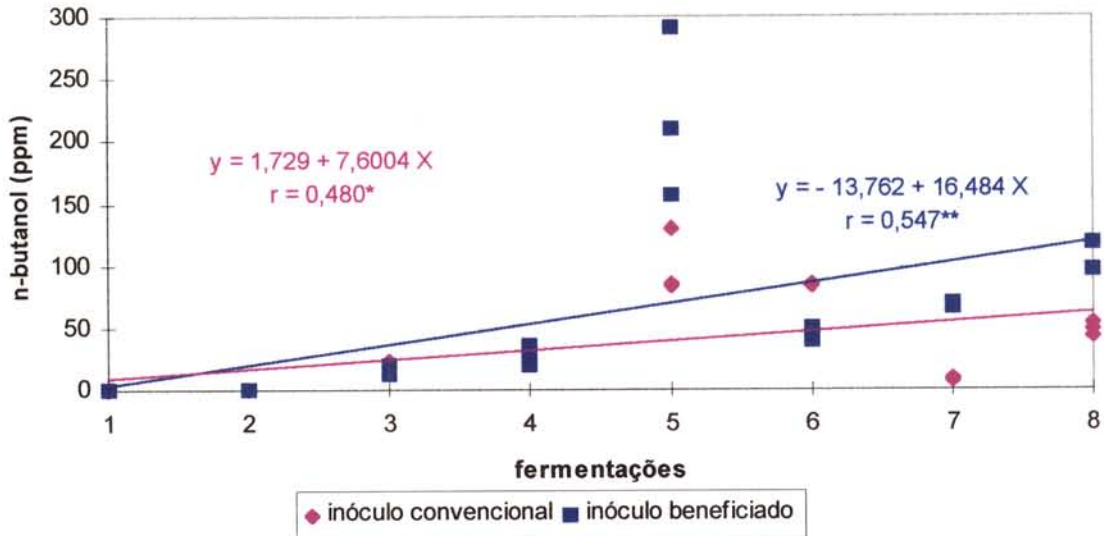


Figura 13. Resultado de n-butanol nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Com relação ao álcool amílico observa-se, na Figura 14, uma tendência de elevação com as fermentações sucessivas, sendo que esta tendência resultou em uma regressão linear significativa para as fermentações com inóculo beneficiado ( $r = 0,799^{**}$ ) e para inóculo convencional ( $r = 0,613^{**}$ ). Segundo FUKUDA et al. (1993) os teores normais de álcool amílico está entre 30-80ppm e os encontrados estão entre 40-391ppm.



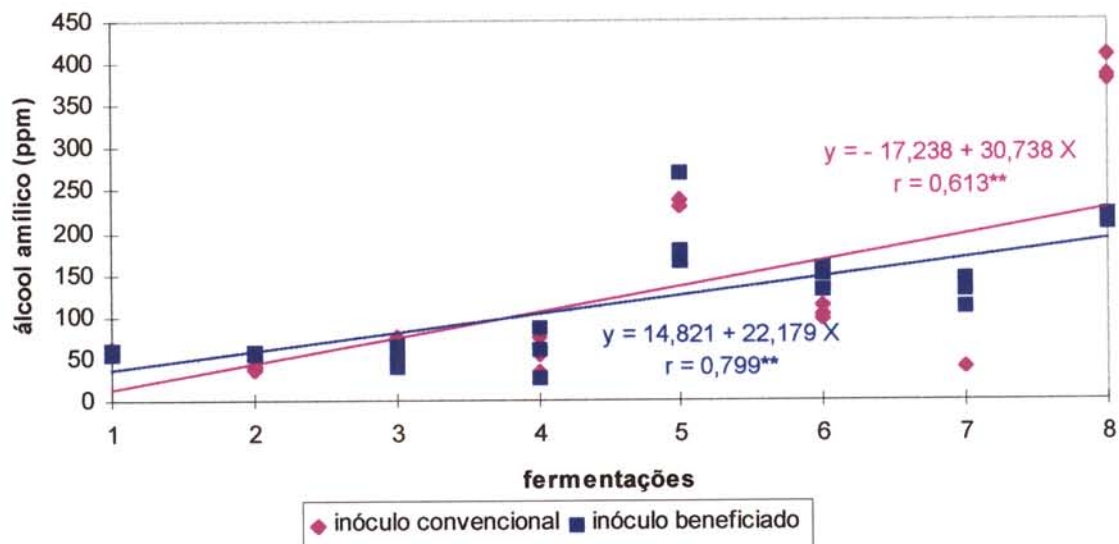


Figura 14. Resultado de álcool amílico nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Quanto aos compostos secundários totais pode ser observado na Figura 15 que as fermentações com inóculo convencional obtiveram, em média, maiores teores e que tanto para fermentações com inóculo beneficiado como para fermentações com inóculo convencional ocorreram regressões lineares significativas (compostos secundários x fermentações sucessivas), com  $r =$  de 0,892\*\* e 0,779\*\*, respectivamente. Segundo MAYNARD (1954) os álcoois superiores estão entre 140-1720ppm e os encontrados estão entre 120-1099ppm.

