

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FATORES QUE INFLUEM NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE
LEVEDURA SECA (*Saccharomyces cerevisiae*) DA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

PARECER

Eng^a Marcia Edilamar Pulzatto
Orientada

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Márcia Edilamar Pulzatto, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de julho de 2000.

Prof Dr Gil Eduardo Serra
Orientador

Campinas, 10 de julho de 2000.

Prof Dr Silvio Roberto Andrietta
Coorientador

[Assinatura]
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Presidente da Banca

200013047
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P968f
V.	Ex.
TOMBO BC	42136
PROC.	16-278100
C	☐
D	☒
PREC	R\$22,00
DATA	19/09/00
N.º CPD	

CM-00145920-1

BIB ID 276966

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

P968f Pulzatto, Marcia Edilamar
Fatores que influem na obtenção de biomassa de levedura
seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da fermentação alcoólica /
Marcia Edilamar Pulzatto.- Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Gil Eduardo Serra
Co-orientador: Silvio Roberto Andrietta
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Saccharomyces cerevisiae. 2.Proteínas. 3.Fermentação.
4.Biomassa. I.Serra, Gil Eduardo. II.Andrietta, Silvio Roberto.
III.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV.Título.

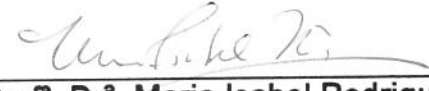
BANCA EXAMINADORA

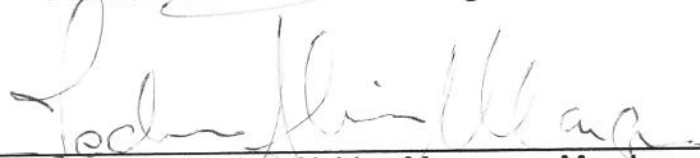

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra – Orientador

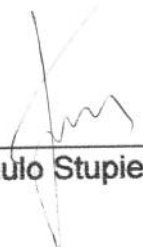
Prof. Dr. Nelson Horácio Pezoa – Membro

Prof. Dr. João Bosco Faria – Membro


Dr.ª Maria da Graça Stupiello Andrietta – Membro


Prof.ª Dr.ª Maria Isabel Rodrigues – Membro


Prof. Dr. Tadeu Alcides Marques - Membro


Prof. Dr. José Paulo Stupiello - Membro

Campinas/2000.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Um tempo para cada coisa

*Para tudo há um tempo, para cada
coisa há um momento debaixo dos céus:*

tempo para nascer,

e tempo para morrer;

tempo para plantar,

*e tempo para arrancar
o que foi plantado;*

tempo para matar,

e tempo para sarar;

tempo para demolir,

e tempo para construir;

tempo para chorar,

e tempo para rir;

tempo para gemer,

e tempo para dançar;

tempo para atirar pedras,

e tempo para ajuntá-las;

tempo para dar abraços,

e tempo para apertar-se;

tempo para procurar,

e tempo para perder;

tempo para guardar,

e tempo para jogar fora;

tempo para rasgar,

e tempo para costurar;

tempo para calar,

e tempo para falar;

tempo para amar,

e tempo para odiar;

tempo para guerra,

e tempo para a paz.

DEDICATÓRIA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Aos meus familiares, meus maiores incentivadores, pelo significado
da presença deles em minha vida.*

" O amor multiplica tudo, até mesmo o conhecimento ... "

AGRADECIMENTOS

Aos professores Gil Eduardo Serra e Sílvia Roberto Andrietta, por todo o conhecimento, disponibilidade e oportunidade de enriquecimento pessoal durante a realização deste trabalho. Especialmente, por toda a confiança, amizade e carinho desde o início.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização do trabalho.

À Banca Examinadora pela disponibilidade, atenção e colaboração para a conclusão desta tese.

Aos Amigos, pela amizade, apoio e carinho dispensados.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos e do CPQBA pela ajuda durante a realização deste trabalho.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Muito Obrigada.

ÍNDICE GERAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. ASPECTOS GERAIS.....	6
2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE LEVEDURA.....	7
2.3. PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DA LEVEDURA.....	14
2.4. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	17
2.5. TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE LEVEDURA SECA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	26
2.6. CARBOIDRATOS DE RESERVA E FERMENTAÇÃO ENDÓGENA.....	32

2.7. MERCADO E QUALIDADE DA LEVEDURA SECA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1. CEPAS UTILIZADAS.....	42
3.2. CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO.....	42
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	48
3.4.1. Determinação de Etanol.....	48
3.4.2. Determinação de Massa Seca.....	49
3.4.3. Determinação dos Açúcares Redutores Totais.....	49
3.5. CAPACIDADE FERMENTATIVA.....	51
3.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA NA MASSA DE LEVEDURA SECA.....	55
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59

4.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DO TEOR DE PROTEÍNA DAS CEPAS ISOLADAS APÓS FERMENTAÇÃO EM MEIO PADRÃO SINTÉTICO SEM RECICLO.....	59
4.2. AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO C/N SOBRE O DESEMPENHO FERMENTATIVO E TEOR DE PROTEÍNA DAS CEPAS DE LEVEDURA.....	67
4.3. AVALIAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA COM O NÚMERO DE CICLOS DE FERMENTAÇÃO.....	85
4.4. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNA NA MASSA SECA OBTIDA DE LEVEDURA.....	91
5. CONCLUSÕES.....	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - Composição química aproximada de levedura seca de fermentação alcoólica.....	8
TABELA 2.2 - Composição química em vitaminas de levedura seca de fermentação alcoólica.....	13
TABELA 2.3 - Especificações para levedura seca.....	40
TABELA 3.1 - Relação das Usinas de Açúcar ou Destilarias onde foram coletadas amostras e isoladas as cepas de levedura dominante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
TABELA 3.2 - Constituição do meio padrão sintético, utilizado como substrato para fermentação.....	46
TABELA 4.1 - Resultados experimentais (médias) e estatísticos do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), e comparação de médias pelo teste Tukey (5%) das variáveis Yp/s, Yx/s, Etanol no Vinho, Conversão de Substrato, Eficiência da Cepa, Rendimento da Fermentação, Capacidade Fermentativa (CF) e Proteína (levedura seca).....	61
TABELA 4.2 - Resultados do Coeficiente de Correlação Linear (r) entre os parâmetros, estatisticamente significativos ao nível de significância de 1 %, para as variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Produção Específica de Células (Yx/s), Etanol no Vinho (ETOH vinho), Conversão de Substrato (CONV), Eficiência da Levedura (EFIC), Rendimento da Fermentação (REND) e Proteína na Levedura Seca (PROT).....	64

TABELA 4.3 - Resultados médios de Rendimento da fermentação em função dos teores de proteína nas cepas de levedura.....	65
TABELA 4.4 - Resultados (médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Produção Específica de Etanol e Eficiência da Levedura.....	70
TABELA 4.5 - - Resultados (médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Produção Específica de Células (Yx/s).....	71
TABELA 4.6 - Resultados do Coeficiente de Correlação Linear (r) com nível de significância de 0,1 %, entre as variáveis: Produção Específica de Etanol (Yp/s), Produção Específica de Células (Yx/s), Etanol no Vinho (ETOH vinho), Conversão de Substrato (CONV), Eficiência da Levedura (EFIC) e Rendimento da Fermentação (REND).....	72
TABELA 4.7 - Resultados (médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para para Conversão de Substrato e Rendimento da Fermentação.....	75
TABELA 4.8 - Resultados obtidos de Capacidade Fermentativa para as cepas das Usinas Diamante, Goiás, Clealco e Rosário em meios com diferentes relações C/N.....	79

TABELA 4.9 - Resultados (médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Proteína e Produção de Biomassa.....	81
TABELA 4.10 - Efeito da adição de N-protéico sobre a produção de biomassa e produção específica de células, de todas as cepas.....	83
TABELA 4.11 - Resultados (médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Produção de Proteína.....	84
TABELA 4.12 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Diamante.....	86
TABELA 4.13 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Goiasa.....	87
TABELA 4.14 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Clealco	87

TABELA 4.15 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Y_p/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Vale do Rosário.....88

TABELA 4.16 - Resultados (médias) de teor de proteína na massa celular, produção de massa seca e proteína (fermentação convencional e fermentação endógena) nas cepas das Usinas Diamante, Goiás e Vale do Rosário.....96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - Sequência de operações realizadas e pontos de amostragem.....	47
FIGURA 4.1 - Produção específica de células (Y_x/s) obtida nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.....	72
FIGURA 4.2 - Conversão de substrato (CONV) nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.....	73
FIGURA 4.3 - Rendimento (REND) obtido nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.....	76
FIGURA 4.4 - Teor de proteína (PROT) nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.....	77
FIGURA 4.5 - Produção de biomassa nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.....	82
FIGURA 4.6 - Teor de proteína na massa celular seca de 4 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em fermentação com reciclo de fermento.....	82
FIGURA 4.7 – Produção de proteína nos meios com 3, 6, e 9 g de extrato de levedura por litro.....	82

RESUMO

No processo de fermentação alcoólica para produção de álcool com recuperação de células de levedura, como praticado no Brasil, é possível a “sangria” de cerca de 20 % da levedura sem afetar o desenvolvimento da fermentação, e assim produzir levedura seca para complementação protéica da ração animal.

O teor de proteína na levedura seca, obtida em condições industriais, é geralmente relatado entre 30-35 %. Neste trabalho foram coletadas cepas de 12 unidades localizadas em diversas regiões produtoras de álcool. Em meio sintético padronizado, as cepas representadas pela levedura principal de cada destilaria apresentaram de 39 a 51 % de proteína na levedura seca (em estufa, até peso constante). O teor de proteína das leveduras isoladas permitiu a separação das diferentes cepas em 4 categorias distintas: baixo (39,0 - 42,9 %), médio-baixo (43,0 - 45,9 %), médio-alto (46,0 - 48,9 %) e alto (49,0 - 51,0 %).

O preço de mercado da levedura seca é influenciado pelo teor de proteína da mesma, o que conduziu à avaliação do efeito de dois fatores sobre o teor de proteína da levedura: parâmetros fermentativos e produção de biomassa; pela complementação do meio fermentativo com fonte nitrogenada protéica (3, 6 e 9 g/L de extrato de levedura) e pelo emprego do processo de fermentação endógena.

A oferta de fonte de nitrogênio protéico complexa não alterou os níveis de proteína das leveduras independente do teor de proteína. Contudo, os níveis de extrato de levedura causaram elevação da produção de biomassa celular, mostrando sua influência direta, até em concentração de 9 g de extrato de levedura por litro de meio, mesmo em presença de fonte de nitrogênio mineral não limitante.

A complementação com extrato de levedura influenciou marcadamente o rendimento em etanol, massa celular e outros parâmetros da fermentação alcoólica,

mesmo na presença de fonte de nitrogênio mineral não limitante, em leveduras com baixo a alto teor de proteína.

A fermentação endógena mostrou ser eficiente em elevar o teor protéico da célula, em torno de 15 a 23 %, em média.

Os dados obtidos também mostraram haver redução na massa de levedura seca produzida em torno de 19 a 27 % em média, o que foi determinante para a redução da produção de proteína. Dessa forma a levedura resultante da fermentação endógena deve ter garantida uma remuneração de aproximadamente 40 % superior ao da levedura seca obtida diretamente da fermentação alcoólica, visando a cobertura dos custos de produção, impostos proporcionais, ensaque, armazenamento e taxa de retorno.

SUMMARY

The production of dry yeast (*S. cerevisiae*) from alcohol fermentation is being made by the take off of nearly 20 % of the overall yeast biomass separated through the wine centrifugation.

The fermentation tanks of twelve distilleries were sampled and their main fermentative yeast strain was isolated. These strains were grown in a standard synthetic medium in order to determine their protein content, which presented a wide variation between 39-51 % in dry basis. According to the protein content, strains were classified in four groups: low (39,0 - 42,9 %), medium-low (43,0 - 45,9 %), medium-high (46,0 - 48,9 %) and high (49,0 - 51,0 %).

Once the market price of the dry yeast is dependent of its protein content, this study involved the effect of two factors over the yeast protein content, fermentation yields and biomass production: a) the complement of the fermentative medium with proteic nitrogen (3, 6 e 9 g/L of yeast extract), and b) the endogenous fermentation (fermentation of reserve carbohydrate).

The different levels of a complex source of proteinic nitrogen did not change the protein content of the yeasts of all the four groups. The higher levels of yeast extract caused a raise in yeast biomass production, and ethanol yield even in the presence of non-limiting inorganic nitrogen content of the fermentative medium.

The endogenous fermentation showed to be effective in increase the protein content of the yeast cell, by 15 to 23 % in average. The results also showed that there is a decrease in the mass of dry yeast, by 19 to 27 % in average. The combination of these two results was the reduction of the mass of protein production. In these circumstances it is estimated that the dry yeast from endogenous

fermentation, must achieve a over price of 40 % approximately, in order to make it feasible.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, na indústria de alimentos e ração animal, observa-se uma tendência mundial em substituir as proteínas de origem animal pelas proteínas vegetais. O progresso tecnológico no campo da biotecnologia tem conduzido ao desenvolvimento de novos processos e seleção de microrganismos para a obtenção de biomassa microbiana como fonte protéica.

Grande parte das pesquisas realizadas mundialmente tratam da produção de biomassa microbiana dentro do contexto de aproveitamento de efluentes que podem ser adequados como substratos para a multiplicação de microrganismos. Nesta situação pleiteia-se uma grande economia não só pelo uso de um resíduo industrial praticamente sem custo, mas também pelo fato de que esta fermentação microbiana ao assimilar fontes de carbono do efluente causa a redução de sua demanda bioquímica de oxigênio, atuando como um tratamento biológico do mesmo.

Os diversos pesquisadores que abordam sua viabilidade técnica e econômica são unânicos em concluir que o processo de produção de proteína unicelular depende intensamente de capital, apresentando um alto custo relativo para matéria-prima e energia. Mesmo, nos casos em que o custo da matéria-prima de resíduos industriais pode ser atrativo, geralmente os efluentes não estão disponíveis em quantidades suficientes num só fornecedor, e assim os custos de transporte podem ser proibitivos.

Dentre todos os microrganismos, as leveduras são amplamente os mais aceitos como um alimento tradicional, e têm recebido grande atenção como uma fonte potencial de proteína. A vasta literatura sobre as leveduras como fonte de

proteína indica que sua produção é praticada há muitas décadas, da mesma forma que seu uso também tem sido estudado, havendo inúmeros artigos científicos e capítulos de livros que confirmam seu potencial e apresentam estudos de viabilidade econômica, sempre se referindo à produção de levedura como produto principal do empreendimento, com grau alimentício para consumo humano ou como complemento de ração animal. Algumas dessas fontes mencionam a fabricação industrial, para uso direto como componente de ração animal ou como matéria prima para obtenção de derivados para o setor farmacêutico e alimentício. As espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* (conhecida também como "torula") e *Kluyveromyces fragilis* são as mais difundidas, e quando obtidas a partir de substratos geralmente açucarados (e não de resíduos ou subprodutos industriais), são liberadas para aplicações em alimentos.

Considerando-se as condições peculiares da produção de álcool no Brasil, com a fermentação alcoólica de açúcares do caldo de cana ou do melaço proveniente da fabricação do açúcar, a "sangria" ou o simples desvio de parte da biomassa de levedura, sem prejuízo à produção de álcool, constitui-se um caso isolado de viabilidade de produção de proteína unicelular.

Deste modo a indústria sucroalcooleira brasileira tem colocado no mercado um produto denominado de "levedura seca", que consiste da retirada ("sangria") de cerca de 20% das células do processo de fermentação, na forma de uma suspensão de células separadas na centrifugação do vinho, seguindo-se sua lavagem e centrifugação, desalcoolização, termólise e secagem. É evidente que se trata de um produto com processamento mínimo, cuja origem é a fermentação de caldo de cana e melaço, em condições não estéreis e portanto com os contaminantes bacterianos próprios da fermentação alcoólica (bactérias lácticas

predominantemente). Impurezas do caldo de cana e do processo também estarão presentes, em maior ou menor grau, dependendo se o mosto provém de caldo clarificado, e da realização e eficiência da(s) lavagem(s) das células de levedura. Uma prática que pode contribuir para uma maior pureza da levedura seca, é instalar meios de realizar a sangria ou corte do leite de levedura quando se está centrifugando o vinho de maior pureza, evitando o fundo de dorna. Como se trata de um subproduto de extração, pouco ou nenhum desenvolvimento é incorporado ao processo de fermentação com vista final para a qualidade da levedura seca a ser obtida.