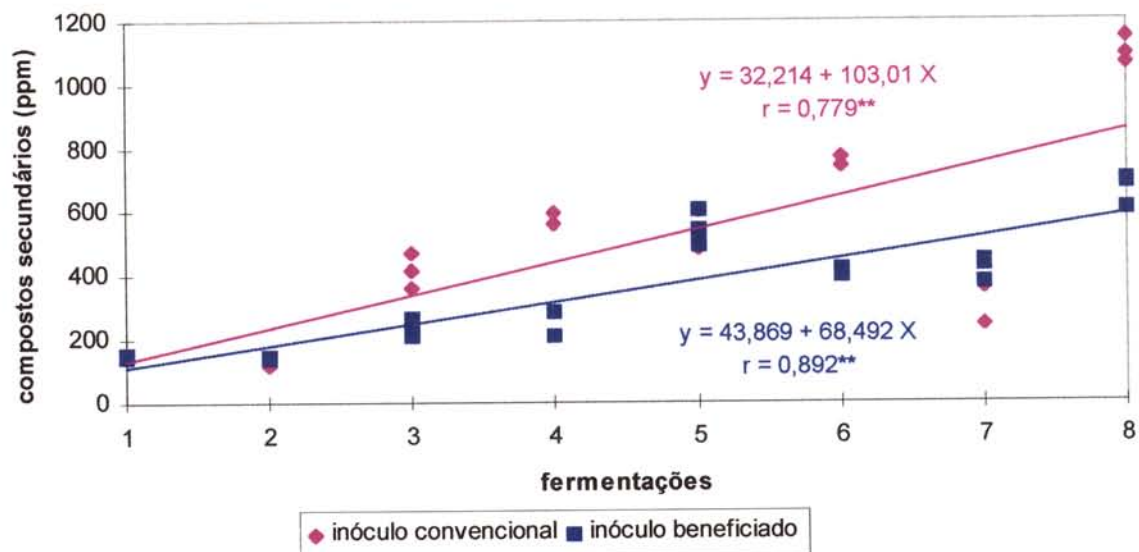


Figura 15. Resultado de compostos secundários nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

#### **4.2.2.5. Eficiência da levedura**

Para a variável eficiência da levedura, que em seu cálculo utilizou-se açúcares redutores consumidos e etanol produzido, pode ser observado na Tabela 12a, houve significância ao nível de 1% para fermentações sucessivas e de 5% para tratamentos e interações. Na Tabela 12b, tem-se que em média as fermentações com inóculo beneficiado obtiveram maior eficiência que as fermentações com inóculo convencional, com exceção da segunda fermentação todas as demais obtiveram valores numericamente maiores para inóculo beneficiado.

Tabela 12a. Análise de variância (teste F) dos resultados de eficiência das leveduras (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	0,76	0,38	0,0134 NS
Tratamentos	1	744,11	744,11	26,25*
Resíduo(A)	2	56,69	28,34	
Parcelas	5	801,56		
Fermentações	7	7067,90	1009,70	39,85**
Tratam.x Ferm.	7	460,19	65,74	2,59*
Resíduo(B)	28	709,51	25,33	
Total	47	9039,15		

Média Geral = 67,82 e Coeficiente de Variação(A) = 2,78 e Coeficiente de Variação(B) = 7,42%

Tabela 12b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de eficiência das leveduras (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, com 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	eficiência (%)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	87,97 <sup>A a</sup>	87,97 <sup>A a</sup>
Segunda Fermentação	68,83 <sup>A bc</sup>	67,02 <sup>A b</sup>
Terceira Fermentação	60,84 <sup>A cd</sup>	65,33 <sup>A bc</sup>
Quarta Fermentação	57,43 <sup>A d</sup>	65,45 <sup>A bc</sup>
Quinta Fermentação	71,64 <sup>B b</sup>	83,20 <sup>A a</sup>
Sexta Fermentação	74,86 <sup>B b</sup>	84,14 <sup>A a</sup>
Sétima Fermentação	47,36 <sup>B e</sup>	63,49 <sup>A bc</sup>
Oitava Fermentação	42,08 <sup>B e</sup>	57,41 <sup>A c</sup>
Médias	63,88 <sup>B</sup>	71,75 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

#### **4.2.2.6. Rendimento da fermentação**

Para a variável rendimento da fermentação, que leva em consideração para o seu cálculo o teor de açúcar fornecido e o etanol produzido, tem-se que na Tabela 13a que tratamentos, fermentações e interações foram significativas ao nível de 1% e que na Tabela 13b observa-se que ocorreu uma tendência de decréscimo no rendimento, sendo os valores para inóculo beneficiado sempre maior que para o inóculo convencional.

Tabela 13a. Análise de variância (teste F) dos resultados de rendimento da fermentação (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	12,79	6,39	0,68 NS
Tratamentos	1	1526,30	1526,30	111,76**
Resíduo(A)	2	27,31	13,66	
Parcelas	5	1566,40		
Fermentações	7	6235,04	890,72	35,91**
Tratam. x Ferm.	7	642,73	91,82	3,70**
Resíduo(B)	28	694,46	24,80	
Total	47	9138,63		

Média Geral = 62,86 e Coeficiente de Variação(A) = 2,08 e Coeficiente de Variação(B) = 7,92%

Tabela 13b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de rendimento da fermentação (%), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, média de 3 repetições de ensaio

Ordem da Fermentação	rendimento (%)	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	82,85 <sup>A a</sup>	82,85 <sup>A a</sup>
Segunda Fermentação	60,75 <sup>A c</sup>	65,94 <sup>A b</sup>
Terceira Fermentação	54,87 <sup>A cd</sup>	59,48 <sup>A bc</sup>
Quarta Fermentação	49,63 <sup>B de</sup>	61,31 <sup>A bc</sup>
Quinta Fermentação	58,32 <sup>B c</sup>	80,99 <sup>A a</sup>
Sexta Fermentação	69,77 <sup>B b</sup>	80,43 <sup>A a</sup>
Sétima Fermentação	41,61 <sup>B ef</sup>	61,16 <sup>A bc</sup>
Oitava Fermentação	39,95 <sup>B f</sup>	55,80 <sup>A c</sup>
Médias	57,22 <sup>B</sup>	68,50 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

#### 4.2.2.7. Produtividade da fermentação

Com relação a produtividade em ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) pode ser observado na Tabela 14a que houve significância para o Teste F para fermentações e interação ao nível de 1%, e para tratamentos ao nível de 5%. Na Tabela 14b pode ser observado que em todas as fermentações o inóculo beneficiado mostrou maiores valores; ocorreu uma tendência de redução na produtividade com as fermentações para aquelas com inóculo convencional. O inóculo convencional causou uma redução segundo uma equação linear significativa com  $r = -0,727^{**}$ ; o inóculo beneficiado proporcionou produtividades mais elevadas, com valores que se comportaram segundo uma equação quadrática significativa com  $r = +0,589^{**}$ , como pode ser observado na Figura 16.