Em termos nacionais o potencial de produção de levedura seca de fermentação alcoólica pode garantir uma ampla oferta desse produto de modo a interessar decisivamente as empresas, principalmente aquelas de ração animal, no desenvolvimento de produtos contendo levedura seca.

Todavia, embora o valor nutricional da proteína da levedura seja considerado adequado e comparável ao de outras fontes de uso convencional, é preciso lembrar que não se encontra numa forma totalmente disponível nas células intactas da levedura. A parede celular, composta de material polissacarídico que representa ao redor de 30% do peso da célula, não é digerível, o que reduz a biodigestibilidade das proteínas. Além disso, no material obtido de células rompidas é relatada a presença de substâncias fisiologicamente ativas e alergênicas, além de elevada concentração de ácidos nucleicos (RNA). As células intactas também não oferecem atributos de qualidade como aroma, cor, sabor e textura, e suas propriedades funcionais também não são atrativas. Tudo isto significa que as células de levedura certamente precisam ser submetidas a processamentos adequados, para que possam ser extraídos seus componentes, e transformados ou modificados, para o efetivo aproveitamento de

suas propriedades alimentícias e funcionais no preparo de alimentos. Se o objetivo é fazer uso de propriedades funcionais das proteínas, ou se é o uso meramente nutricional para seres humanos ou animais, serão distintas as características secundárias importantes a selecionar em leveduras fermentativas, principalmente em relação à parede celular, ácidos nucleicos (RNA), ribonucleases endógenas e proteases endógenas.

O teor de proteína é o referencial mais importante no estabelecimento do preço e na comercialização da levedura seca de fermentação alcoólica. Esse teor tem variado, em leveduras secas comercializadas, numa faixa ampla de 28-45 %. Essa variação pode ser atribuída a diversos fatores como a linhagem da levedura, composição do meio de fermentação, impurezas presentes no meio de fermentação e no leite de levedura centrifugado, métodos e cuidados na secagem da levedura, entre outros. Por outro lado, toda atenção e interesse no uso de levedura seca está dirigido unicamente para o seu teor de proteína e conteúdo em aminoácidos. Nos estudos de nutrição animal há pouca referência ao conteúdo e ação de outros componentes como vitaminas, minerais, polissacarídeos e açúcares simples, entre outros.

Sem dúvida, o setor sucroalcooleiro tem empresas que estão amadurecendo em direção à necessidade de diversificação, e descobrindo negócios adicionais de interesse direto de seus proprietários ou acionistas, quer o mercado do açúcar ou do etanol esteja lucrativo ou menos interessante. No que concerne à levedura seca, no estágio atual a primeira questão a ser buscada é uma conscientização do próprio setor produtivo a respeito da qualidade de seu produto e de suas condições específicas de comercialização. Quanto à qualidade, o que se observa é uma ampla variabilidade até mesmo no teor de seu componente principal, a proteína, e ainda na cor e pureza do produto. Em relação

à comercialização, o que se observa é que sendo um produto sazonal não há ação dos produtores em manter um estoque regulador que permita manter e selecionar clientes para fornecimento continuado e a preços compensadores. Nestas condições, cada produtor tem desenvolvido ações isoladas, havendo usinas que investiram na melhoria do processamento a partir da suspensão de células de levedura fornecida pela fermentação, como igualmente se preocuparam em incorporar ao seu produto, já diferenciado da média do mercado, a garantia de fornecimento de uma cota mínima mensal durante todo o ano.

Portanto, a consolidação da otimização do processamento e da uniformização do produto com critérios mínimos que sejam, considerando o processo global desde o preparo do mosto para a fermentação alcoólica, é o ponto de partida para demonstrar aos consumidores o firme propósito de uma parceria duradoura.

Neste contexto foi delineado o presente trabalho com vistas a contribuir com resultados e indicações relativas à produção de levedura seca de fermentação alcoólica.

O objetivo deste trabalho é de verificar a questão básica do teor de proteína das células de levedura, amostradas em unidades industriais de produção de álcool, conhecer seu teor em proteína e a variabilidade entre as cepas amostradas, a influência do nitrogênio protéico do substrato no desempenho fermentativo e teor de proteína da célula, o papel da pós-fermentação dos açúcares de reserva (fermentação endógena) principalmente quanto à quantidade de proteína obtida (massa celular e teor protéico), e avaliação preliminar da evolução do teor de proteína em ciclos fermentativos sucessivos, em laboratório.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GERAIS

O uso de fontes protéicas não convencionais na indústria de alimentação animal tem crescido a cada ano que passa, pela possibilidade de substituição de componentes das rações, com vistas à obtenção de um produto de menor custo (Furco, 1996).

Dentre as fontes que podem substituir os suplementos protéicos convencionais, pode-se citar as algas, as bactérias, os fungos e as leveduras. O uso destes microrganismos na alimentação humana e animal deve-se principalmente à possibilidade de cultivo em vários substratos, à alta velocidade de crescimento e também ao seu elevado conteúdo protéico (Butolo, 1996).

Dos microrganismos citados acima pode-se destacar o uso da proteína celular de levedura, em especial a *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente no caso do Brasil, o maior produtor mundial de álcool (Butolo, 1996 e Furco, 1996).

A produção de levedura seca tem sido muito usada em destilarias de álcool. A Usina São Martinho, por exemplo, uma das maiores unidades produtoras do mundo, produz aproximadamente 2,0 milhões de litros de álcool/dia, tendo portanto potencial para gerar 40 toneladas de levedura seca/dia (Furco, 1996).

2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE LEVEDURA

Embora a composição química da levedura seja amplamente afetada pelas condições químicas e físicas do meio de crescimento, pela espécie e idade da cultura e pela taxa de crescimento, as características básicas da biomassa de levedura seca podem ser resumidas como tendo: alto teor de proteína, alto conteúdo de ácidos nucleicos, baixo conteúdo de lipídios, alto conteúdo de cinzas, conteúdo moderado de carboidratos e alto conteúdo de vitaminas (Desmont, 1968; Aiba et al., 1971 e Halász & Lásztity, 1991). Dentre os fatores acima citados, o substrato utilizado é o mais importante, afetando tanto a taxa de crescimento como a composição, principalmente em proteínas e lipídios (Hse, 1961 e Vananuvat & Kinsella, 1975). Além disso no processo de recuperação da levedura, as lavagens sucessivas com água, para eliminar as impurezas do leite de levedo ou do resíduo de fundo de dorna, podem acarretar significativas variações na composição da levedura. Salgado (1976) observou um aumento de 33 para 42 % de proteína bruta, como resultado de quatro lavagens; no entanto, foram observadas perdas de matéria seca, proteínas e minerais do material original.

Leveduras de panificação apresentam cerca de 25 % de matéria seca (Suomalainen & Oura, 1971), dos quais cerca de 10 % é representado pela trealose, 12 % pelo glicogênio, 8 % pela glucana e 6 % pela manana (Suomalainen & Pfaffli, 1961 e Amorim et al., 1994).

O teor de proteína bruta ($N_{total} \times 6,25$) situa-se entre 40 e 56 % da matéria seca. Cerca de 80 % do nitrogênio encontra-se na forma de aminoácidos, 12 % na forma de ácidos nucleicos, 8 % como amônia e quantidades menores na

forma de lecitina, glutatona, ácido adelnico, vitaminas e coenzimas (Peppler, 1970).

A Tabela 2.1 mostra a composição química aproximada da levedura seca de recuperação. O nível protéico bruto nesta levedura está em torno de 30% (Myiada, 1978, Fialho et al., 1983, Lima, 1983 e Moreira, 1984).

TABELA 2.1 - Composição química aproximada de levedura seca de fermentação alcoólica.

Componentes (%)	Fontes			
	Myiada (1978)	Fialho et al. (1983)	Lima (1983)	Moreira (1984)
Matéria Seca	90,70	93,90	92,44	96,40
Proteína	30,77	30,62	29,17	30,23
Aminoácidos	25,75	-	25,87	30,62
Lipídios	1,10	1,60	1,22	0,89
Fibra	0,13	2,35	0,79	0,72
Cinzas	9,81	9,82	11,81	14,43
Cálcio	1,48	1,19	1,23	1,52
Fósforo	0,75	0,67	0,59	0,68

Fonte: Lahr Filho et al. (1996)

A composição química da levedura pode também ser alterada quando esta é exposta a um processo de fermentação, sob condições de "stress", ou seja, sob à temperatura de 37°C, durante períodos de 12 horas, com agitação constante e na ausência de uma fonte de carbono. Nestas condições as substâncias de reservas, principalmente os carboidratos acumulados durante a fermentação, são metabolizados liberando energia para as atividades biológicas da célula e formação de etanol (Lahr Filho et al., 1996).

A composição química bruta da biomassa de levedura é de 7,5-9,0 % de N, 47-56 % de proteína (fator 6,25), 6-15 % de ácidos nucléicos, 5,0-9,5 % de

cinzas e 2-6 % de lipídios (Reed, 1982 e Kinsella, 1987). Dentre os aminoácidos determinados em *S. cerevisiae* destacam-se lisina (8,43 %), leucina (8,13 %), valina (6,67 %), arginina (5,35 %), treonina (5,20 %), isoleucina (5,19 %), tirosina (4,87 %), fenilalanina (4,50 %) e outros como histidina, cistina, metionina e triptofano (Reed, 1982).

Proteínas

O teor de proteína de *Saccharomyces cerevisiae* é elevado quando comparado a outras fontes protéicas convencionais, sendo superior ao do trigo e do leite e um pouco inferior ao do ovo e da carne (Mateles & Tannenbaum, 1968). Do nitrogênio presente nas células microbianas, 70 a 80 % constituem estruturas protéicas. De acordo com este mesmo autor, 8 a 13 % do nitrogênio são purinas, 4 % são piridinas e 0,5 % são glucosaminas.

De acordo com vários autores o teor de proteína da levedura varia entre 22 e 39 % em base seca (Teixeira, 1960; Kihlberg, 1972; Waslien, 1975 e Sarwar et al., 1985). Olsen & Allermann (1987) citam teores de proteína na levedura entre 55 e 60 %, Reed (1982) e Kinsella (1987) entre 47 - 56 %.

Nas células intactas de levedura as proteínas citoplasmáticas solúveis (principalmente enzimas), as proteínas de ribossomas, e as proteínas ligadas à membrana e parede celular, representam aproximadamente 40 , 40 e 20% da proteína total, respectivamente. Com o rompimento da parede celular, uma parte das proteínas citoplasmáticas é complexada com ácidos nucleicos, e esta fração junto com a proteína dos ribossomas permite dizer que 50 a 60% da proteína isolada de células de levedura com precipitação no ponto isoeletrico podem estar

presentes como um complexo nucleoprotéico que por sua vez contém 10 a 15% de ácidos nucleicos (Kinsella, 1987).

Halász & Lásztity (1991) confirmaram que o aumento no teor de proteína celular e aumento na taxa de crescimento da levedura estão geralmente associados com o aumento do teor de ácido nucleico.

Ácidos Nucleicos e Nucleotídeos

O alto conteúdo de ácidos nucleicos é típico dos microrganismos. A quantidade de ácidos nucleicos das leveduras é afetada por diferentes fatores, mas percebe-se que o mais importante é a taxa de crescimento. Geralmente, taxas mais altas de crescimento estão associadas a conteúdos maiores de ácidos nucleicos. Os ácidos ribonucleicos (RNA) e desoxiribonucleicos (DNA) aparecem em células de leveduras, mas a quantidade de RNA é maior. Quando comparadas a outros microrganismos, a levedura mostra-se muito rica em RNA. A quantidade de RNA pode alcançar 1/3 da proteína total e algumas vezes é 50 a 100 vezes maior que a de DNA (Halász & Lásztity, 1991).

A levedura da fermentação alcoólica de caldo de cana apresenta um elevado nível de nitrogênio não protéico constituído basicamente pelos ácidos nucleicos, que pode representar 10 - 15 % do nitrogênio total (Reed, 1982).

Carboidratos

O conteúdo de carboidratos na levedura de fermentação alcoólica varia numa ampla faixa, dependendo das condições de crescimento. Normalmente 1/5

a 1/3 do material seco consiste de diferentes carboidratos. A maior parte dos carboidratos estão presentes na forma de polissacarídeos, enquanto os mono e oligossacarídeos estão em concentração mais baixa, com exceção da trealose (Halász & Lásztity, 1991).

Para Rose & Harrison (1970) os carboidratos representam 45 a 55 % do peso da levedura, sendo representados em média por 33 % de trealose, 27 % de glucanas, 21 % de mananas e 12 % de glicogênio.

Do ponto de vista morfológico os carboidratos das células de levedura podem ser divididos em dois grupos: carboidratos intracelulares (citoplásmico) e carboidratos da parede celular (Halász & Lásztity, 1991).

Nas leveduras as reservas energéticas consistem basicamente de carboidratos. As reservas de carboidratos são compostas quase que totalmente por glicogênio e trealose. A levedura de panificação contém normalmente de 16 a 20 % de glicogênio e 6 a 10 % de trealose. A quantidade destes dois carboidratos em levedura de cervejaria é menor. As condições de fermentação (aeróbica ou anaeróbica) e o estado metabólico das células são os principais fatores que influenciam o conteúdo de glicogênio. Abd Allah et al. (citados por Halász & Lásztity, 1991) investigando as reservas de carboidrato em diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que o conteúdo de glicogênio das células desta levedura, alcança seu ponto máximo após 72 horas de fermentação. O teor da trealose aumenta gradativamente e alcança o máximo no final de 120 horas de fermentação. Os valores máximos observados de glicogênio e trealose

foram de 21 e 10 %, respectivamente, enquanto os mínimos foram de 0,82 e 1,39 %.

Lipídios

Os lipídios são representados principalmente por ácidos graxos, fosfolipídios (lecitina e cefalina) e esteróis (ergosterol) (Gambirásio, 1967). O teor de lipídios em levedura seca de fermentação alcoólica varia entre 0,89 a 1,60 %, conforme mostrado na Tabela 2.1.

A fração de lipídios é baixa e compreende aproximadamente proporções iguais de triglicerídios e fosfolipídios. Os ácidos graxos são de cadeia longa, saturados e insaturados de número par e ímpar de átomo de carbono (Kaneko et al., 1976).

O conteúdo e a composição de lipídios é dependente das condições de crescimento. O conteúdo total de lipídios das células de levedura aumenta com a idade da cultura até a fase estacionária de crescimento ser alcançada, e com o esgotamento da glicose do meio, há um rápido decréscimo no conteúdo de lipídios das células (Halász & Lásztity, 1991).

Vitaminas

De um modo geral as leveduras são uma boa fonte vitamínica, especialmente as vitaminas do complexo B (Halász & Lástity, 1991).

Em estudos realizados por Teixeira (1960), Waslien (1975) e Sarwar et al. (1985), foi observado que a levedura contém, em 100 g de material seco,

aproximadamente 4 mg de tiamina (B_1), 6 mg de riboflavina (B_2), 4 mg de piridoxina (B_6), 30 mg de niacina, 15 mg de ácido pantotênico, 3 mg de ácido fólico, 0,15 mg de biotina e 6 mg de cianocobalamina (B_{12}), valores superiores às necessidades diárias do ser humano (Marks, 1975).

A Tabela 2.2 mostra a composição em vitaminas de levedura seca de fermentação alcoólica.

TABELA 2.2 - Composição em vitaminas de levedura seca de fermentação alcoólica.

Vitaminas	Composição (mg/kg)
Tiamina	120-170
Riboflavina	47-52
Ácido Pantotênico	80-85
Niacina	450-470
Piridoxina	45-47
Ácido Fólico	12-21
Biotina	0,6-1,5

Fonte: Butolo (1996)

Cinzas

Os minerais estão presentes nas leveduras na proporção de 4 a 7%. Os teores de cálcio e sódio não diferem muito daqueles dos alimentos tradicionais, porém, os teores de potássio, fósforo e ferro são mais elevados. O enxofre aparece na forma de sulfito (Cozzolino, 1982).

2.3. PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DA LEVEDURA

A composição em aminoácidos da proteína de levedura atende basicamente ao padrão de referência da FAO/WHO/ONU (1985), destacando-se o fato de apresentar alto teor de lisina e teores adequados de treonina e triptofano. Embora o perfil de aminoácidos não seja comparável à proteína de origem animal, se iguala às melhores proteínas de origem vegetal como a de soja. Nota-se contudo que o teor de treonina apresenta-se bem mais elevado na proteína de levedura em relação ao isolado protéico de soja, e apesar dos valores de histidina e triptofano apresentarem-se ligeiramente inferiores, atendem ao padrão de referência da FAO.

Embora a levedura seja geralmente pesquisada como fonte de proteína, ela também pode ser usada como suplemento vitamínico, pois é observado que as vitaminas das leveduras têm, em quantidades equivalentes, efeitos mais marcantes que as vitaminas sintéticas (Kridler & Carroll, 1971).

Pezzato (1985) relata que a levedura seca pode ser usada em rações animais para substituir outras fontes protéicas, especialmente a soja e o milho, em níveis de 10 até 15 %, lembrando que sua inclusão a níveis maiores pode causar problemas nos animais.

Leveduras de panificação apresentam cerca de 25 % de matéria seca (Suomalainen & Oura, 1971), dos quais cerca de 10 % é representado pela trealose, 12 % pelo glicogênio, 8 % pela glucana e 6 % pela manana (Suomalainen & Pfaffli, 1961 e Amorim et al., 1994).

O teor de proteína bruta ($N_{total} \times 6,25$) situa-se entre 40 e 56 % da matéria seca. Cerca de 80 % do nitrogênio encontra-se na forma de aminoácidos, 12 % na forma de ácidos nucleicos, 8 % como amônia e quantidades menores na forma de lecitina, glutatona, ácido adalínico, vitaminas e coenzimas (Peppler, 1970).

O uso direto das células de levedura para enriquecimento nutricional não é recomendável por existirem fatores que limitam o seu uso em alimentos para humanos, dentre eles, pode-se destacar a resistência da parede celular à ação de enzimas digestivas, o que torna os componentes intracelulares parcialmente disponíveis, e seu elevado teor de ácidos nucleicos, principalmente o ácido ribonucleico-RNA (Pacheco, 1996). Por outro lado, os componentes pertencentes ao complexo lipídico e vitamínico e outras substâncias encontradas nas células também são nutrientes importantes.

Há uma grande preocupação em reduzir o conteúdo de RNA existente na proteína para consumo. O ácido úrico é o produto final do metabolismo dos ácidos nucleicos, especialmente o RNA. Na digestão os ácidos nucleicos são despolimerizados por nucleases do suco pancreático, formando os nucleosídeos. Os nucleosídeos possuem bases nitrogenadas pirimidínicas (citosina, uracila, razoavelmente metabolizadas pelo homem) e purínicas (adenina e guanina), sendo os compostos purínicos oxidados e desaminados a ácido úrico, elevando assim sua concentração no plasma (Gutman & Yu, 1965 e Clifford & Story, 1976), já que o homem não tem a enzima uricase capaz de degradar esse ácido.

O ácido úrico apresenta-se insolúvel no pH fisiológico e tende a se

cristalizar, causando distúrbios metabólicos, como a formação de cálculos renais e deposição de ácido úrico nas articulações levando ao surgimento da doença chamada gota (Tusé, 1984). A ingestão diária de 2 g de ácidos nucleicos tem sido bem tolerada por adultos, porém limita a ingestão de levedura ao redor de 20 g/dia.

Sarwar et al (1985) citam que o Protein Advisory Group of the United Nations System sugere que o limite de segurança de ingestão de ácidos nucleicos de fontes de proteína unicelular deve ser de 2 g por dia, e que os ácidos nucleicos totais na dieta humana não devem exceder 4 g por dia.

Nos Estados Unidos, o Ministério da Saúde e Educação e Bem Estar, padronizou o uso da levedura ou extrato de levedura para pães, bolos e roscas entre 2-5 %. A biomassa protéica é recomendada como fonte adicional de proteínas para enriquecimento de dietas, farinhas de cereais, proteínas vegetais, preparo de sopas e temperos (Nobrega, 1985).

No caso da utilização da proteína de levedura como única fonte protéica em experimentos de nutrição animal há a necessidade de se desfazer o complexo RNA proteína (Pacheco, 1996).

A levedura da fermentação alcoólica apresenta um elevado nível de nitrogênio não protéico constituído basicamente por ácidos nucleicos e pode representar 10 - 15 % do nitrogênio total. O fator 6,25 comumente usado para calcular o teor de proteína a partir do nitrogênio, seria correto se aplicado à proteína isolada porém não em relação à biomassa, podendo superestimar o valor de proteína em 10 - 20 %. Em estudos de nutrição animal o uso simplificado do

fator 6,25 pode resultar em amostras elaboradas com menor conteúdo de proteína em relação ao tratamento controle (caseína), e portanto como resultado valores mais baixos para o seu valor biológico (Reed, 1982).

Segundo Sarwar et al. (1985) o fator de conversão de nitrogênio para proteína real foi calculado entre 5,62 a 5,81 (média de 5,73), substancialmente menor que o fator usual de 6,25 usado para nitrogênio-proteína. Esses mesmos autores reportam que os ácidos nucleicos nitrogenados constituem 12-16 % do nitrogênio total da levedura. Bressani e Kihlberg (citados por Sarwar et al., 1985) concluíram que cerca de 20 % do nitrogênio determinado pelo método Kjeldahl não é nitrogênio protéico.

Para Reed & Nagodawithana (1991) o mais apropriado para estimar a proteína pura da levedura através do método de Kjeldahl é multiplicar o nitrogênio total pelo fator 5,5 com a finalidade de não superestimar o seu valor. O uso geral do fator de 6,25 para o cálculo da proteína tem tido conseqüências indesejáveis, uma vez que subestima o valor nutricional da proteína expresso como quociente de eficiência protéica, pois se assume que os animais alimentados com a proteína teste estão consumindo valores maiores que o real.

2.4. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Segundo Aiba et al. (1971) as condições do meio onde se alcança uma elevada massa celular pode não ser, necessariamente, aquelas onde ocorre produção máxima de algum metabólito. A absorção e o metabolismo de compostos nitrogenados por *S. cerevisiae*, depende não somente da linhagem e sua condição fisiológica, mas também das propriedades físicas e químicas do meio.

Temperatura

As baixas temperaturas (menor que 26 - 27°C) podem diminuir a velocidade de fermentação, enquanto que as altas podem levar, em casos extremos, à morte das células de levedura (Basso et al., 1996). Linhagens mesofílicas de *Saccharomyces cerevisiae* crescem num intervalo entre 10 e 40°C, estando sua temperatura ótima entre 28 a 35°C (Jones et al., 1981).

Um ponto importante a destacar, em escala industrial, é a correlação positiva existente entre a temperatura do mosto e a contaminação bacteriana, principalmente entre 30 e 40°C. Portanto, se a temperatura do mosto ultrapassa 30°C, o número de bactérias aumentará proporcionalmente ao aumento da temperatura. Observações com linhagens isoladas das destilarias, têm indicado que se a infecção for controlada em 10^6 bastonetes/mL, a uma temperatura de 37°C, pode-se conseguir uma diminuição na produção de biomassa e um aumento no rendimento fermentativo sem esgotar a levedura (Basso et al., 1996).

A manutenção de células próxima à temperatura máxima leva a alterações bioquímicas nas mesmas. Tais alterações consistem no aumento da necessidade de ácidos graxos para manutenção da rigidez da membrana (Porter & Ough, 1982), aumento acentuado na fração de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (Suomalainen & Pfaffli, 1961), maior sensibilidade ao etanol, diminuições da atividade enzimática e dos teores de proteína, RNA e DNA da célula (Slapack et al., 1987).

Porter & Ough (1982) mostraram que à medida que a temperatura se eleva, há uma acentuada diminuição da capacidade respiratória das leveduras, levando ao aumento da taxa de fermentação.

Lewis & Kuiper (1972) demonstraram que *Saccharomyces uvarum* mantida em suspensão com água a 40°C, não apresentou alteração na viabilidade. Entretanto, a adição de glicose ao meio provocou rápida queda na viabilidade celular. Tal efeito, segundo estes autores, seria decorrente da alteração da membrana citoplasmática por ação combinada da temperatura e absorção do açúcar.

Investigações correlacionando teor de trealose da célula e sua resistência ao calor, sugerem que microrganismos termotolerantes produzem mais trealose quando mantidos em temperatura alta, que atuaria como um mecanismo para prevenir a desidratação, haver necessidade de aumentar a rigidez da membrana (Crowe et al., 1979).

Exigências Nutricionais

Jorgensen (1959) ao discutir resultados de outros pesquisadores, relata que o nitrogênio orgânico assimilado pelas leveduras alcoólicas são aminoácidos, amidas e peptídeos de baixo peso molecular; o limite parece encontrar-se em 5 - 6 átomos de carbono por molécula. Também relata que os substratos naturais (com nitrogênio orgânico) são mais adequados à incorporação do nitrogênio que os substratos amoniacais. Cita ainda que uma série de experimentos confirmam que a superioridade de substratos naturais se deve a que neles são encontrados uma mistura adequada de aminoácidos, que podem ser utilizados diretamente pela levedura para a síntese de proteínas sem desaminação prévia. A levedura em crescimento assimila diretamente cerca de 80 % do nitrogênio a partir de aminoácidos. A maior parte dos 20 % restantes procede de aminoácidos desaminados e a desaminação segue a rota proposta por F. Erlich, ou seja, os

aminoácidos para serem utilizados pela levedura são primeiramente transformados em um álcool superior e amoníaco e apenas uma pequena parte seguiria a rota proposta por Stickland, da qual resultariam ácido acético e amoníaco.

Segundo Basso et al. (1996) e Henschke & Jiranek (1994) a levedura é capaz de utilizar muitos compostos nitrogenados tais como aminoácidos, pequenos peptídeos, bases nitrogenadas (purínicas e pirimidínicas), uréia, amônio, utilizando-se de vários sistemas de transporte para as diversas fontes. Henschke & Jiranek (1994), citando outros autores, mostram que o pH ótimo para o transporte de amônia é de 6,0 - 6,5 e chamam a atenção para que o pH do mosto de fermentação é geralmente mais baixo.

A absorção da amônio (NH_4^+) ocorre às custas da saída de íons H^+ , com gasto de energia e acidificação do meio externo. A uréia pode ser absorvida por difusão facilitada, ou seja, entra naturalmente na célula, quando seu teor no meio é alto, sem que seja acionado o sistema dependente de energia. A permease geral de aminoácidos garante a sua absorção pelos microrganismos na ausência de íons amônio, que inibem tal transporte, o que pode ser desejável, uma vez que certos aminoácidos são precursores de álcoois superiores (Basso et al., 1996).

O nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+) é encontrado no mosto proveniente do caldo de cana, e sua concentração influi sobre o brotamento e a taxa de multiplicação da levedura, além de ser a porcentagem de levedo no vinho diretamente relacionada com a concentração de NH_4^+ . Esta forma de nitrogênio na cana é intermediária, pois o nitrato (NO_3^-) absorvido do solo pela planta é reduzido a nitrogênio amoniacal e então transformado em aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e demais compostos nitrogenados (Basso et al., 1996).

A respeito da necessidade nutricional de leveduras Reed (1982) menciona a importância de vitaminas como a biotina, tiamina, ou outras, que devem ser

supridas pelo meio de crescimento. Em experimentos laboratoriais isto é geralmente feito com o uso de extrato de levedura. Para processos comerciais há necessidade de vitaminas e elementos minoritários, que precisam adicionados na forma de compostos minerais solúveis e vitaminas sintéticas, geralmente suplementados com levedura ou extrato de levedura.

Destilarias com teor de NH_4^+ maior que 70 ppm no mosto, com temperatura controlada e sem perdas de células de leveduras na centrífuga, apresentam problemas de excesso de levedura na dorna. Teores abaixo de 40 ppm ocasionam fermentação lenta, baixo brotamento e baixo rendimento fermentativo, pois em detrimento da produção de etanol a levedura acumula trealose; o teor ideal encontra-se entre 40 e 70 ppm de NH_4^+ (Basso et al., 1996).

Contudo, outros autores citam teores de N bastante mais elevados. Em média o caldo de cana contém 200-600 ppm de nitrogênio, do qual cerca de 60 % está presente como amônia e amino-compostos. Os compostos não-açúcares presentes no caldo de cana compreendem amidas de aminoácidos (como asparagina e glutamina), compostos de alto peso molecular (como proteínas ou não-açúcares protéicos) e aminoácidos (Sharma & Johary, 1984).

O teor de nitrogênio total no caldo de cana de uma mesma variedade cultivada em três solos diferentes pode variar entre 230 e 730 mg N/L (Serra, 1973). Vasconcelos (1987) observou em mostos de várias destilarias do estado de Alagoas os seguintes teores de nitrogênio: mosto de caldo, 160 a 810mg/L; mosto misto, 100 a 1070 mg/L; mosto de melaço, 450 a 650 mg/L.

Pinotti (1991) verificou que no processo de decantação do caldo de

cana ocorre uma redução média de 20,3 % de nitrogênio, ou seja, um caldo com 414 ppm de nitrogênio resultou em um caldo clarificado com 344 ppm.

Cabezas et al. (1990) determinaram as diversas frações de componentes nitrogenados no caldo de cana e no vinho resultante da fermentação alcoólica e verificaram o uso e comportamento de algumas dessas frações. Os resultados obtidos mostraram que o nitrogênio total de 582 ppm do caldo de cana era composto por 415 ppm (71 %) de nitrogênio solúvel e 167 ppm (29 %) de nitrogênio insolúvel de origem protéica. O vinho deleiturado proveniente da fermentação alcoólica desse caldo apresentou 77 ppm (57 %) de nitrogênio solúvel e 58 ppm (43 %) de nitrogênio insolúvel, perfazendo 135 ppm de nitrogênio total. O nitrogênio solúvel é composto de nitrogênio amino-solúvel e nitrogênio não amino-solúvel. O caldo de cana apresentava 95 ppm (16 %) de nitrogênio amino-solúvel e 320 ppm (55 %) de nitrogênio não-amino solúvel; no vinho deleiturado esses componentes são, respectivamente, 24 ppm (18 %) e 53 ppm (39 %). Desses resultados, e utilizando isótopo de ^{15}N , os autores concluíram que a biomassa celular imobilizou 78 % do nitrogênio amoniacal, ficando a maior parte deste (72 %) retida na fração de nitrogênio insolúvel iminentemente protéica.

Pinotti (1991) pondera que nas etapas do processo de produção de álcool existem perdas significantes de nutrientes, notadamente de nitrogênio, cuja perda ocorre principalmente na etapa de decantação, requerendo que muitas vezes a complementação com nitrogênio durante a fermentação, o que onera o custo final sem atingir o objetivo esperado, pois a levedura não assimila momentaneamente aquele nutriente, que é geralmente adicionado na forma de uréia (46 % de N) ou de sulfato de amônia (21 % de N). O autor refere-se também ao fato de que a reprodução de *Saccharomyces cerevisiae*

varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, e que dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta significativa.

O teor de aminoácidos totais expressos em glicina % no caldo misto foi de 2650 mg/ 100 g de sólidos e sua remoção na clarificação variou entre 30 a 42 %, aproximadamente. A defecação simples reduziu em cerca de 24 % os aminoácidos presentes, quando o pH do caldo misto era cerca de 7,0. A sulfo-defecação (pré-sulfitação a pH 4,0) eliminou cerca de 42 %. Também foi verificado que a máxima eliminação de aminoácidos no processo de clarificação ocorreu quando o caldo misto foi complementado com P_2O_5 até cerca de 400 ppm; valores menores de fósforo no caldo mostraram pequena eliminação dos aminoácidos (Sharma & Johary, 1984).

Sharma & Johary (1984) verificaram ainda que a pré-caleagem do caldo a pH 6,0-7,0 acarretou maior remoção de aminoácidos em relação à caleagem em pH 7,0-8,0. A maior remoção de aminoácidos em pré-caleagem a pH 6,5 pode estar associada com a coagulação de colóides nesse pH, e a aminoácidos que têm seu ponto isoelétrico na faixa alcalina. Honig (1963) cita que a solubilidade de muitos aminoácidos em meio alcalino, também pode contribuir para sua baixa remoção em pH na faixa de 7,0 a 8,0.

A fração coloidal do caldo de cana é constituída fundamentalmente por proteínas e polissacarídeos solúveis de alto peso molecular. As proteínas representam a parte majoritária da fração coloidal e também englobam enzimas associadas à síntese e degradação das substâncias coloidais (Rodriguez et al., 1985).