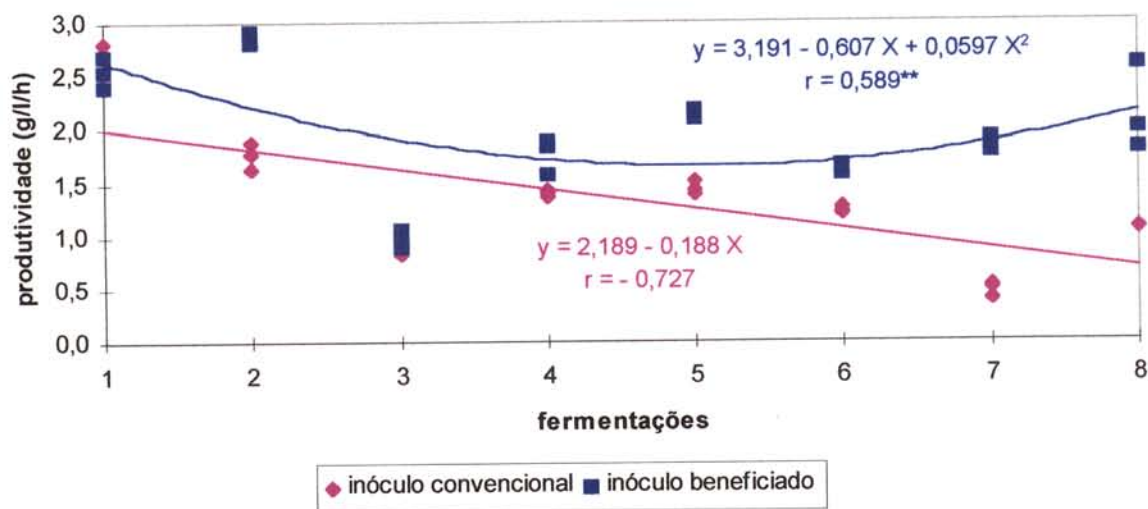


Figura 16. Resultado de produtividade nas fermentações com reciclo sucessivo de fermento (F1 a F8), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Tabela 14a. Análise de variância (teste F) dos resultados de produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	0,044	0,022	0,323 NS
Tratamentos	1	3,600	3,600	53,400*
Resíduo(A)	2	0,135	0,067	
Parcelas	5	3,779		
Fermentações	7	11,095	1,585	74,416**
Tratam. x Ferm.	7	1,692	0,242	11,351**
Resíduo(B)	28	0,596	0,021	
Total	47	17,162		

Média Geral = 1,71 e Coeficiente de Variação(A) = 5,37 e Coeficiente de Variação(B) = 8,54%

Tabela 14b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, médias de 3 repetições de ensaio.

Ordem da Fermentação	produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	2,55 <sup>A a</sup>	2,55 <sup>A b</sup>
Segunda Fermentação	1,76 <sup>B b</sup>	2,85 <sup>A a</sup>
Terceira Fermentação	0,86 <sup>A e</sup>	0,99 <sup>A f</sup>
Quarta Fermentação	1,40 <sup>B c</sup>	1,77 <sup>A e</sup>
Quinta Fermentação	1,44 <sup>B c</sup>	2,14 <sup>A c</sup>
Sexta Fermentação	1,23 <sup>B cd</sup>	1,61 <sup>A e</sup>
Sétima Fermentação	1,19 <sup>B cd</sup>	1,84 <sup>A de</sup>
Oitava Fermentação	1,06 <sup>B de</sup>	2,12 <sup>A cd</sup>
Médias	1,44 <sup>B</sup>	1,98 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.



#### **4.2.2.8. Produtividade específica da fermentação**

Com relação a produtividade específica em ( $h^{-1}$ ) pode ser observado na Tabela 15a que houve significância para o Teste F para fermentações e interação ao nível de 1%. Na Tabela 15b os resultados estatísticos para a comparação das médias mostraram que não houve variações no comportamento desta variável, não ocorrendo distinção clara para os tratamentos; observa-se uma tendência da produtividade específica das fermentações com o inóculo beneficiado serem superiores, todavia sem confirmação estatística.

Tabela 15a. Análise de variância (teste F) dos resultados de produtividade específica ( $h^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Blocos	2	0,0000122	0,0000061	0,0722 NS
Tratamentos	1	0,0002430	0,0002430	2,88 NS
Resíduo (A)	2	0,0001685	0,0000842	
Parcelas	5	0,0004237		
Fermentações	7	0,0077353	0,0011105	71,08**
Tratam. x Ferm.	7	0,0022893	0,0003270	21,04**
Resíduo (B)	28	0,0004353	0,0000155	
Total	47	0,01088		

Média Geral = 0,05 e Coeficiente de Variação(A) = 6,54% e Coeficiente de Variação(B) = 7,95%

Tabela 15b. Análise estatística (teste Duncan) dos resultados de produtividade específica ( $h^{-1}$ ), nos ensaios com mosto de 310g ART/litro, médias de 3 repetições.