Wiggins (1969) relata que na clarificação do caldo de cana, por meio de

cal e aquecimento, algumas das proteínas se coagulam e se separam junto com o lodo precipitado; todavia, outras permanecem em estado coloidal. Os aminoácidos e suas amidas tendem a separar-se na forma de seus sais de cálcio, mas devido a serem pouco insolúveis, uma grande quantidade permanece no caldo clarificado.

Burr & Takahashi (1955) estudaram as diversas frações de nitrogênio na cana-de-açúcar e verificaram que a fração solúvel em álcool (80 % do nitrogênio total) representa o nitrogênio definido como "móvel" que inclui amônia, asparagina e glutamina.

Vasconcelos (1987) avaliou a complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o rendimento da fermentação alcoólica, em condições laboratoriais, determinando o teor alcoólico por ebuliometria e açúcares redutores por método de redução do cobre de Lane-Eynon. O rendimento médio da fermentação foi ao redor de 80 % sendo que a complementação com nitrogênio e fósforo mostraram um efeito estatisticamente significativo, porém reduzido no referido rendimento. O autor conclui que a dose de nitrogênio que maximiza a eficiência da fermentação é de cerca de 0,11 g de sulfato de amônio por litro de mosto o que equivale a 23 mg de N por litro de mosto.

A acidez resultante da utilização do sulfato de amônio, embora auxilie no controle à contaminação bacteriana (conseqüentemente, reduz as formações dos ácidos láctico e acético), causa estresse à levedura diminuindo sua viabilidade e multiplicação (Basso et al., 1996).

Su et al. (1969) verificaram que quando a uréia é usada como única fonte de nitrogênio a levedura produzida apresenta menor teor em proteína e maior produção, se comparada com o sulfato de amônia.

Abramov et al. (1994) enfatizam que a síntese de biomassa celular pela levedura (*S. cerevisiae*) é significativamente dependente do conteúdo em nitrogênio no meio de crescimento, uma vez que a proporção de compostos nitrogenados na célula de levedura atinge 50 %. Reforçam o conhecimento de que as células de levedura sintetizam todos os aminoácidos e proteínas a partir de nitrogênio inorgânico e carbono orgânico, e também a partir de produtos intermediários da degradação de carboidratos formados durante a fermentação e respiração.

Etanol

As observações de autores como Paturau (1969) e Peppler (1979) além de vários outros na literatura internacional, geralmente relatam a importância de elementos como o sódio, fósforo e outros, enfatizando sua importância na obtenção de rendimentos adequados em etanol e elevado teor de proteína na levedura.

O efeito inibidor do etanol está intimamente relacionado à temperatura de fermentação. Segundo Sá-Correia & Van Uden (1983), a faixa de menor resistência ao etanol para cepas usuais de *Saccharomyces cerevisiae* é de 13 a 27°C a 11 % (v/v) de etanol. A tolerância ao álcool diminui para temperaturas mais baixas que 13°C ou mais altas que 27°C, de forma que a inibição do crescimento do microrganismo ocorre tanto em processos à baixa temperatura (cervejas, champanhes), como em processos à alta temperatura (álcool combustível, vinho tinto).

Luong (1984) observou que o etanol apresenta um efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular em concentrações acima de 15 g/L e que a concentração de etanol máxima a partir da qual as células não mais cresciam era aproximadamente 100 g/L. Este autor também verificou que a capacidade de produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* era completamente inibida a uma concentração de 105 g/L de etanol.

2.5. TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE LEVEDURA SECA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A idéia de produzir uma ração com a levedura remanescente ou sangria da fermentação alcoólica começou a ser cogitada em 1978 quando o engenheiro agrônomo Rui Fernando Pinotti, gerente industrial da Usina Santa Luíza, iniciou as primeiras pesquisas com aquele objetivo (Pinotti, 1983).

Pinotti (1983) revela também que a levedura com 10,6 % de umidade, obtida em processo industrial por sangria, apresentava 28,04 % de proteína. Cita que se pode obter um mínimo de 30 g de levedura seca por litro de álcool produzido, número este que é de 40 g/L na Usina Santa Luíza, sem alterar o rendimento da fermentação alcoólica.

Mais recentemente Lahr Filho et al. (1996) relataram a adoção generalizada da sangria do leite de levedura nas usinas (desvio de parte do leite centrifugado do processo de fermentação alcoólica), apontando que sangrias da ordem de 20 a 80 kg de levedura/m³ de álcool produzido não acarretam prejuízos no rendimento fermentativo. A prática operacional tem indicado sangrias com valores entre 20 a 30 kg de levedura/m³ de álcool produzido.

O processo inicia com a lavagem por centrifugação do leite de levedura desviado. Esta operação tem por objetivo remover materiais estranhos e recuperar parte do álcool que acompanha estes produtos. O leite de levedura recuperado da lavagem é submetido a um processo de fermentação endógena. Neste período as leveduras consomem as substâncias de reserva acumuladas na célula transformando-as em álcool. Durante este processo se consegue que os carboidratos armazenados, se convertam em etanol que posteriormente será recuperado. Haverá também um aumento no teor de proteína da levedura seca (Lahr Filho et al., 1996).

Estudos feitos no Centro de Tecnologia da Copersucar mostraram aumentos do teor protéico de 25 % e recuperação de etanol de 112,5 kg etanol/tonelada de levedura seca. A fermentação endógena provoca uma perda de massa de levedura seca em torno de 20 %, porém os ganhos em teor protéico e a recuperação de etanol mostram que este tratamento é muito favorável e deve ser praticado visando maximizar o esgotamento das substâncias de reserva (Lahr Filho et al., 1996).

O leite de levedura resultante da operação anterior é submetido a uma deflegmação em coluna de destilação de pratos perfurados. Durante esta destilação o etanol é recuperado no topo da coluna. A recuperação do etanol contido no leite de levedura é essencial para a viabilização do processo de secagem de levedura, pois recupera-se 1,0 litro de etanol por 3,0 kg de levedura seca produzida para um vinho com 8,0°GL (Lahr Filho et al., 1996).

A deflegmação resulta simultaneamente num tratamento térmico com morte das células e inativação das enzimas. A morte das células de levedura é

necessária para a utilização da levedura seca na composição de rações animais, principalmente ruminantes, devido ao fato da levedura competir por nutrientes com os microrganismos do rúmen do próprio animal. A permanência do leite por aproximadamente 15 minutos a 105°C no fundo da coluna deflegmadora assegura uma termólise eficiente (Lahr Filho et al., 1996).

Para minimizar os custos de energia durante a secagem da levedura, esta deveria ser submetida previamente a um processo de concentração, para retirar mecanicamente uma porção de água do leite. Esta etapa é importante para permitir que os secadores tenham aumentada sua capacidade e eficiência de secagem (Lahr Filho et al., 1996).

O lodo de levedura pré-concentrado é submetido a um pré aquecimento em trocadores de calor e imediatamente bombeado às unidades de secagem. As unidades de pequeno e médio porte adotam geralmente o secador de tambor para minimizar os investimentos, enquanto as unidades de maior capacidade se inclinam ao uso do secador "spray-dryer" (Lahr Filho et al., 1996).

Revilla (1990) recomenda que o leite de levedura separado por centrifugação a partir do mosto fermentado, deve ser lavado com água e centrifugado novamente. Com uma concentração de 11 % em base seca é enviado ao tanque de termólise provido de uma camisa de vapor e pás agitadoras, onde se mantém por um período de 15-30 minutos e entre 70-85°C. Por fim se recomenda a secagem que leva a obtenção de um produto com 8 % de umidade. Lahr Filho et al. (1996) também mencionam a lavagem do fermento como uma das operações a ser praticada.

A quantidade exata de quanto se deve retirar de levedura do processo depende das condições para multiplicação da levedura no vinho e das perdas nas centrífugas. Acredita-se que se as perdas nas centrífugas mais a sangria somarem mais de 5 %, provavelmente o rendimento fermentativo será afetado, pois quanto maior for a sangria (acima de 5%) menor será o rendimento da fermentação. Em ensaios de laboratório, foram retirados 5 %, 10 %, 15 %, 20% de levedo e, na maioria dos casos o abaixamento no rendimento fermentativo foi pequeno, mas significativo (Basso et al., 1996).

Orelli et al.(1991) estudaram, em laboratório, a remoção de 5 a 20 % de células em experimentos com 7 ciclos fermentativos. Embora havendo declínio da viabilidade celular no decorrer dos ciclos, foi demonstrado que quanto maior a porcentagem de células removidas, menos acentuada foi aquela queda. Também foi relatada queda no rendimento da fermentação devido a sangria.

A consistência do leite de levedura obtido na centrifugação do vinho é de grande importância para o bom andamento do processo de fermentação. Dependendo da regulação adotada para as centrífugas pode-se ter leite com concentrações variando entre 8 a 16 % de sólidos, sendo que o ideal está em torno de 12 % de sólidos (Almeida, 1960).

Basso et al. (1996) discutem diversos aspectos e problemas interligados com a quantidade de células de levedura da fermentação com a sangria das mesmas. Nas condições industriais a fermentação rápida é obtida devido a altas concentrações de inóculo utilizadas. A recirculação da levedura permite a manutenção da alta concentração celular, sendo a maior eficiência obtida decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para formação de células.

Mas o excesso de fermento na dorna (acima de 15-16 % em v/v) esgota os nutrientes e vitaminas, pois a competição pelo substrato é grande, havendo uma deficiência na conversão do açúcar em álcool que diminui o rendimento, levando à queda na viabilidade e aumento do tempo de fermentação. Em muitas destilarias tem-se observado que, quanto maior a quantidade de fermento na dorna, maior é o rendimento da fermentação. Esta correlação positiva deve-se ao fato de que uma série de fatores que afetam a quantidade de fermento, também afetam o rendimento, como por exemplo, altas temperaturas que causam infecção e floculação do fermento, provocando grandes perdas de levedura, que por sua vez causa abaixamento do rendimento fermentativo. O desempenho das centrífugas, está também relacionado as perdas e reposição das células, e diminuição do rendimento fermentativo.

Contudo, afim de se obter o máximo rendimento, algumas destilarias, recircular o máximo de fermento possível, controlando também as centrífugas e recirculando até as células de fundo de dorna. A partir de uma certa concentração de fermento nas dornas (14 a 15 %, v/v), a viabilidade celular decresce, provavelmente devido à centrífuga recircular levedura viva e morta. Além disso há também uma maior recirculação de compostos tóxicos eliminados pela própria levedura, maior recirculação de vinho e, portanto, maior consumo de ácidos que interferem não somente na viabilidade, como também no tempo de fermentação, aumentando-o e o que é pior, abaixando o rendimento fermentativo. Atualmente, com as novas centrífugas, inclinação e distância entre pratos, maiores rendimentos têm sido conseguidos com teores de 10 a 13 % de levedo na dorna, e uma % de recirculação entre 85 a 95 % (Basso et al., 1996).

Em escala de laboratório é possível, remover 2,5 % do volume de fermento, ao final de cada ciclo fermentativo sem comprometer o crescimento. Em escala

industrial deve-se levar em conta o teor de potássio e principalmente o nitrogênio amoniacal, pois quanto maior for a concentração destes elementos maior deverá ser a remoção da levedura do processo, podendo chegar a mais de 15 %. Entretanto, se o controle das centrífugas e da temperatura de fermentação não forem adequados, qualquer sangria afetará o rendimento. A diminuição no rendimento vai depender da quantidade de fermento removido, podendo o rendimento cair cerca de 3% com sangrias de 20 % do fermento. Portanto, a porcentagem de sangria deve ser definida para cada condição de trabalho visando otimizar o rendimento às condições da destilaria em questão (Basso et al., 1996).

Rheiboldt et al. (1987) descrevem o processo de sangria e secagem de levedura desenvolvido pelo Centro de Tecnologia Copersucar. A especificação do produto final é: proteína bruta 32-38 %, umidade 8 %, cinzas 5 % e cor palha. A sangria é preconizada na faixa de 15 a 60 kg de levedura seca/m³ de etanol produzido. A fase de desalcoolização do fermento permite a recuperação de um litro de álcool por 3 kg de levedura seca produzida.

Para a obtenção da levedura seca de boa qualidade e com elevado rendimento Larh Filho et al. (1996) recomendam que a fermentação deve ser bem conduzida, com eficientes controles de temperatura e tratamento do pé-de-cuba, livre de infecções e/ou tendência à floculação. Deve-se usar caldo decantado para o preparo do mosto, de modo a obter uma levedura seca de coloração clara, com cor palha, e menor teor de sais (cinzas) e fibra (bagacilho), resultando consequentemente em um maior teor percentual de proteína bruta. A utilização do caldo decantado possibilita a centrifugação do fundo de dorna, e o aproveitamento da levedura nele contida. As perdas de levedura no vinho

centrifugado devem ser minimizadas, necessitando portanto, uma centrifugação eficiente e/ou otimização de suas condições operacionais. Estas duas últimas práticas aumentam a massa de levedura disponível para secagem (Lahr Filho et al., 1996).

Labuza et al. (1972) pesquisaram a secagem da levedura por "spray-drying" e tambores rotativos, verificando o efeito na viabilidade das células, lixiviação de componentes celulares e funcionalidade do produto na fabricação de massas para pão. Verificaram também que a funcionalidade aumenta com a temperatura. Isto é o oposto do que ocorre para a viabilidade celular, uma vez que a taxa de mortalidade é de uma ordem de grandeza superior a 4 vezes a velocidade de desnaturação protéica, ocorrendo no curto tempo de secagem pequena mudança na proteína. A taxa de desnaturação aumenta vagarosamente com a temperatura, mas o tempo de exposição da proteína no estágio úmido diminui resultando numa melhoria na funcionalidade. Como conclusão estes autores apontam que a secagem por "spray-drying" causa menores danos funcionais ao produto final, em relação ao tambor rotativo.

2.6. CARBOIDRATOS DE RESERVA E FERMENTAÇÃO ENDÓGENA

Basso & Amorim (1991) verificaram que o fermento, após terminada a fermentação alcoólica, pode gerar mais etanol às custas da mobilização de suas reservas (trealose) bem como de outros componentes até mesmo estruturais. Após esgotar as reservas de trealose o teor de nitrogênio da célula de levedura pode aumentar em até 28 %, segue-se a autólise das células com conseqüente perda de nitrogênio para o meio. A utilização das reservas pode ser acelerada pelo aumento da temperatura.

Reed (1982) cita que a levedura de cervejaria em suspensão e que não atinge um teor mínimo de 40 % de proteína bruta, pode ser armazenada a 4°C até que o metabolismo endógeno de carboidratos de reserva proporcione um maior teor protéico. Enquanto a quantidade total de proteína não se altera durante a armazenagem, a sua porcentagem relativa nos sólidos celulares aumenta. A 4°C e com um teor inicial de 40 % de proteína e 40 % de carboidratos, a biomassa apresentou um aumento protéico de 13 % e redução de 40 % nos carboidratos, aproximadamente.

É conhecida a importância da trealose para a manutenção da viabilidade das leveduras (Suomalainen & Pfaffli, 1961) e também que durante períodos de escassez de nutrientes a trealose desempenha papel fundamental na sua viabilidade (Lillie & Pringle, 1980). Condições anaeróbias provocam redução na quantidade de trealose (Panek, 1975). Por outro lado, o acúmulo de trealose foi também relacionado à deficiência em nitrogênio por Kuenzi & Fiechter (1972) e Lillie & Pringle (1980).

Quando a glucose é metabolizada pela levedura o CO₂ total produzido é menor que a quantidade teórica para uma completa respiração ou fermentação do substrato. O déficit é devido em grande parte à assimilação da glucose e sua transformação tanto em carboidratos de reserva como o glicogênio e trealose, como também em produtos finais como o glicerol, ácido acético e ácido succínico (Berke & Rothstein, 1957). Quain (1988) mostra dados de peso seco e peso específico da levedura ao longo de uma fermentação. O peso específico diminui de cerca de 1,058 para 1,055 após 12 h de fermentação.

Basso & Amorim (1989a), em fermentações conduzidas em laboratório, verificaram que a trealose e o glicogênio apresentam oscilações durante o transcorrer da fermentação, ocorrendo uma queda em ambas as reservas na primeira hora de fermentação. Com o progredir da fermentação há uma recuperação dos teores daquelas reservas, podendo a fermentação finalizar com teores superiores aos iniciais. Foi também observado um paralelismo nas variações dos teores de trealose e glicogênio, e que a queda dos teores de ambas as reservas coincidem com a fase de maior velocidade de produção de etanol.

Com relação ao reciclo de células, em ensaio de laboratório, Basso & Amorim (1989a) verificaram que até o terceiro ciclo fermentativo os teores de trealose e glicogênio se mantiveram elevados, seguindo um paralelismo com a viabilidade e peso do fermento. Do quarto ciclo em diante a queda na viabilidade é acompanhada de diminuição nos teores das reservas, especialmente de trealose.

Em experimento em laboratório Basso & Amorim (1989a) verificaram existir uma queda abrupta nos teores de glicogênio e trealose após uma hora de fermentação, seguida de rápida recuperação atingindo os teores máximos após 4 h de fermentação com subsequente declínio lento até as 24 h. A queda nos teores dos carboidratos de reserva coincide com a ocasião de maior velocidade de fermentação. Esses autores também verificaram que queda na viabilidade é acompanhada de diminuição dos teores das reservas, especialmente de trealose; e que existe um paralelismo nas variações nos teores de glicogênio e trealose. Os teores de trealose e glicogênio, nos ensaios variaram entre 3 a 11 e 3 a 9 g/100 g de massa seca, respectivamente para aqueles açúcares durante uma fermentação de 24 h. Em outro experimento com 7 ciclos os teores desses

açúcares variaram, respectivamente, entre 13 a 3 e 13 a 7,5 g/100 g massa seca sendo que a tendência de redução se mostrou ao longo dos ciclos.

A viabilidade do fermento está portanto relacionada com o seu conteúdo de trealose e não de glicogênio. Nos experimentos com baixos teores de açúcares de reserva, o consumo destes se iniciou após 8 h e praticamente completado em 24 h de fermentação endógena. A viabilidade manteve-se praticamente inalterada até 24 h, e praticamente apresentou perda total após 48 h. O nitrogênio no fermento mostrou uma elevação de 12 % em 8 h, atingindo 16 % em 24 h e descendo ao nível inicial em 48 h (Basso et al., 1993).

A fermentação endógena da trealose e glicogênio da levedura foi estudada por Basso et al. (1993) utilizando suspensões de fermento coletadas de uma fermentação com 15 % de ART e incubadas a 40°C. Os resultados mostraram que o teor alcoólico da suspensão aumenta até um valor máximo, caindo em seguida, ao mesmo tempo que as reservas de trealose e glicogênio são consumidas. Mas nesse processo pode ocorrer ressíntese da trealose numa fase intermediária, às custas de outros constituintes celulares que não o glicogênio. A viabilidade do fermento mostra tendência de queda inicialmente lenta, mas se mostrando abrupta quando os teores de trealose caem abaixo de 0,2 %, mesmo com os teores de glicogênio ainda elevados (cerca de 7 %). O teor de nitrogênio do fermento mostra igualmente uma tendência de incremento, alcançando um valor máximo (com incrementos variando de 9 a 32 %), caindo em seguida em consequência da autólise das células. Como prenúncio da autólise é percebido um aumento aparente do teor de fermento em suspensão, como se ocorresse um "entumescimento" das células. Cálculos estequiométricos mostram que o consumo de trealose e glicogênio respondem

por 34 a 72 % do etanol produzido, sugerindo que outros constituintes da célula também se transformam em álcool.

Suomalainen & Pfaffli (1961) confirmam que um alto teor de carboidratos de reserva aumenta a resistência à autólise da levedura. Embora seja conhecido que a trealose aparece em consideráveis quantidades e pode constituir mais de 10 % da matéria seca da levedura de panificação comercial, leveduras de cervejaria desenvolvidas em meio anaeróbico contêm apenas pequenas quantidades de trealose.

Em ensaios de fermentação alcoólica em laboratório, Basso & Amorim (1989b) verificaram que os teores de trealose são sempre mais elevados em fermentações conduzidas a 40°C, do que a 35°C. Até 6 horas de fermentação os teores de trealose foram maiores a 40°C mas após 24 horas ocorreu drástica redução. Enquanto os teores de trealose se mostram elevados, a viabilidade celular é mantida sem alterações (93-95 %), mas após 24 horas a 40°C é observada uma redução drástica tanto nos teores de trealose quanto na viabilidade que caiu a 15 %.

Grba et al. (1975) mostram que a temperatura de incubação da levedura afeta a formação de trealose e glicogênio de modo completamente diferente. A temperatura de 45°C mostrou ser ótima para a síntese da trealose, sendo que esta atingiu 20 % em levedura de panificação incubada em aerobiose; nesta temperatura não foi detectado glicogênio. A temperatura de 30°C se revelou ótima porém para a formação de glicogênio.

Basso et al. (1993) verificaram que o tempo de fermentação endógena

em laboratório, para máxima produção de etanol, se mostrou bem maior do que aquele já observado em condições industriais. Esta diferença foi atribuída ao fato dos fermentos industriais estarem submetidos a condições estressantes e por conseguinte apresentarem menores teores de trealose. Os autores reforçam a observação que quanto maiores os teores das reservas (trealose e glicogênio) maior a produção de etanol pela fermentação endógena.

Outras observações destes mesmos autores foram as seguintes: - A quantidade de etanol obtida pela fermentação das reservas de trealose, glicogênio e outros constituintes celulares, pode atingir até 128 litros de etanol por tonelada de fermento seco. Os picos de maior produção de etanol e de maior teor de nitrogênio no fermento ocorrem concomitantemente. E finalmente, a acidificação (pH 2,55 a 4,10) do meio não resulta em aceleração do processo.

Trabalhando com suspensões de 56 a 73 % de fermento, Basso et al. (1993) verificaram que a fermentação endógena pode produzir mais etanol, às custas das reservas de trealose e glicogênio, atingindo aproximadamente de 90 a 130 L de etanol/1000 kg de massa seca de fermento. Simultaneamente, ocorre um incremento no teor de nitrogênio da célula, 13 a 32 %. A produção de etanol é proporcional à quantidade de carboidratos de reserva.

Esses autores realizaram ainda ensaios de fermentação endógena com suspensões com 56 a 73 % de fermento, suspenso em vinho diluído (2,7 a 3,7 % de etanol), a 40°C e monitorados por 72 h. Foram conduzidos experimentos com fermentos com teores elevados (6,15 e 15,32 %) e baixos (1,43 a 2,00 e 4,40 a 4,85 %), respectivamente de trealose e glicogênio na matéria seca. No experimento com altos teores de açúcares de reserva, se a fermentação

endógena se prolonga, ocorre autólise das células entre 24 a 48 h. O momento adequado para o término da fermentação endógena seria instantes antes da autólise das células do fermento, monitorando a viabilidade celular. O consumo de trealose e glicogênio é notado claramente a partir de 4 h de fermentação. O teor de nitrogênio no fermento em 24 h de fermentação endógena elevou-se em 32 %, e a 48 h representou 13 % do inicial, mostrando uma queda que se acentua até 72 h onde o teor de nitrogênio chegou a apenas 65 % do inicial. A viabilidade se mostrou praticamente inalterada até 8 h, com queda acentuada a 24 h e com viabilidade zero em 48 h.

Chester (1963) obteve dados em fermentações de laboratório em condições aeróbicas e anaeróbicas e, mostrou que os carboidratos de reserva, trealose e glicogênio, apresentam cerca de 40 % do peso seco de células em anaerobiose em um período de 40 h; a 72 h os carboidratos de reserva foram parcialmente utilizados após toda a glucose do meio ter sido fermentada. Em aerobiose menos de 10 % do peso seco da levedura foi de carboidratos de reserva; a quantidade de trealose foi extremamente pequena.

Gutierrez (1990) conduzindo fermentações em laboratório em meios com 420 ppm de N na forma amoniacal, 420 ppm de N na forma de uréia, e extrato de levedura nas quantidades de 2,5 e 5,0 gramas por litro de meio, observou que meios com 5,0 g/L de extrato de levedura ocasionaram redução no teor de trealose nas leveduras estudadas fato este também verificado por outros autores.

2.7. MERCADO E QUALIDADE DA LEVEDURA SECA DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

A Copersucar comercializa a levedura seca especialmente para empresas que formulam rações animais e a utilizam como fonte protéica e como palatilizante nos sais minerais. Normalmente, a mistura da levedura nas rações animais pode variar de 6 a 20 % do peso final da ração. A maioria dos produtores de rações prefere a levedura de cor clara e com granulometria menor que 0,5 mm (Lahr Filho et al., 1996).

Problemas como teor de proteína abaixo de 30 %, umidade acima de 10%, bolor e empedramento podem ocorrer com as leveduras. Os baixos teores de proteína na levedura têm sido causados, segundo alguns produtores, pela nutrição deficiente na fermentação, bolor e empedramento devido ao excesso de umidade durante a armazenagem (Lahr Filho et al., 1996).

Estes mesmos autores destacam que a levedura é paga de acordo com seu teor de proteína, e mostram dados comparativos da levedura e do farelo de soja, lembrando que devido ao atrativo de palatibilidade da levedura em relação ao farelo de soja tem-se conseguido igualar os preços :

- levedura: 30% proteína
- farelo de soja: 48% de proteína
- relação 30/48: 0,625
- preço técnico: 62,5% do preço do farelo de soja

A levedura seca produzida diretamente do caldo de cana-de-açúcar tem sido bem aceita como componente das rações animais também no mercado

externo. A Europa e o Extremo Oriente são as áreas que absorvem maior volume desse produto. Esse tipo de levedura contém tipicamente 45 % de proteína (Lahr Filho et al., 1996).

A levedura seca de fermentação alcoólica tem suas especificações de qualidade, conforme mostrado na Tabela 2.3.

TABELA 2.3 - Especificações para Levedura Seca

Determinação	Especificação (%)
Umidade	Máx.: 12,0
Matéria Seca	Mín.: 88,0
Matéria Mineral	Máx.: 8,0
Nitrogênio	Mín.: 4,0
Proteína	Mín.: 25,0
Fibra bruta	Máx.: 3,0

Fonte: Lahr Filho et al. (1996)

Reed (1982) aborda a questão da presença de hidrocarbonetos policíclicos, com reconhecida atividade carcinogênica, em leveduras de panificação da França, Inglaterra, Alemanha e Rússia, utilizadas em alimentos europeus contendo leveduras, e em leveduras produzidas em derivados de petróleo.

Halász & Lásztity (1991) comentam que há uma tendência em fracionar as proteínas com base em sua solubilidade, sendo que a maior parte das proteínas de leveduras são solúveis em água e ou em soluções salinas; a quantidade de proteínas solúveis em álcool e álcali, é menor. A secagem da levedura ou outros tratamentos que causam desnaturação de proteínas,

provocam alterações na solubilidade e distribuição das frações, fazendo com que a fração álcali solúvel aumente rapidamente e se torne a maior fração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS UTILIZADAS

Para a condução dos testes foram selecionadas 12 cepas de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, provenientes de unidades produtoras de álcool, localizadas em 4 estados brasileiros. As leveduras presentes no vinho fermentado foram isoladas, purificadas e mantidas em "slants", cobertas por óleo mineral (nujol), sob refrigeração, no banco de cepas do CPQBA/UNICAMP. A Tabela 3.1 relaciona as Usinas de onde foram coletadas as amostras de levedura, e fornece informações sobre o tipo de processo de fermentação e a matéria-prima utilizada.

As amostras de vinho fermentado, contendo as leveduras estudadas neste trabalho, foram coletadas nas Usinas de álcool, plaqueadas em meio diferencial para leveduras (WLN - Wallerstein Laboratory Nutrient, DIFCO) e incubadas por 7 dias a 32°C, em estufa. As colônias presentes em concentrações maiores que 10^6 , e que apresentaram diferenças morfológicas entre si foram isoladas e purificadas, e as cepas dominantes de cada usina selecionadas para condução deste trabalho.

3.2. CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO

MEIO DE CULTIVO

Os experimentos foram conduzidos em frascos erlenmeyeres de 250 mL com volume de meio sintético igual a 100 mL. A Tabela 3.2 mostra a composição

do meio sintético. A concentração de glicose no meio sintético foi de 150 g/L, o que equivale a 60 g/L de carbono. O nitrogênio do meio foi proveniente de duas fontes: - a adição de 5 g/L de cloreto de amônio correspondente a 1,31 g/L de N e, o extrato de levedura com um teor de 9,22 % N (57,6 g de proteína), utilizado no preparo dos meios de fermentação nas dosagens de 3, 6 e 9 g/L, corresponde a meios com 0,277, 0,553 e 0,830 g/L de N protéico, respectivamente. O teor de N total nos meios com 3, 6 e 9 g/L de extrato de levedura foi de 1,587, 1,863 e 2,140 g/L, respectivamente. A relação C/N (N total) aproximada para os tratamentos de 3, 6 e 9 g/L de extrato de levedura, foi respectivamente de 38, 32 e 28. A relação C/N (N protéico) aproximada foi de 216, 108 e 72, respectivamente. A disponibilidade de nitrogênio inorgânico correspondeu a uma relação C/N (N inorgânico) de aproximadamente 46, de ordem a não ser restritiva para a demanda da levedura.

INOCULAÇÃO

O inóculo foi preparado a partir da resuspensão dos "slants" de cada cepa, obtendo-se uma suspensão de 60 mL de volume. O mosto foi inoculado com 10 mL dessa suspensão e após a inoculação o frasco foi pesado para saber a quantidade de inóculo introduzida. O restante do inóculo foi utilizado para análise de massa seca. Os frascos inoculados foram incubados em shaker a 32°C, por 24 h e 150 rpm. Após 24 h de fermentação os frascos foram novamente pesados e as amostras coletadas para a realização das análises.

OBTENÇÃO DO BALANÇO DE MASSA

Para obtenção do balanço de massa os frascos foram pesados vazios, antes e depois da inoculação e, após o término da fermentação.

TABELA 3.1- Relação das Usinas de Açúcar ou Destilarias onde foram coletadas amostras e isoladas as cepas de levedura dominante *Saccharomyces cerevisiae*.

Unidades	Tipo de Processo	Número de Estágios	Matéria-Prima	Safra	Localidade
Alvorada	Contínuo	5	Caldo + Mel	1997/98	Araporã-MG
Barra Grande	Batelada Alimentada	—	Caldo + Mel	1997/98	Lençóis Paulista-SP
Bonfim	Batelada Alimentada	—	Caldo + Mel	1994/95	Guariba-SP
Clealco	Contínuo	4	Caldo + Mel	1996	Clementina-SP
Diamante	Contínuo	4	Caldo + Mel	1997/98	Jaú-SP
Goiasa	Batelada Alimentada	—	Caldo + Mel	1997/98	Goiatuba-GO
Jales Machado	Contínuo	4	Caldo + Mel	1997/98	Goianésia-GO
Pedra	Batelada Alimentada	—	Caldo + Mel	1995/96	Serrana-SP
Santa Cruz	Contínuo	5	Mel	1997/98	Campos dos Goitacazes-RJ
Tavares-Amorim*	—	—	—	—	Piracicaba-SP
Unialco	Batelada Alimentada	—	Caldo	1997/98	Guararapes-SP
Vale do Rosário	Batelada Alimentada	—	Caldo + Mel	1995/96	Morro Agudo-SP

*Levedura modificada geneticamente, origem: Banco de Microrganismos do Laboratório de Bioquímica, da ESALQ/USP.

3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ensaios foram conduzidos de modo a se obter:

1. Avaliação dos parâmetros cinéticos e do teor de proteína das cepas de levedura após fermentação em meio padrão sintéticos: caracterização de parâmetros fermentativos e teor de proteína das cepas, com agrupamento das mesmas segundo seu teor protéico. Este experimento foi conduzido em meio sintético com 6 g/L de extrato de levedura.
2. Avaliação da relação C/N sobre o teor de proteína das cepas de levedura: efeito da disponibilidade de fonte nitrogenada protéica no substrato de fermentação, sobre parâmetros cinéticos das cepas e seu teor de proteína. Nesse caso o experimento foi conduzido em meio sintético, com concentrações de extrato de levedura de 3, 6 e 9 g/L.
3. Avaliação do teor de proteína com o número de ciclos de fermentação: comportamento das cepas quanto à variação do seu teor protéico após o reciclo de células em fermentação. Este experimento foi conduzido em meio sintético com 6 g/L de extrato de levedura.
4. Avaliação do processo de enriquecimento de proteína (fermentação endógena) na massa seca de levedura: efeito da fermentação endógena sobre o teor de proteína, massa celular seca e quantidade de proteína produzida pelas cepas. Aqui também o experimento foi conduzido em meio sintético com 6 g/L de extrato de levedura.