Ordem da Fermentação	produtividade específica ( $h^{-1}$ )	
	inóculo convencional	inóculo beneficiado
Primeira Fermentação	0,06200 <sup>A ab</sup>	0,06200 <sup>A b</sup>
Segunda Fermentação	0,05900 <sup>B b</sup>	0,08200 <sup>A a</sup>
Terceira Fermentação	0,03833 <sup>A c</sup>	0,02933 <sup>B e</sup>
Quarta Fermentação	0,06933 <sup>A a</sup>	0,04833 <sup>B cd</sup>
Quinta Fermentação	0,05333 <sup>A b</sup>	0,05633 <sup>A bc</sup>
Sexta Fermentação	0,03600 <sup>A c</sup>	0,04167 <sup>A d</sup>
Sétima Fermentação	0,03133 <sup>B c</sup>	0,04533 <sup>A d</sup>
Oitava Fermentação	0,02967 <sup>B c</sup>	0,04967 <sup>A cd</sup>
Médias	0,04733	0,05183

Letras maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5% de probabilidade.

### **4.2.3. Análise conjunta dos resultados através de correlação linear múltipla (stepwise).**

Com relação a produtividade, pode ser observado nas tabelas 16 e 17 que nos ensaios com inóculo convencional ocorreu forte correlação com viabilidade e tempo de fermentação, enquanto que para ensaios com inóculo beneficiado a produtividade foi influenciada em primeiro lugar pelo tempo e posteriormente pelos açúcares redutores tanto os residuais como o do mosto. É interessante ressaltar que a produtividade é uma variável que leva em seu cálculo a consideração do tempo de fermentação e conseqüentemente esta variável (tempo) deveria influenciar em muito, contudo para inóculo convencional a variável viabilidade celular foi mais importante, levando a acreditar que as células de leveduras estavam sofrendo alguma inibição e portanto o fato de terem baixas produtividades era consequência principal de suas baixas viabilidades. Nesta mesma linha de raciocínio poderia-se dizer que nos ensaios com inóculo beneficiado, se ocorreu alguma inibição prejudicial ao rendimento da fermentação, foi consequência do nível de açúcares redutores no meio.

Tabela 16. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando a produtividade das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir na produtividade. Ensaio com inóculo convencional e mosto com 310g ART/litro.

passo	produtividade(Y) =	r =
1-viab.cel (X3)	$0,86+0,016*X3$	0,725**
2-tempo (X5)	$1,78+0,012*X3-0,016*X5$	0,813**
3-viabbr (X4)	$1,73+0,024*X3-0,017*X5-0,011*X4$	0,832**
4-ARTm (X6)	$8,77+0,026*X3-0,016*X5-0,019*X4-0,023*X6$	0,867**
5-CO <sub>2</sub> (X7)	$11,01+0,024*X3-0,013*X5-0,019*X4-0,033*X6+0,076*X7$	0,886**
6-ARR (X1)	$11,88+0,022*X3-0,009*X5-0,017*X4-0,038*X6+0,113*X7+0,009*X1$	0,900**
7-biomassa (X2)	$14,82+0,020*X3-0,009*X5-0,021*X4-0,048*X6+0,020*X7+0,017*X1+0,299*X2$	0,916**

produtividade(Y) = produtividade da fermentação (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); ARR(X1) = açúcares redutores residuais (g/L); biomassa(X2) = peso de leveduras (g); viab.cel(X3) = viabilidade celular (%); viabbr(X4) = viabilidade de brotos (%); tempo(X5) = tempo de fermentação (h); ARTm(X6) = açúcares redutores totais no mosto (g/L); CO<sub>2</sub>(X7) = CO<sub>2</sub> produzido (g);

Tabela 17. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando a produtividade das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir na produtividade. Ensaio com inóculo beneficiado e mosto com 310g ART/litro.

passo	produtividade(Y) =	r =
1-tempo (X5)	$3,51-0,034*X5$	0,839**
2-ARR (X1)	$3,49-0,027*X5-0,028*X1$	0,864**
3-ARTm (X6)	$11,38+0,015*X5-0,068*X1-0,026*X6$	0,912**
4-viab.cel (X3)	$16,14-0,012*X5-0,077*X1-0,041*X6-0,006*X3$	0,936**
5-biomassa (X2)	$17,44-0,008*X5-0,076*X1-0,050*X6-0,011*X3+0,344*X2$	0,950**
6-CO <sub>2</sub> (X7)	$16,76-0,008*X5-0,064*X1-0,055*X6-0,011*X3+0,306*X2+0,205*X7$	0,954**
7-viabr (X4)	$16,75-0,008*X5-0,065*X1-0,055*X6-0,011*X3+0,305*X2+0,205*X7+0,00006*X4$	0,954**

produtividade(Y) = produtividade da fermentação ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ); ARR(X1) = açúcares redutores residuais (g/L); biomassa(X2) = peso de leveduras (g); viab.cel(X3) = viabilidade celular (%); viabr(X4) = viabilidade de brotos (%); tempo(X5) = tempo de fermentação (h); ARTm(X6) = açúcares redutores totais no mosto (g/L); CO<sub>2</sub>(X7) = CO<sub>2</sub> produzido (g);

Com relação ao rendimento da fermentação analisado através das regressões múltiplas, pode ser observado nas Tabelas 18 e 19 que para inóculo convencional a viabilidade celular, viabilidade broto, açúcares redutores totais no mosto e tempo da fermentação foram os fatores que mais influíram. Contudo, para inóculo beneficiado os fatores que mais afetaram foram viabilidade, açúcares redutores residuais, tempo de fermentação e açúcares redutores totais no mosto. A análise sugere que para os ensaios com inóculo convencional a quantidade de células vivas e/ou em crescimento exerceu ação no rendimento. Por outro lado, para os ensaios com inóculo beneficiado a viabilidade celular também teve forte influência, contudo a concentração de açúcares redutores (residuais e no mosto) parece ter interferido com os valores de rendimentos, certamente por inibição.