As informações gerais sobre as metodologias aplicadas nesses experimentos são apresentadas a seguir.

A avaliação das cepas selecionadas dos processos industriais foi feita através de parâmetros de produção de etanol, massa celular e consumo de açúcar. A partir destes parâmetros foi obtida a Capacidade Fermentativa que permite classificar as cepas em altas fermentativas (adequadas aos processos fermentativos industriais), médias fermentativas e baixas fermentativas (inadequadas aos processos fermentativos industriais).

As cepas de levedura isoladas do vinho industrial fermentado foram submetidas ao processo de fermentação em laboratório, em meio de cultivo sintético padrão, sempre nas mesmas condições de temperatura, pH, agitação e tempo de fermentação.

O meio de cultivo básico utilizado para a fermentação das cepas, foi um meio sintético cujos componentes estão apresentados na Tabela 3.2.

TABELA 3.2- Constituição do meio padrão sintético , utilizado como substrato para fermentação.

Componentes	Quantidades (g/L)
Glicose	150
Extrato de levedura	6
KH_2PO_4	5
NH_4Cl	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
KCl	1
H_2O	1000

O teor de nitrogênio em meios sintéticos de fermentação utilizados por diversos pesquisadores, varia em geral de 1,0 a 2,5 g de cloreto de amônio por litro (Rousseau et al. (1992), Lee & Chang (1987) e Thatipamala et al. (1992).

Outros autores como Rodrigues & Andrietta (1995) e Stroppa (1998), relatam a utilização de 5,0 g/L. O teor portanto varia entre 6,0 a 10,0 g/L entre os autores citados.

A Figura 3.1 mostra a seqüência de operações realizadas e amostragens para realizar as análises.

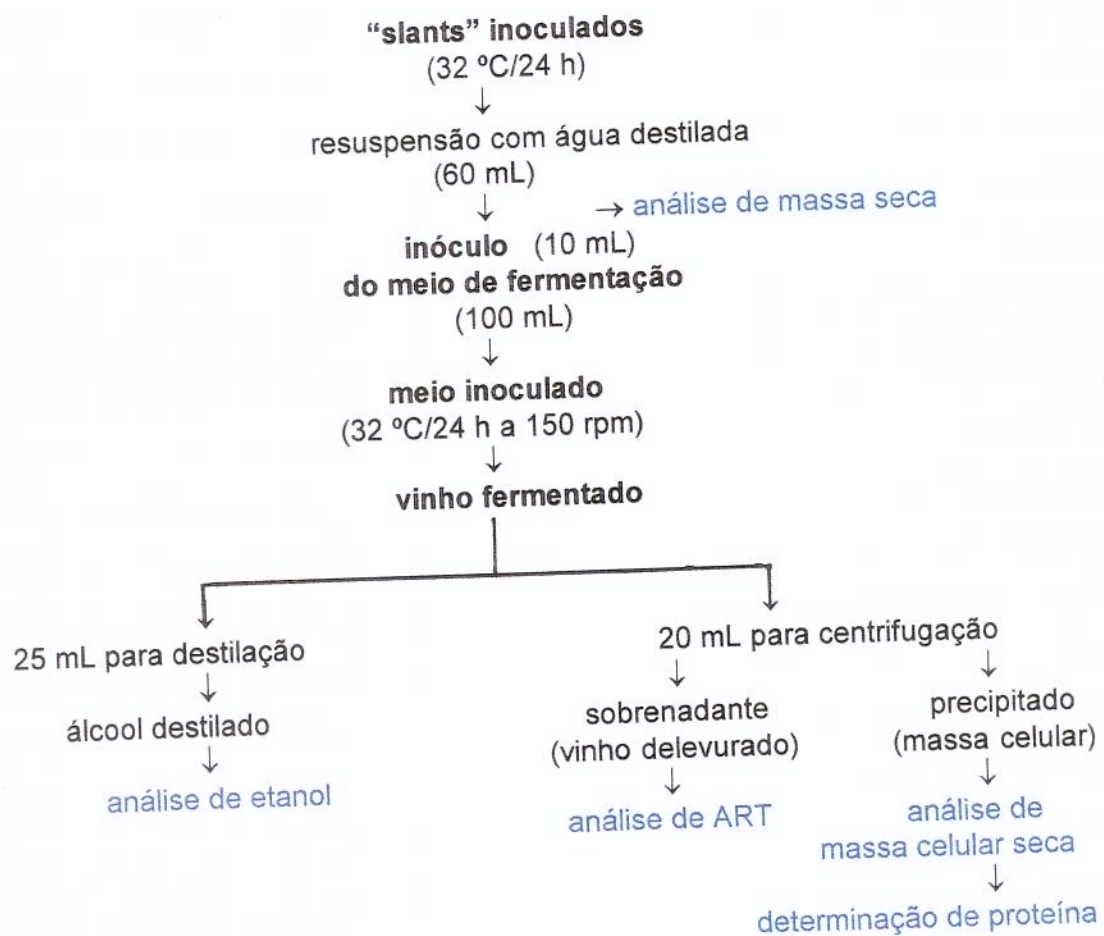


FIGURA 3.1 - Seqüência de operações realizadas e pontos de amostragem.

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1. Determinação de Etanol

Inicialmente amostras de 25 mL de vinho fermentado foram submetidas a destilação com arraste de vapor, em microdestilador, para separar o etanol e outros componentes voláteis. As amostras destiladas foram coletadas em balão de 50 mL, para que todo o etanol presente na amostra fosse recolhido. Amostras do destilado obtido foram tratadas com dicromato de potássio em meio ácido. Nesta reação o etanol é oxidado a ácido acético e a solução adquire tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra. A absorbância foi lida em espectrofotômetro e a concentração de etanol calculada a partir de uma curva de calibração.

Foi utilizado o método espectrofotométrico de dicromato de potássio, por ser um método simples, rápido e capaz de ler com precisão teores de 0 a 20 % de etanol em volume, utilizando quantidades mínimas de reagentes (Duarte, 1994). As soluções de etanol para obtenção da curva padrão foram preparadas em cinco diferentes concentrações. Foram pipetados 5 mL de cada solução em tubos de ensaio, onde eram acrescentados 2 mL de água destilada e 2 mL de dicromato de potássio (reagente de cor). Os tubos eram colocados em banho-maria a 60 °C por 30 min, e em seguida resfriados até temperatura ambiente para a leitura de absorbância a 600 nm.

3.4.2. Determinação da Massa Seca

Para a determinação da massa celular seca produzida foi utilizado o método direto de secagem direta e pesagem do material produzido (Rodrigues & Andrietta, 1995).

Amostras de 20 mL do vinho fermentado foram centrifugadas afim de separar o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante era guardado para análise de ART e o precipitado era lavado duas vezes com água destilada, para eliminar o açúcar residual aderido às células da levedura. A lavagem foi sempre cuidadosa para evitar a perda de massa. Após as lavagens a massa úmida era transferida para placas previamente taradas e colocadas para secar em estufa a 50°C por 24 h (tempo suficiente para chegar a peso constante) sendo a seguir feita a pesagem das placas frias. O peso da massa seca era obtido pela diferença entre o peso final e o peso da placa vazia, sobre o volume de amostra de vinho centrifugado, convertendo o valor final em gramas de massa por 100 gramas de vinho fermentado, através da densidade do vinho.

A determinação da massa seca do inóculo foi feita numa alíquota de 10 mL nas mesmas condições empregadas para o vinho fermentado.

3.4.3. Determinação dos Açúcares Redutores Totais

Para a determinação da glicose no mosto e no vinho fermentado foi utilizado o kit preparado e comercializado pela Laborlab. O método baseia-se na oxidação da glicose, reação catalizada pela enzima glucose-oxidase e peroxidase. Nessa reação ocorre a redução do reagente de cor (solução de 4-

aminofenazona e fenol) com desenvolvimento da cor rosa, proporcional à concentração de glicose presente na amostra. A absorbância era lida em espectrofotômetro e a concentração de glicose calculada a partir de uma curva de calibração (Duarte, 1994).

A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de glicose a 1 %. Da solução estoque foram pipetadas alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mL e transferidas para balões de 10 mL, sendo assim obtidas soluções com concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg/100 mL. Com auxílio de uma pipeta automática, alíquotas de 0,1 mL das soluções, eram transferidas para tubos de ensaio e adicionados de 10 mL do reagente de cor.

As amostras eram colocadas em banho-maria a 37°C por 10 min., em seguida resfriadas até temperatura ambiente e a absorbância lida a 505 nm, em espectrofotômetro.

As determinações foram conduzidas transferindo-se 0,1 mL de vinho fermentado delevurado para os tubos de ensaio e adicionando 10 mL do reagente de cor.

A determinação de açúcar no mosto foi feita da mesma forma, pipetando 1 mL de mosto para 100 mL de água destilada, em balão volumétrico.

3.5. CAPACIDADE FERMENTATIVA

A metodologia usada para calcular a Capacidade Fermentativa foi aquela estabelecida por Viegas (1999) e utilizando uma cepa isolada da Usina Clealco como padrão, por apresentar um comportamento médio dentre todas as freqüentemente empregadas no processo das unidades brasileiras produtoras de álcool. Todos os testes foram conduzidos juntos com a cepa padrão e em triplicata, sempre nas mesmas condições.

PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE ETANOL (Yp/s): expressa a massa de etanol produzida em relação à massa de ART consumida (g de etanol/g de glicose consumida) (Equação 1). Este parâmetro fornece o potencial das cepas de levedura no que diz respeito à eficiência fermentativa, ou seja, indica o máximo de rendimento em etanol de uma cepa. Quando expressa em porcentagem em relação à produção estequiométrica de etanol a partir de glicose (0,5111 g de etanol por g de glicose consumida), representa a Eficiência (EFIC) da cepa, refletindo o desempenho da mesma entre o consumo de açúcar para produção de etanol e para a produção de massa celular de levedura ou outros componentes (Equação 2).

$$Yp/s = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{ART consumido}} \quad (1)$$

$$EFIC = \frac{Yp/s \text{ produzido}}{Yp/s \text{ teórico}} \times 100 \quad (2)$$

PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE CÉLULAS ($Y_{x/s}$): expressa a massa celular produzida em relação à massa de ART consumida (Equação 3). Este parâmetro fornece a quantidade (g) de massa celular seca produzida por grama de açúcar consumido.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{massa celular seca produzida}}{\text{ART consumido}} \quad (3)$$

CONVERSÃO DE ART (CONV): expressa a afinidade do microrganismo com o açúcar que ele consome para a produção de etanol (Equação 4). Quanto maior for a conversão maior capacidade terá a cepa de crescer em concentrações menores de açúcar que aquela em que foi determinada, mostrando também baixa limitação pelo substrato, sendo capaz de consumi-lo quase que totalmente, evitando perdas de rendimento fermentativo devidas a concentrações elevadas de açúcar residual no vinho.

$$\text{CONV} = \frac{\text{ART entrada} - \text{ART saída}}{\text{ART entrada}} \times 100 \quad (4)$$

ETANOL NO VINHO (ETOH vinho): a concentração de etanol (% m/m) no vinho, está relacionada e limitada a quantidade de açúcar disponível no mosto e, reflete o desempenho da cepa considerando sua Eficiência e Conversão de Substrato (Equação 5). Quando expresso em porcentagem de etanol em relação à produção estequiométrica de etanol a partir da glicose presente no mosto, representa o Rendimento da Fermentação (REND) (Equação 6).

$$\text{ETOH vinho} = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{massa de vinho}} \quad (5)$$

$$\text{REND} = \frac{\text{ART consumido} \times Y_{p/s} \text{ produzido} \times 100}{\text{ART entrada} \times Y_{p/s} \text{ teórico}} \quad (6)$$

A partir das produções específicas de etanol ($Y_{p/s}$) e massa seca ($Y_{x/s}$) foram calculados os índices de Produtividade (PROD) e Velocidade de Consumo de Substrato (VCS).

A Capacidade Fermentativa, conforme (Viegas, 1999), é dado pela fórmula (Equação 7):

$$\text{CF} = 10 \times VY_{p/s} + 2 \times VY_{x/s} + 5 \times V\text{PROD} + 5 \times V\text{VCS} \quad (7)$$

Onde $V_{yp/s}$, $V_{yx/s}$, V_{PROD} e V_{VCS} são a variação percentual da cepa teste (t) em relação ao valor da cepa padrão (p) analisada no lote de frascos (Equação 8). Por exemplo:

$$V_{yp/s} = \frac{Y_{p/s} \text{ t} - Y_{p/s} \text{ p} \times 100}{Y_{p/s} \text{ p}} \quad (8)$$

Produtividade (PROD): expressa a massa (g) de etanol produzida pelo volume (L) de meio de fermentação por unidade de tempo (h) (Equação 9). Este parâmetro permite determinar a velocidade de transformação do açúcar em etanol. Quanto maior for a produtividade melhor será a levedura para o processo.

$$\text{PROD} = \frac{\text{ETOH prod} \times 100}{\text{massa de vinho} \times 24} \quad (9)$$

Velocidade de Consumo de Substrato (VCS): expressa a massa (g) de ART consumido pelo volume (L) de meio em fermentação por unidade de tempo (h) (Equação 10). Este parâmetro fornece a velocidade com que a cepa de levedura consome o açúcar disponível. Quanto maior for a velocidade de consumo de ART mais adequada será a cepa para o processo industrial.

$$VCS = \frac{\text{ART cons} \times 100}{\text{massa mosto} \times 24} \quad (10)$$

Convém ressaltar que no caso de produção de células a variação é dada por $Yx/s_p - Yx/s_t$, uma vez que a maior produção de massa celular pela cepa teste em relação a padrão, é uma característica indesejável.

Na fórmula de cálculo da Capacidade Fermentativa, Viegas (1999) atribuiu pesos diferenciados para cada uma das variáveis, de acordo com a importância de cada uma delas no desempenho fermentativo da cepa. Assim, foram atribuídos 10; 2; 5 e 5 para as variáveis relativas a Y_p/s , Y_x/s , Produtividade e Velocidade de Consumo de Substrato.

A capacidade fermentativa indica o quanto a cepa se assemelha à cepa padrão que é considerada uma boa cepa fermentativa, e quanto mais próximo de zero for o valor do CF, mais similares serão; valores positivos indicam uma superioridade da cepa testada em relação à cepa padrão, e valores negativos indicam inferioridade. Os valores de CF numa faixa de +50 a -50, são considerados para classificar cepas como fermentativas e adequadas para o processo de fermentação. Para Viegas (1999) quando o valor de CF está dentro dessa faixa a cepa tem a mesma capacidade fermentativa que a cepa padrão.

Segue abaixo os intervalos de Capacidade Fermentativa usadas para classificar as cepas:

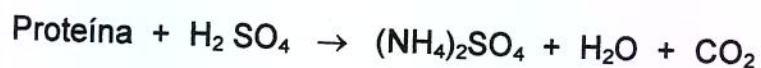
- Alta Capacidade Fermentativa: -50 a +50
- Média Capacidade Fermentativa: -50 a -100
- Baixa Capacidade Fermentativa: menor que -100

3.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA NA MASSA DE LEVEDURA SECA

O método de Kjeldahl determina o nitrogênio contido na matéria orgânica, incluindo o nitrogênio protéico e outros compostos nitrogenados não-protéicos como aminas, amidas, aminoácidos livres e nitrilas. Neste caso o resultado é dado como nitrogênio total. Para obter-se o teor de proteína, o nitrogênio total quando é predominante protéico pode ser corrigido pelo fator de conversão de 6,25.

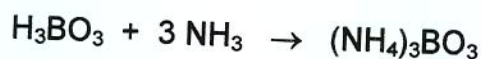
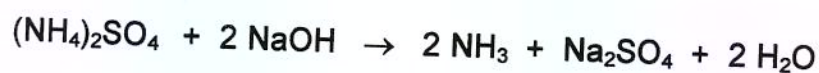
O método de determinação de proteína constitui-se de 3 etapas. Na primeira etapa é feita uma digestão rápida (5 min) de 0,2 g da amostra, com 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de água oxigenada 50%, a 450°C, sem adição de nenhum sal coadjuvante da digestão, num bloco digestor Digesdahl, constituído por sistema de aquecimento de amostra individual e condensador que impedia a perda do vapores formados durante a digestão.

Nessa fase as proteínas e os compostos nitrogenados são decompostos e forma-se o sulfato de amônia.

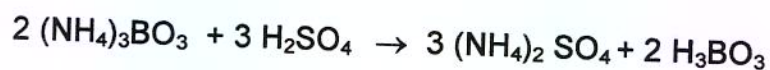


O balão com a amostra digerida é retirado do bloco digestor, resfriado até a temperatura ambiente e o volume completado para 100 mL, com água destilada.

A segunda etapa envolve a destilação da amostra, onde 25 mL da solução acima é tratada com 20 mL de solução de hidróxido de sódio 50%. O sulfato de amônia em presença de NaOH libera NH_3 , que é recolhido em 50 mL de uma solução de ácido bórico 2%, com indicador misto (AOAC, 1984). A referida solução é obtida pela adição de 5 mL de solução de vermelho de metila 0,1% e 25 mL de verde de bromocresol 0,1% (ambos em etanol absoluto), a 1 L de solução de ácido bórico 2 %.



Na terceira e última etapa é feita a titulação da solução ácido bórico-destilado, onde o NH_3 da solução de H_3BO_3 é titulado com H_2SO_4 0,1 N. O ácido sulfúrico 0,1 N é padronizado com Na_2CO_3 .



O nitrogênio protéico é calculado através da equação 11:

$$\% \text{ PROT} = \frac{(V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ br}}) \times 14,007 \times N(\text{H}_2\text{SO}_4) \times 10.000 \times 6,25}{25 \text{ mL} \times \text{Peso amostra (mg)}} \quad (11)$$

Onde:

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ -	volume de H_2SO_4 gasto na titulação da amostra (mL)
$V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ br}}$ -	volume de H_2SO_4 gasto na titulação do branco (mL)
14,007 -	peso molecular do nitrogênio
$N(\text{H}_2\text{SO}_4)$ -	normalidade do H_2SO_4 usado para titular as amostras e o branco
10.000 -	fator de correção de unidade
6,25 -	fator de conversão para obtenção do nitrogênio protéico
25 -	volume de amostra para titulação (mL)
Peso da amostra -	quantidade (g) de massa celular de levedura seca
% PROT -	porcentagem de proteína

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Tukey, adotando-se o nível de significância de 5 % para ambos os casos.

A análise dos resultados do experimento para Avaliação dos Parâmetros Cinéticos e do Teor de Proteína das cepas isoladas após fermentação em meio sintético sem reciclo (item 4.1), foi realizado conforme o delineamento:

Causas de Variação		Graus de Liberdade
Destilarias/Usinas	(12)	11
Repetições	(3)	2
Resíduo		22
Total	(36)	35

Os resultados dos parâmetros avaliados (Y_p/s , Y_x/s , Etanol no vinho, Conversão, Eficiência, Rendimento e Proteína na levedura seca) foram submetidos a análise de correlação linear.

A análise de variância de regressão polinomial (linear e quadrática) foi empregada para avaliar os resultados do experimento de Avaliação da Relação C/N sobre o Teor de Proteína das Cepas de Levedura (item 4.2), conforme o delineamento:

Causas de Variação		Graus de Liberdade
Destilarias/Usinas	(4)	3
Meios	(3)	2
Repetições	(3)	2
Resíduo		28
Total	(36)	35

Os resultados também foram submetidos a análise de correlação linear.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DO TEOR DE PROTEÍNA DAS CEPAS ISOLADAS APÓS FERMENTAÇÃO EM MEIO PADRÃO SINTÉTICO SEM RECICLO.

As leveduras dominantes isoladas de fermentações alcoólicas de 12 destilarias foram inoculadas em meio padrão sintético (item 3.3) para determinação de parâmetros fermentativos, e do teor de proteína na biomassa seca recuperada. O objetivo foi o de conhecer os níveis de proteína e possíveis diferenças entre as cepas dominantes dos processos e verificar a possibilidade de associação com os seus parâmetros fermentativos. A Tabela 4.1 mostra as médias (3 repetições) dos parâmetros estudados: Produção Específica de Etanol (Y_p/s), Produção Específica de Células (Y_x/s), Etanol no Vinho (ETOH Vinho), Conversão de Substrato (CONV), Eficiência da levedura (EFIC), Rendimento da fermentação (REND) e Proteína da levedura seca (PROT).

Na literatura não foram encontradas informações sistematizadas sobre a variação do teor de proteína de cepas de levedura em fermentação alcoólica.

Como os resultados mostraram diferenças no teor de proteína das cepas, estas foram classificadas em quatro grupos: baixo, médio-baixo, médio-alto e alto teor de proteína.

O teor de proteína das leveduras variou numa ampla faixa de 39 a 51 %. As cepas na faixa de 39,0 a 42,9 % de proteína formaram o grupo das leveduras considerado com baixo teor de proteína; deste grupo fizeram parte as cepas das Usinas Diamante e Pedra. As cepas das Usinas Bonfim, Unialco, Barra Grande e Goiás fizeram parte do grupo com teor médio-baixo de proteína, com valores na faixa de 43,0 a 45,9 %. As cepas das Usinas Clealco, Santa Cruz e

Alvorada compuseram o grupo de cepas de levedura com teor médio-alto de proteína (46,0 a 48,9 %). Por último foram agrupadas as cepas consideradas com alto teor de proteína, no intervalo de 49,0 a 51,0 %; deste grupo fizeram parte as leveduras das Usinas Jalles Machado, Vale do Rosário e linhagem Tavares Amorim. Esta classificação teve como base uma análise estatística, conforme mostrado na Tabela 4.1.

Os teores de proteína na levedura seca obtida de fermentações alcoólicas industriais mostram teores ao redor de 30 % (Myiada, 1978; Fialho et al., 1983; Lima, 1983 e Moreira 1984). Estes teores são menores que o valor mínimo de 39 % encontrado nas cepas com baixo teor protéico, devendo ser lembrado que no caso de biomassa industrial esta é acompanhada de impurezas diversas (bagacilho, terra e outras) que reduzem o teor relativo de proteína. Salgado (1976) mostrou que a lavagem de amostras de levedura proporciona um aumento de 33 para 42 % no teor de proteína. Assim, é de se esperar que em condições industriais as cepas estudadas forneçam biomassa com valores inferiores de proteína, dependendo da pureza.

O teor de proteína mostrou correlacionar-se estatisticamente com diversas variáveis, com nível de significância a 1,0 %, com diversas variáveis, apresentando uma correlação negativa com o Etanol no Vinho, Conversão e Rendimento, conforme a Tabela 4.2.

TABELA 4.1 - Resultados experimentais (médias) e estatísticos do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), e comparação de médias pelo teste Tukey (5%) das variáveis Yp/s, Yx/s, Etanol no Vinho (ETOH vinho), Conversão de Substrato (CONV), Eficiência da Cepa (EFIC), Rendimento da Fermentação (REND), Capacidade Fermentativa (CF) e Proteína (levedura seca).

Cepas	Yp/s (g etanol/ g ART cons)	Yx/s (g massa celular seca/gART cons)	ETOH Vinho (g/100g vinho)	CONV (%)	EFIC (%)	REND (%)	CF	Proteína (%)
Diamante	0,451 ^{ab}	0,050	6,03 ^{abcd}	100,00 ^a	88,24 ^{ab}	88,23 ^a	-20	39,87 ^e
Pedra	0,466 ^a	0,047	6,27 ^{abc}	98,79 ^{ab}	91,11 ^a	90,03 ^a	+53	42,62 ^d
Bonfim	0,453 ^{ab}	0,044	5,55 ^c	90,43 ^c	88,57 ^{ab}	80,11 ^b	-65	43,50 ^{cd}
Unialco	0,447 ^{abc}	0,048	5,87 ^{de}	98,13 ^{ab}	87,52 ^{abc}	85,90 ^{ab}	-52	44,26 ^{cd}
Barra	0,461 ^{ab}	0,046	5,96 ^{bcd}	96,78 ^b	90,26 ^{ab}	87,37 ^{ab}	+1	44,38 ^c
Grande								
Goiasa	0,444 ^{abc}	0,045	6,34 ^{ab}	99,95 ^a	86,87 ^{abc}	86,84 ^{ab}	+43	44,45 ^c
Clealco	0,443 ^{abc}	0,040	5,90 ^{cde}	97,90 ^{ab}	86,61 ^{abc}	84,78 ^{ab}	0	47,20 ^b
Santa Cruz	0,459 ^{ab}	0,040	6,06 ^{abcd}	98,62 ^{ab}	89,81 ^{ab}	88,52 ^a	+38	47,69 ^b
Alvorada	0,467 ^a	0,047	5,70 ^{de}	91,79 ^c	91,31 ^a	86,37 ^{ab}	-38	47,81 ^b
Jalles	0,459 ^{ab}	0,048	6,37 ^a	98,58 ^{ab}	89,75 ^{ab}	88,44 ^a	+54	49,82 ^a
Machado								
Vale do	0,435 ^{bc}	0,048	4,50 ^f	76,69 ^e	85,11 ^{bc}	65,27 ^c	-285	50,49 ^a
Rosário								
Tavares	0,421 ^c	0,043	4,63 ^f	81,87 ^d	82,43 ^c	67,63 ^c	-254	50,52 ^a
Amorim								
Média	0,450	0,046	5,77	94,13	88,13	83,29	-	46,05
Teste F	0,1	ns	0,01	0,01	0,01	0,01	-	0,01
Coeficiente de Variação (%)	2,03	17,05	2,36	1,10	2,04	3,09	-	1,25

Teste F: nível de significância de 5 %.

Teste Tukey: nível de significância de 5 %; letras iguais indicam médias estatisticamente idênticas.
ns: não significativo

Os resultados estatísticos da correlação entre as variáveis (Tabela 4.2) mostra o comportamento das mesmas. O Rendimento, incorpora as tendências para Produção Específica de Etanol, Etanol no Vinho e Conversão. Por outro lado, a Produção Específica de Etanol ou a Eficiência também correlacionaram-se com o Etanol no Vinho e Conversão, mas de forma independente do Rendimento, uma vez que não observou-se correlação entre Eficiência e Rendimento. Finalmente, a produção de células ($Y_{x/s}$) mostrou conforme esperado, uma correlação negativa com o Etanol no Vinho.

As cepas Diamante e Pedra, do grupo das leveduras com baixo teor de proteína, apresentaram capacidade fermentativa de -20 e +53, respectivamente, o que as classificam como altas fermentativas e adequadas para o processo industrial (item 3.5). Estas cepas mostraram elevados rendimentos, com valor médio de 89,13 %. Dentre todas as cepas estudadas, este foi o grupo que apresentou alta conversão de substrato e elevados teores de etanol no vinho.

Vale a pena destacar que, dentre todas as cepas estudadas, a cepa da Usina da Pedra foi a que apresentou o maior Rendimento (90,03 %) e uma das mais elevadas Capacidades Fermentativas (+ 53).

Desta forma, o baixo teor de proteína não impediu que a cepa da Usina da Pedra se apresentasse como uma das melhores cepas fermentativas.

Analisando as cepas do segundo grupo, isto é, aquelas com teor médio-baixo de proteína (43,0 a 45,9 %) observou-se que apresentaram Rendimento entre 80,11 a 86,84, com valor médio de 85,06 %.

As cepas das Usinas Bonfim e Unialco apresentaram capacidade fermentativa de -62 e -52, respectivamente. Estes valores de capacidades fermentativas, abaixo de - 50 são considerados baixos, e permite classificá-las como médias fermentativas. Para a Usina Bonfim, foi obtido um Rendimento de 80,1 % , e baixo teor de Etanol no Vinho de 5,55 g/100 g vinho . Para a cepa da Destilaria Unialco, o rendimento foi de 85,9 % e Etanol no Vinho de 5,87 g etanol/100 g vinho.

As cepas das Usinas Barra Grande e Goiasa mostraram capacidade fermentativa de -12 e -4 podendo classificá-las como altas fermentativas. A da Barra Grande apresentou uma elevada Eficiência, e a Goiasa elevada Conversão e Etanol no vinho.

Com base nestas comparações pode-se dizer que nestas condições de ensaio estas cepas do grupo de médio-baixo teor de proteína possuem concentrações similares de proteína e comportamento fermentativo bastante diferente.

As cepas das Usinas Clealco, Santa Cruz e Alvorada foram classificadas como médias-altas em teor de proteína apresentando rendimentos entre 84,78 a 88,52, com valor médio de 86,56 %.

As cepas do grupo de médio-alto teor de proteína celular apresentaram um comportamento fermentativo mais homogêneo entre si que as cepas do grupo de médio-baixo teor. Todas se classificaram como altas fermentativas, segundo os valores de Capacidade Fermentativa.

TABELA 4.2 - Resultados do Coeficiente de Correlação Linear (r) entre os parâmetros, estatisticamente significativos ao nível de significância de 1 %, para as variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Produção Específica de Células (Yx/s), Etanol no Vinho, Conversão de Substrato (CONV), Eficiência da Levedura (EFIC), Rendimento da Fermentação (REND) e Proteína na Levedura Seca (PROT).

Parâmetros	Yp/s	Yx/s	Etanol Vinho	CONV	EFIC	REND	PROT
Yp/s	-	ns	0,67	0,51	1,00	0,77	ns
Yx/s		-	ns	ns	ns	ns	ns
ETOH Vinho			-	0,95	0,68	0,96	-0,52
CONV				-	0,51	0,93	-0,60
EFIC					-	ns	ns
REND						-	-0,57
PROT							-

ns: não significativo

As cepas das Usinas Jalles Machado, Vale do Rosário e a linhagem Tavares-Amorim foram agrupadas dentro do grupo que possui o maior teor de proteína (ao redor de 50 %). As cepas Vale do Rosário e a Tavares-Amorim foram as piores, dentre todas as estudadas, quanto a Capacidade Fermentativa, apresentando valores de -285 e -254, respectivamente, permitindo classificá-las como baixas fermentativas e inadequadas para o processo industrial. O Rendimento em etanol foi de 65,27 a 67,63 %, respectivamente, com rendimento médio de 66,45 %.

A cepa da Usina Jalles Machado apresentou uma Capacidade Fermentativa de +54 considerada alta fermentativa e mostrou um rendimento de 88,44 % e Etanol no Vinho de 6,37 g/100 g vinho o que a

diferenciou totalmente das outras duas cepas deste grupo, além de mostrar elevada produção de células. Esta é uma cepa boa para ser utilizada nas Usinas com interesse de produzir levedura seca pois além de apresentar-se como alta fermentativa é boa produtora de massa celular com elevado teor em proteína.

A Tabela 4.3 mostra os resultados médios de rendimento, segundo os teores de proteína.

TABELA 4.3 - Resultados médios de Rendimento da fermentação em função dos teores de proteína nas cepas de levedura.

Teor de Proteína	Rendimento Médio (%)
Baixo	89,13
Médio-Baixo	85,06
Médio-Alto	86,56
Alto	73,78

A análise global dos resultados obtidos permite dizer que as cepas com 40 a 50 % de proteína apresentaram condições de Capacidade Fermentativa que recomendam seu uso industrial. No entanto, algumas cepas cujos teores de proteína estavam acima de 50 % foram as únicas no experimento que mostraram-se como de baixa capacidade fermentativa e inadequadas a um processo fermentativo viável.

Os resultados obtidos também mostraram que nas condições dos ensaios o baixo teor de proteína da cepa não interferiu no Rendimento e nas suas características fermentativas. No caso das cepas ricas em proteínas o mesmo não se pode dizer, já que algumas dessas apresentaram

péssimas características fermentativas, indicando serem mais exigentes em relação aos nutrientes presentes no meio.

4.2. AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO C/N SOBRE O DESEMPENHO FERMENTATIVO E TEOR DE PROTEÍNA DAS CEPAS DE LEVEDURA

Este experimento foi realizado com o objetivo de determinar o efeito da relação C/N (carbono/nitrogênio) no teor de proteína da levedura e seu efeito sobre o desenvolvimento fermentativo das cepas nos meios estudados.

Para condução deste experimento foram selecionadas, a partir da primeira etapa deste trabalho (item 4.1), quatro cepas de levedura de acordo com o teor de proteína que elas apresentaram. Do primeiro grupo foi selecionada a cepa da Usina Diamante, representando aquelas com baixo teor de proteína. Do grupo com teor médio-baixo de proteína a cepa da Usina Goiasa. A cepa da Usina Clealco representou o grupo das cepas com teor médio-alto e do grupo com alto teor de proteína foi selecionada a cepa da Usina Vale do Rosário.