Tabela 18. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando o rendimento das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir no rendimento. Ensaios com inóculo convencional e mosto com 310g ART/litro.

passo	rendimento(Y) =	r =
1-viab.cel (X3)	$45,57+0,322*X3$	0,535**
2-viabr (X4)	$41,14+0,824*X3-0,470*X4$	0,601**
3-ARTm (X6)	$288,25+0,898*X3-0,738*X4-0,783*X6$	0,676**
4-tempo (X5)	$293,61+0,907*X3-0,701*X4-0,857*X6+0,317*X5$	0,725**
5-CO <sub>2</sub> (X7)	$379,76+0,826*X3-0,726*X4-1,243*X6+0,427*X5+2,926*X7$	0,769**
6-ARR (X1)	$419,54+0,714*X3-0,613*X4-1,481*X6+0,585*X5+4,579*X7+0,404*X1$	0,812**
7-biomassa (X2)	$521,00+0,660*X3-0,762*X4-1,825*X6+0,587*X5+1,369*X7+0,681*X1+10,317*X2$	0,839**

rendimento(Y) = rendimento da fermentação (%); ARR(X1) = açúcares redutores residuais (g/L); biomassa(X2) = peso de leveduras (g); viab.cel(X3) = viabilidade celular (%); viabbr(X4) = viabilidade de brotos (%); tempo(X5) = tempo de fermentação (h); ARTm(X6) = açúcares redutores totais no mosto (g/L); CO<sub>2</sub>(X7) = CO<sub>2</sub> produzido (g);

Tabela 19. Resultados de regressões múltiplas lineares (stepwise) utilizando o rendimento das fermentações como variável dependente e correlacionando-a com outras sete variáveis, sendo estas introduzidas de acordo com sua capacidade de interferir no rendimento. Ensaio com inóculo beneficiado e mosto com 310g ART/litro.

passo	rendimento(Y) =	r =
1-viab.cel (X3)	$62,92+0,124*X3$	0,281NS
2-ARR (X1)	$67,76+0,152*X3-0,580*X1$	0,389NS
3-tempo (X5)	$53,81+0,202*X3-1,386*X1+0,454*X5$	0,559*
4-ARTm (X6)	$412,08+0,017*X3-2,743*X1+0,889*X5-1,149*X6$	0,755**
5-biomassa (X2)	$443,58-0,097*X3-2,730*X1+0,974*X5-1,371*X6+8,327*X2$	0,778**
6-CO <sub>2</sub> (X7)	$428,57-0,091*X3-2,470*X1+0,980*X5-1,494*X6+7,500*X2+4,523*X7$	0,785**
7-viabr (X4)	$446,20-0,020*X3-2,381*X1+0,945*X5-1,584*X6+9,464*X2+4,764*X7-0,114*X4$	0,788**

rendimento(Y) = rendimento da fermentação (%); ARR(X1) = açúcares redutores residuais (g/L); biomassa(X2) = peso de leveduras (g); viab.cel(X3) = viabilidade celular (%); viabbr(X4) = viabilidade de brotos (%); tempo(X5) = tempo de fermentação (h); ARTm(X6) = açúcares redutores totais no mosto (g/L); CO<sub>2</sub>(X7) = CO<sub>2</sub> produzido (g);



## 5. CONCLUSÕES

- 1-O uso de células de levedura separada por centrifugação do vinho e contendo componentes como o etanol e outros metabólitos, causa inibição da fermentação, atribuída à presença dos mesmos;
- 2-O uso de fermento com baixos teores de etanol e outros metabólitos do vinho propiciou fermentações com melhor rendimento e produtividade, melhor viabilidade das células e brotos de levedura;
- 3-A inibição da fermentação causada pela reciclagem de etanol e outros metabólitos junto com o fermento, não foi detectada em fermentações com vinhos com teor alcoólico ao redor de 6,4%v/v mas foi detectada com teores de 9,8%v/v;
- 4-A cinética das fermentações com mosto de 180g ART/L e vinhos com 6,4%v/v de etanol, em média, mostrou a ocorrência de fermentações, em batelada estáveis, sugerindo não haver processos inibitórios. Por outro lado, a cinética das fermentações com mosto de 310g ART/litro e vinhos com 9,8%v/v de etanol em média, sugere processos inibitórios que alteram o curso normal da fermentação;

5-No decorrer das fermentações em bateladas sucessivas, o teor de compostos secundários totais mostrou tendência de elevação, que foi reduzida com o uso de fermento beneficiado, com baixos teores de etanol e outros metabólitos. As tendências gerais apontam que o uso de fermento convencional propicia maiores teores de metanol e n-propanol, principalmente; os teores de isobutanol e álcool amílico mantiveram-se similares; o uso de fermento beneficiado provocou maior formação de n-butanol;

6-Os resultados apontam para o desenvolvimento de técnicas ou processos que permitam uma separação adequada entre as células de levedura e os componentes tóxicos do vinho, de forma a obter um fermento reciclado de melhor qualidade;

7-Nos experimentos realizados, com o uso de fermento beneficiado permitiu obter rendimentos de fermentação e produtividade superiores em 8,8 e 7,0%, respectivamente, em relação ao uso de fermento convencional

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01.AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.10,n.4, p.845-64, 1968.
- 02.ALMEIDA, S.B.G. Fermentação alcoólica: ensaios em batelada convencional e em batelada alimentada. Rio de Janeiro, 1980. 108p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 03.AMERINE, M.A. & CRUESS, W.V. **The technology of wine making**. 1ed. New York: AVI Publ, 1960. 709p.
- 04.AMORIM, H.V. Progressos na técnica de fermentação alcoólica no Brasil. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v.2, n.4, p.50-6, 1982.
- 05.AMORIM, H.V. Nutrição mineral da levedura; aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 'JAIME ROCHA DE ALMEIDA', 4. 1985, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ/STAB, 1985. p.44-8.

06. AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Fermentação descontínua: otimização do processo Melle-Boinot. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA "JAIME ROCHA DE ALMEIDA", 4. 1985, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ/STAB, 1985. p.114-21.
07. ASSUMPÇÃO, R.M.V. & MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. padronização - preparação - purificação. São Paulo. Edgard Blucher, 1968, 627p.
08. BAJPAI, P.; SHARMA, A.; RAGHURAM, N.; BAJAI, P.K. Rapid production of ethanol in high concentration by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* through soya flour supplementation. **Biotechnology Letters**, Kew, v.10, n.3, p.217-20, 1988.
09. BROWN, S.W.; OLIVER, S.G.; HARRISON, D.E.F.; RIGHELATO, R.C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v.11, p.151-5, 1981.
10. BUENO NETO, C.L. Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar. São Paulo, 1982. 147p. Dissertação (Mestrado em Química) - Escola Politécnica, USP.
11. CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.35, n.4, p.450-4, 1991.

- 12.CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. Solute transport. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. **The yeasts**. 2ed. London: Academic Press, 1989. v.3, p.5-56.
- 13.CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-growth brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol production. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.48, n.3, p.638-46, 1984.
- 14.CASTRO, H.F. Biocatalyst and substrate properties for alcohol production. Manchester, 1985. 139p. Tese (PhD em Ciências) - Faculty of Science, University of Manchester.
- 15.CHAPMAN, C. & BARTLEY, W. The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss mitochondrias. **Biochemical Journal**, London, v.107, p.455-65, 1968.
- 16.COPERSUCAR. **Fermentação**. Piracicaba: COPERSUCAR, 1987. 434p.
- 17.D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.93, p.472-6, 1987.
- 18.D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.1, p.110-14, 1988.

- 19.DRYSDALE, G.S. & FLEET, G.H. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. **The Journal of Applied Bacteriology**, Cambridge, v.67, n.5, p.471-82, 1989.
- 20.DUNTZE, W.; NEWMANN, D.; GANCEDO, T.M.; ATZPODIEN, W.; HOLDER, H. Studies on regulation and localization of glyoxylate cycles enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v.10, p.83-9, 1969.
- 21.FERRARI, S.E.; LOPES, J.J.C.; LEME, J.R.A.; OLIVEIRA, E.R. Industrial efficiency of alcohol fermentation: comparative study. In: SYMPOSIUM ALCOHOL FUELS TECHNOLOGY. 1980, São Paulo, p.139-44.
- 22.FUKUDA, K.; MUROMACHII, A.; WATANABE, M.; ASANO, K e TAKASAWA, S. Mutants producing high concentration of the flavor components active amylalcohol and normal propanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.75, n.4, p.288-92, 1993.
- 23.GANCEDO, C. & SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. **The yeasts**. 2ed. London: Academic Press, 1989. v.3, p.205-59.
- 24.GHOSE, T.K. & TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: I batch versus continuous systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.21, p.1387-400, 1979.
- 25.GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. Piracicaba:Nobel, 1990. 469p.

26. GRAY, W.D. The sugar tolerance of four strains of distiller's yeast. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.49, p.445-52, 1945.
27. GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 160p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
28. GUTIERREZ, L.E. **Tópicos de bioquímica de leveduras**. Piracicaba: NAPMA, 1994. 99p.
29. GUYMON, J.F.; INGRAHAM, J.L.; CROWELL, E.A. The formation of n-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Duluth, v.95, p.163-8, 1961.
30. HOPPE, G.K. & HANSFORD, C.S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. **Biotechnology Letters**, Kew, v.4, n.1, p.39-44, 1982.
31. HSIE, M. C. Improvement of alcohol fermentation. **Taiwan Sugar**, Taipei, v.28, n.2, p.46-9, 1981.
32. INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v.35, p.235-8, 1985.
33. INSTITUTO Nacional de Pesos e Medidas. **Ministério da indústria e comércio** - Tabelas de redução de massa específica e volume de misturas álcool etílico e água. Ed. do Sindicato da Indústria da Fabricação do Alcool no Estado de São Paulo, 1967.

34. JIMENEZ, J. & BENITEZ, T. Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.4, p.917-22, 1988.
35. KUNKEE, R.E. & AMERINE, M.A. Yeast in wine-making. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. **The yeast**. 1ed. New York: Academic Press, 1970. p.5-71.
36. LEÃO, C. & VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.24, p.1581-90, 1982.
37. LEÃO, C. & VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v.774, p.43-8, 1984.
38. LEITE, S.G.F. & FRANÇA, F.P. Intracellular ethanol and cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, n.2, p.163-5, 1990.
39. LEME, J.R.A.; LIMA, L.S.; LOPES, C.H.; FERRARI, S.E.; LOPES, J.J.C.; GERMEK, H.A.; OLIVEIRA, E.R. **Fermento selecionado IZ-1904**. Piracicaba: PLANALSUCAR, 1984. 15p.
40. LETORNEAU, L. & VILLA, P. *Saccharomyces* yeast growth on beet molasses effects of substrate concentration on alcohol toxicity. **Biotechnology Letters**, Kew, v.9, n.1, p.53-8, 1987.



- 41.LIMA, U.A. Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o desenvolvimento e atividade da *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1954. 54p. Tese (Doutor em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- 42.LINDÉN, T.; PEETRE, J.; HAHN H'AGERDAL B. Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.5, p.1661-9, 1992.
- 43.LOUREIRO, V. & FERREIRA, H.G. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.25, p.2263-9, 1983.
- 44.LOUREIRO DIAS, M.C. & PEINADO, J.M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Kew, v.4, p.721-4, 1982.
- 45.LUONG, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.27, p.280-5, 1985.
- 46.MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.25, p.103-21, 1983.
- 47.MAYNARD, A.A. Composition of wines. I. Organic constituents. In: MRAK, E.M. & STEWART, G.F. **Advances in Food Research**, New York, v.5, p.353-510, 1954.

- 48.MILLAR, D.G.; GRIFFITHS-SMITH, K; ALGAR, E.; SCOPES, R.K. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. **Biotechnology Letters**, Kew, v.4, n.9,p.601-6, 1982.
- 49.MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.22, p.2375-81, 1980.
- 50.NAGODAWITHANA, T. W. & STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.34, p.375-80, 1990.
- 51.NAVARRO, J.M. Fermentation alcoolique: influence des conditions de culture sur l'inhibition par l'ethanol. **Cellular & Molecular Biology**, Elmsford, v.26, p.241-6, 1980.
- 52.NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, E.R. de.; VALSECHI, O. **I CURSO DE EXTENSÃO EM AGUARDENTE DE CANA (apontamentos)**. Piracicaba: COPACESP, 1974. 104p.
- 53.OHBUCHI, K.; ISHIKAWA, Y.; KANDA, A.; HAMACHII, M.; NUNOKAWA, Y. Alcohol dehydrogenase I of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* kyokai n.7. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.81, n.2, p.125-32, 1996.
- 54.OKOLO, B.; JOHNSTON, J.R.; BERRY, D.R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. **Biotechnology Letters**, Kew, v.9, n.6, p.431-4, 1987.

- 55.OMORI, T.; TAKASITA, H.; OMORI, N.; SHIMODA, M. High glycerol producing amino acid analogue resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.80, n.3, p.213-17, 1995.
- 56.OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, v.4, p.19-35, 1977.
- 57.PANCHAL, C.J.; TAVARES, F.C.A. Yeast strain selection for fuel ethanol production. In: PANCHAL, C.J. **Yeast strain selection**. 1ed. New York: Marcel Deckker, 1990. cap.8, p.225-43.
- 58.PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, L.; ROMAY, C.; KOTYK, A. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.32, p.374-8, 1988.
- 59.PEISINO, G. Avaliação de leveduras industriais em diferentes condições de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1987. 140p. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- 60.PERLOT, P. Influence of culture medium composition on the kinetics of yeast growth and ethanol production. **International Conference on (fuel) Alcohols & Chemicals from Biomass**, Gadalajara, v.2, p.1-12, 1989.
- 61.PLANALSUCAR. Fermento selecionado IZ 1904. **Manual de utilização Planalsucar**. Piracicaba, 1984. 15p.

- 62.PONS, M.N.; PICHON, D.; AUTHIER, M. Monitoring of alcoholic fermentations of fruit juices via a gas membrane sensor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.4, p.282-5, 1989.
- 63.RATLEDG, C. & EVANS, C.T. Lipids and their metabolism. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. **The yeasts**. 2ed. London: Academic Press, 1989. v.3, cap.10, p.367-455.
- 64.RHEINBOLDT, P.H.H.; LEIMER, K.H.; ROSSELL, C.E.V. Sangria e secagem de levedura-processo CTC. **Boletim Técnico Copersucar**. Piracicaba, v.39, p.8-12, 1987.
- 65.SARRIES, G. A.; ALVES, M.C.; de OLIVEIRA, J.C.V. SANEST- Sistema de Análise Estatística para DOS. **Série Didática Ciagri n.6**. Piracicaba, 57p, 1992.
- 66.SHARF, J.M. **Exame microbiológico de alimento**. 2.ed. São Paulo: Polígono, 1972. 257p.
- 67.SWEERE, A.P.J.; MATLA, Y.A.; ZANDVLIET, J.; LUYBEN, K.C.A.; LOSSEN, N.W.F. Experimental simulation of glucose fluctuations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.28, p.109-15, 1988.
- 68.TRÍBOLI, E.P.R. **Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica**. São Caetano do Sul: Instituto Mauá de Tecnologia, 1987. 40p.
- 69.VAN UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeast. In: TSAO, G. T. **Annual reports on fermentation process**. 1ed. New York: Academic Press, 1985. v.8, p.11-58.

- 70.VASCONCELOS, J.N. & VILELA FILHO, V. Estudo do comportamento cinético da fermentação alcoólica industrial conduzida pelo processo descontínuo. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.7, n.2, p.40-50, 1988.
- 71.VEGA, J.L.; NAVARRO, A.R.; CLAUSEN, E.C. e GADDY, J.L. Effects on inoculum size on ethanol inhibition modeling and other fermentation parameters. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.29, p.633-8, 1987.
- 72.WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. Continuous production of ethanol in high concentration using immobilized growing yeast cells. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.11, p.67-71, 1981.
- 73.WEEB, A.D. & INGRAHAM, J.L. Fusel Oil. **Adv. Appl. Microbiol**, v.5, p.317-53, 1963.

## APÊNDICES

Apêndice 1. Programa desenvolvido em Turbo Pascal 7.0, para calcular etanol % massa, entrando etanol % volume.

```
program EtanolMassa;
uses crt;
var
  i,j : real;
function Interpola(X1, Y1, X2, Y2, X3: Real): Real;

begin
  Interpola := ((X3-X2)*(Y1-Y2)/(X1-X2)) + Y2;
end;
function ProcDuasCol(C1: Real; NomeArq: PathStr): Real;
type
  TTipo = array[1..2] of Real;
var
  Tipo: TTipo;
  ArqTipo: file of TTipo;
  Reg: Integer;
  X1, Y1, X2, Y2: Real;

begin
  Assign(ArqTipo, NomeArq);
  Reset(ArqTipo);
  Reg := 0;
  Seek(ArqTipo, Reg);
  Read(ArqTipo, Tipo);
  while (Tipo[1] < C1) and (not EOF(ArqTipo)) do
```

```

begin
  Inc(Reg);
  Seek(ArqTipo, Reg);
  Read(ArqTipo, Tipo);
end;
if C1 = Tipo[1] then
  ProcDuasCol := Tipo[2]
else
  begin
    X1 := Tipo[1]; Y1 := Tipo[2];
    Seek(ArqTipo, (Reg-1));
    Read(ArqTipo, Tipo);
    X2 := Tipo[1]; Y2 := Tipo[2];
    ProcDuasCol := Interpola(X1, Y1, X2, Y2, C1);
  end;
  Close(ArqTipo);
end;

```

```

begin
  i := 255;
  While i <> 0 do
    begin
      clrscr;
      gotoxy(10,10);
      write('Entre com a % Volume:');
      gotoxy(32,10);
      read(i);
      gotoxy(32,11);
    end;
  end;

```



```
j := ProcDuasCol(i,'a:\VolMas.tbl');
gotoxy(10,14);
write('A porcentagem em Massa e:');
gotoxy(37,14);
write(j:5:2);
readkey;
end;
clrscr;
end.
```

Apêndice 2 Programa desenvolvido em Turbo Pascal 7.0, para calcular densidades, entrando o brix refratométrico.

```
program BrixDens;
uses crt;
var
  i,j : real;
function Interpola(X1, Y1, X2, Y2, X3: Real): Real;

begin
  Interpola := ((X3-X2)*(Y1-Y2)/(X1-X2)) + Y2;
end;
function ProcDuasCol(C1: Real; NomeArq: PathStr): Real;
type
  TTipo = array[1..2] of Real;
var
  Tipo: TTipo;
  ArqTipo: file of TTipo;
  Reg: Integer;
  X1, Y1, X2, Y2: Real;

begin
  Assign(ArqTipo, NomeArq);
  Reset(ArqTipo);
  Reg := 0;
  Seek(ArqTipo, Reg);
  Read(ArqTipo, Tipo);
  while (Tipo[1] < C1) and (not EOF(ArqTipo)) do
    begin
      Inc(Reg);
      Seek(ArqTipo, Reg);
      Read(ArqTipo, Tipo);
    end;
  if C1 = Tipo[1] then
    ProcDuasCol := Tipo[2]
  else

    begin
      X1 := Tipo[1]; Y1 := Tipo[2];
      Seek(ArqTipo, (Reg-1));
      Read(ArqTipo, Tipo);
      X2 := Tipo[1]; Y2 := Tipo[2];
      ProcDuasCol := Interpola(X1, Y1, X2, Y2, C1);
    end;
end;
```

```
end;  
Close(ArqTipo);  
end;
```

```
begin  
i := 255;  
While i <> 0 do  
begin  
clrscr;  
gotoxy(10,10);  
write('Entre com Brix:');  
gotoxy(32,10);  
read(i);  
gotoxy(32,11);  
j := ProcDuasCol(i,a:\BrixDens.tbl');  
gotoxy(10,14);  
write('A Massa Especifica e:');  
gotoxy(37,14);  
write(j:8:5);  
readkey;  
end;  
clrscr;  
end.
```

Apêndice 3 Programa desenvolvido em Turbo Pascal 7.0, para calcular densidade de soluções através de seu teor alcoólico.

```
program CalcDens;

uses crt;

var
  i,j : real;
function Interpola(X1, Y1, X2, Y2, X3: Real): Real;

begin
  Interpola := ((X3-X2)*(Y1-Y2)/(X1-X2)) + Y2;
end;
function ProcDuasCol(C1: Real; NomeArq: PathStr): Real;
type
  TTipo = array[1..2] of Real;
var
  Tipo: TTipo;
  ArqTipo: file of TTipo;
  Reg: Integer;
  X1, Y1, X2, Y2: Real;

begin
  Assign(ArqTipo, NomeArq);
  Reset(ArqTipo);
  Reg := 0;
  Seek(ArqTipo, Reg);
  Read(ArqTipo, Tipo);
  while (Tipo[1] < C1) and (not EOF(ArqTipo)) do
    begin
      Inc(Reg);
      Seek(ArqTipo, Reg);
      Read(ArqTipo, Tipo);
    end;
  if C1 = Tipo[1] then
    ProcDuasCol := Tipo[2]
  else
    begin
      X1 := Tipo[1]; Y1 := Tipo[2];
      Seek(ArqTipo, (Reg-1));
      Read(ArqTipo, Tipo);
      X2 := Tipo[1]; Y2 := Tipo[2];
      ProcDuasCol := Interpola(X1, Y1, X2, Y2, C1);
    end;
end;
```

```
end;  
Close(ArqTipo);  
end;  
  
begin  
i := 255;  
While i < 0 do  
begin  
clrscr;  
gotoxy(10,10);  
write('Entre com a % Volume:');  
gotoxy(32,10);  
read(i);  
gotoxy(32,11);  
j := ProcDuasCol(i,'a:\VolDens.tbl');  
gotoxy(10,14);  
write('A Massa Especifica e:');  
gotoxy(37,14);  
write(j:8:5);  
readkey;  
end;  
clrscr;  
end.
```