A seleção das cepas dentro de cada grupo segundo o teor de proteína, obedeceu a diferentes critérios. A cepa da Usina Diamante foi escolhida por apresentar o mais baixo teor de proteína. A Goiasa, com médio-baixo teor de proteína, foi selecionada por suas características fermentativas e de produção de células. A Clealco, com médio-alto teor de proteína, é a cepa padrão. Por fim, a cepa da Usina Vale do Rosário, com alto teor de proteína, foi escolhida como não-fermentativa devido a sua baixa Capacidade Fermentativa.

O meio de fermentação foi preparado com diferentes relações C/N (carbono/nitrogênio), mantendo fixa a concentração da fonte de carbono (glicose) e variando a concentração da fonte de nitrogênio protéico (extrato de levedura). O meio padrão (Tabela 3.2) contém 6 g de extrato de levedura por litro. Assim, foram preparados também tratamentos com 3 e 9 g/L.

A produção de etanol pela levedura, em relação ao ART consumido, avaliada pelo índice Y_p/s e Eficiência, mostrou que a variação do teor de N-protéico no meio não causou alteração estatisticamente significativa nessas variáveis. Portanto, a produção de etanol não dependeu dos níveis de N-protéico no meio; individualmente, todas as cepas também não mostraram ser afetadas pelo N-protéico (Tabela 4.4).

A biomassa de células de levedura, avaliada pelo índice Y_x/s , mostrou um comportamento similar para todas as cepas com relação ao teor de N-protéico no meio. A quantidade (g) de células produzidas por grama de ART consumido aumenta com o aumento da adição de extrato de levedura (Figura 4.1). Para as cepas Diamante e Goiás, de baixo e médio-baixo teor de proteína, o aumento de biomassa no meio com 9 g/L de extrato de levedura chegou a cerca de 60 % daquele com 3 g/L. Na Clealco (teor médio-alto de proteína) e Vale do Rosário (teor alto de proteína) esse aumento foi de cerca de 25 e 40 %, respectivamente. A interação cepa x meio na cepa da Vale do Rosário mostra que esta cepa atingiu Y_x/s máximo com o tratamento de 6 g/L de N-protéico, diferentemente das demais que o fizeram no meio com 9 g/L (Tabela 4.5).

BASSO et al. (1996) verificaram que a taxa de multiplicação da levedura e a porcentagem de levedo no vinho, são influenciadas diretamente pelo teor de nitrogênio amoniacal.

A concentração de etanol no vinho foi marcadamente influenciada pela concentração de extrato de levedura no meio (Tabela 4.5 e Figura 4.2), sendo que o etanol aumentou com a adição de extrato. Este comportamento é expresso pela regressão quadrática ($R = +1,00$), estatisticamente significativa. Em substrato com 3 g/L de extrato de levedura a concentração de etanol no vinho foi de 3,63 g/100g, podendo-se observar que todas as cepas responderam com uma baixa atividade fermentativa, e considerando a correlação positiva ($r = +0,77$), estatisticamente significativa, com a produção específica de células (Tabela 4.6), aquele comportamento pode ser atribuído

à baixa quantidade de células presentes. A presença de 6 e 9 g/L de extrato de levedura elevou o etanol no vinho em praticamente 50 e 65%, respectivamente. Ainda pode ser observado que a cepa Vale do Rosário, que se mostra com um menor potencial de fermentação que as demais, apresentou um comportamento também diferenciado, ou seja, respondeu com aumentos de etanol no vinho, com significância estatística, até a dosagem de 9 g/L, mostrando que requer mais nitrogênio protéico que as outras cepas. Todavia, mesmo em meio com 9 g/L esta cepa apresentou valor menor de etanol no vinho em relação às demais cepas em meio com 6 g/L.

O índice $Y_{x/s}$ (Tabela 4.6) mostrou correlação direta com a Conversão de Substrato ($r = +0,74$), e consequentemente com o Etanol no Vinho ($r = + 0,77$), e com o Rendimento ($r = + 0,76$). Estas variáveis também apresentaram regressão linear ou quadrática estatisticamente significativas, em função dos níveis de extrato de levedura no substrato de fermentação. Da mesma forma, em fermentações industriais, BASSO et al. (1996) haviam observado que quanto maior a quantidade de fermento na dorna, maior é o rendimento da fermentação.

TABELA 4.4 - Resultados (Médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Produção Específica de Etanol (Yp/s) e Eficiência da Levedura.

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	Yp/s (g etanol/g ART consumido)				
3	0,463	0,425	0,434	0,442	0,441
6	0,445	0,447	0,449	0,467	0,452
9	0,452	0,458	0,452	0,456	0,455
Média de Cepas	0,453	0,443	0,445	0,455	
Coeficiente de Variação (%)	6,38				
Teste F Cepa	ns				
Teste F Meio	ns				
Teste F (Regressão)	ns				

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	EFICIÊNCIA DA LEVEDURA (g etanol/100 g ART consumido)				
3	90,36	83,07	84,96	86,41	86,20
6	87,02	87,69	87,73	91,44	88,50
9	88,30	89,56	88,51	89,28	88,92
Média de Cepas	88,56	86,77	87,10	89,05	
Coeficiente de Variação (%)	6,40				
Teste F Cepa	ns				
Teste F Meio	ns				
Teste F (Regressão)	ns				

- ✧ Comparação das médias de Meios, Cepas e Interações C x M e M x C pelo teste Tukey (5 % de significância): letras em vermelho, comparação na horizontal e, em azul, na vertical.
- ✧ Níveis de significância estatística do teste F: 5 % (*), 1 % (**) e 0,1 % (***).
- ✧ ns: não significativo.

TABELA 4.5 - Resultados (Médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Produção Específica de Células (Yx/s).

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	Yx/s(g massa celular seca/g ART consumido)				
3	0,040 ^{ac}	0,041 ^{ab}	0,045 ^{ab}	0,039 ^{ab}	0,041 ^c
6	0,052 ^{ab}	0,049 ^{ab}	0,044 ^{ab}	0,051 ^{aa}	0,049 ^b
9	0,064 ^{aba}	0,065 ^{aa}	0,055 ^{ba}	0,055 ^{ba}	0,060 ^a
Média de Cepas	0,052	0,052	0,048	0,048	
Coeficiente de Variação (%)	8,46				
Teste F Cepa	ns				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	***				
Coeficiente de Regressão Linear (R)	+ 0,99***				

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	ETANOL NO VINHO (g etanol/100 g vinho)				
3	3,46 ^{ab}	3,68 ^{ab}	4,06 ^{ab}	3,32 ^{ab}	3,63 ^c
6	5,87 ^{aa}	5,73 ^{aa}	5,62 ^{aa}	4,36 ^{bb}	5,40 ^b
9	6,01 ^{aa}	6,11 ^{aa}	6,03 ^{aa}	5,82 ^{aa}	5,99 ^a
Média de Cepas	5,11 ^a	5,17 ^a	5,24 ^a	4,50 ^b	
Coeficiente de Variação (%)	9,22				
Teste F Cepa	***				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	***				
Coeficiente de Regressão Quadrática (R)	+ 1,00**				

- ⊗ Comparação das médias de Meios, Cepas e Interações C x M e M x C pelo teste Tukey (5 % de significância): letras em vermelho, comparação na horizontal e, em azul, na vertical.
- ⊗ Níveis de significância estatística do teste F: 5 % (*), 1 % (**) e 0,1 % (***).
- ⊗ ns: não significativo.

TABELA 4.6 - Resultados do Coeficiente de Correlação Linear (r) com nível de significância de 0,1 %, entre as variáveis: Produção Específica de Etanol (Yp/s), Produção Específica de Células(Yx/s), Etanol no Vinho, Conversão de Substrato (CONV), Eficiência da Levedura (EFIC), Rendimento da Fermentação (REND).

Parâmetros	Yp/s	Yx/s	Etanol no Vinho	CONV	EFIC	REND
Yp/s	-	ns	ns	ns	1,00	ns
Yx/s		-	0,77	0,74	ns	0,76
Etanol no Vinho			-	0,98	ns	1,00
CONV				-	ns	0,98
EFIC					-	ns
REND						-

ns: não significativo.

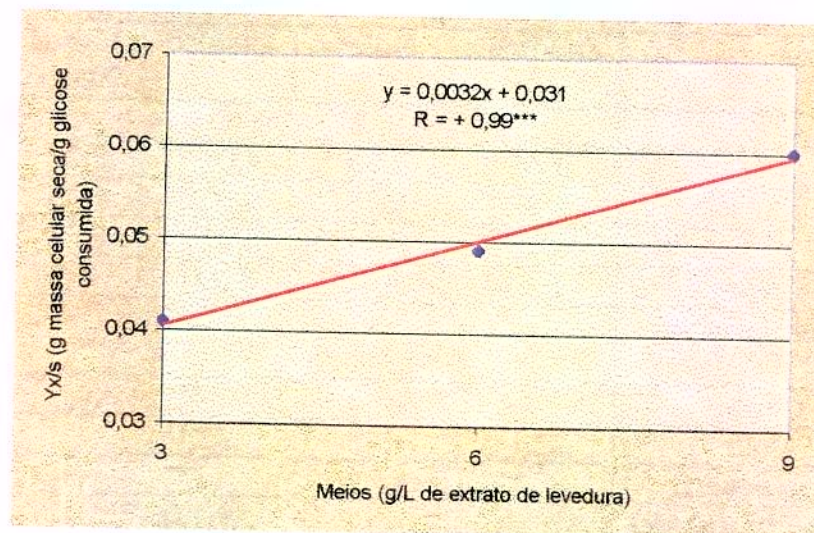


FIGURA 4.1 - Produção específica de células (Yx/s) obtida nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.

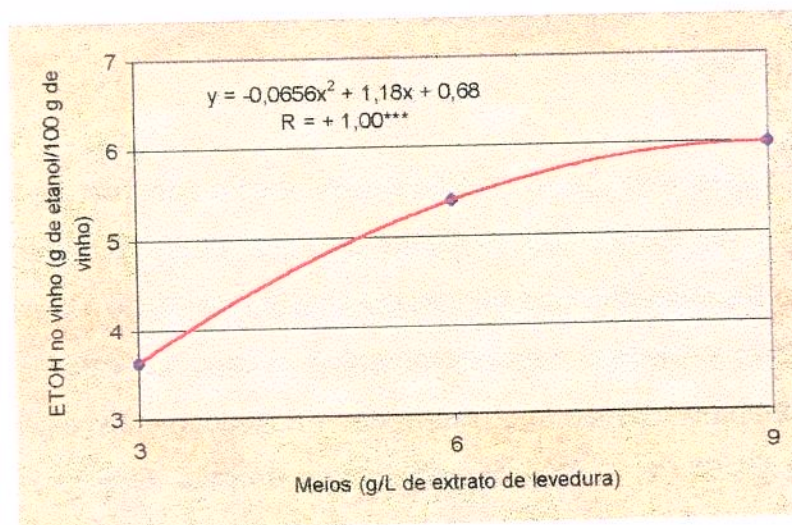


FIGURA 4.2 - Etanol no vinho produzido nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.

Com relação à Conversão de Substrato e Rendimento todas as cepas apresentaram comportamento similar (Tabela 4.7 e Figuras 4.3 e 4.4). Em baixa concentração de N-protéico (3 g/L de extrato de levedura) aqueles fatores são drasticamente reduzidos. As cepas com baixo, médio-baixo e médio-alto teores de proteína, no meio com 6 g/L de extrato de levedura, mostraram resultados estatisticamente similares aos obtidos com o meio de 9 g/L. Na cepa com alto teor em proteína (Vale do Rosário) aqueles fatores ainda se mostraram drasticamente reduzidos no meio com 6 g/L de extrato de levedura, em relação ao meio com 9 g/L. A cepa da Vale do Rosário de alto teor de proteína, diferenciou-se das demais apresentando uma média estatisticamente reduzida em Conversão e Rendimento. O Rendimento foi marcadamente influenciado pelo teor de N-protéico adicionado ao substrato e também pela cepa de levedura. Em substrato com 3 g/L de extrato de

levedura o Rendimento médio foi de 53,38 %, mostrando que baixos teores de N-protéico não permitem atingir Rendimentos adequados em 24 h, período em que se desenvolveu a fermentação.

Para as cepas com baixo, médio-baixo, médio-alto teor de proteína celular, a adição de 6 g/L de extrato de levedura permitiu obter aumentos estatisticamente significativos no Rendimento, que atingiu uma média de 85,04 % para as cepas citadas (Diamante, Goiasa e Clealco, respectivamente); a cepa da Vale do Rosário (alto teor de proteína) também apresentou aumento estatisticamente significativo, atingindo Rendimento de 61,65 %, bastante abaixo dos demais. Com a adição de 9 g/L de extrato de levedura, as três cepas - Diamante, Goiasa e Clealco, apresentaram uma média de 88,79 %, sendo que os aumentos no Rendimento não foram estatisticamente significativos; nessas condições a cepa Vale do Rosário se elevou 85,66 %, com significância estatística.

A cepa da Usina Vale do Rosário, que tem alto teor de proteína, mostrou que mesmo a adição de 9 g / L de extrato de levedura não proporciona condições ideais para atingir em 24 horas de fermentação níveis de rendimento próximo a 89 % como as demais cepas, mostrando ser, essa cepa mais exigente em N-protéico do que as demais.

Vasconcelos (1987) trabalhando em laboratório com mosto de melaço complementado com nitrogênio inorgânico, também verificou que o rendimento da fermentação é influenciado positivamente pelo teor de nitrogênio do mosto.

Observando as médias de meio de cultura do experimento, pode-se notar que nos meios com baixa concentração de extrato de levedura (3 g/L), apresentou muito açúcar residual para todas as cepas (baixa taxa de Conversão). Conforme se aumentou a adição de extrato de levedura no meio (6 e 9 g/L), observou-se um

aumento na velocidade de consumo de açúcar, ou seja, na Conversão do Substrato (Figura 4.3). As cepas das Usinas Diamante , Goiás e Clealco que pertencem ao grupo das cepas com teor baixo, médio-baixo e alto de proteína, respectivamente, consumiram o açúcar mais rapidamente a partir das adições de 6 e 9 g de extrato de levedura, isto é, a Conversão foi maior e assim diminuiu o açúcar residual. Porém a cepa da Usina Vale do Rosário, com alto teor de proteína em sua composição, aumentou gradativamente o consumo conforme o aumento da adição de extrato de levedura, somente atingindo a Conversão máxima com 9 g/L de extrato de levedura. Estes dados confirmam a afirmação de que as cepas com maior teor de proteína exigem meios mais ricos em nitrogênio protéico, para fermentar, sendo portanto, razoável supor que o desempenho das cepas está diretamente ligado à concentração de nitrogênio protéico no substrato.

TABELA 4.7 - Resultados (Médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Conversão de Substrato e Rendimento da Fermentação.

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	CONVERSÃO DE SUBSTRATO (%)				
3	56,67 ^{bb}	65,01 ^{abb}	69,88 ^{ab}	56,83 ^{bc}	62,10 ^c
6	99,95 ^{aa}	96,80 ^{aa}	94,98 ^{aa}	71,91 ^{bb}	90,91 ^b
9	99,99 ^{aa}	99,98 ^{aa}	99,99 ^{aa}	95,93 ^{aa}	98,97 ^a
Média de Cepas	85,54 ^a	87,27 ^a	88,28 ^a	74,89 ^b	
Coeficiente de Variação (%)	9,33				
Teste F Cepa	***				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	***				
Coeficiente de Regressão Quadrática (R)	+ 1,00***				

Continuação TABELA 4.7

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO (g etanol/100 g ART mosto)				
3	51,20 ^{ab}	54,00 ^{ab}	59,33 ^{ab}	48,99 ^{ac}	53,38 ^c
6	86,80 ^{aa}	84,89 ^{aa}	83,43 ^{aa}	65,61 ^{bb}	80,18 ^b
9	88,33 ^{aa}	89,54 ^{aa}	88,50 ^{aa}	85,66 ^{aa}	88,01 ^a
Média de Cepas	75,44 ^a	76,14 ^a	77,09 ^a	66,75 ^b	
Coeficiente de Variação (%)	8,78				
Teste F Cepa	***				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	***				
Coeficiente de Regressão Quadrática (R)	+ 1,00***				

↗ Comparação das médias de Meios, Cepas e Interações C x M e M x C pelo teste Tukey (5 % de significância): letras em vermelho, comparação na horizontal e, em azul, na vertical.

↗ Níveis de significância estatística do teste F: 5 % (*), 1 % (**) e 0,1 % (***).

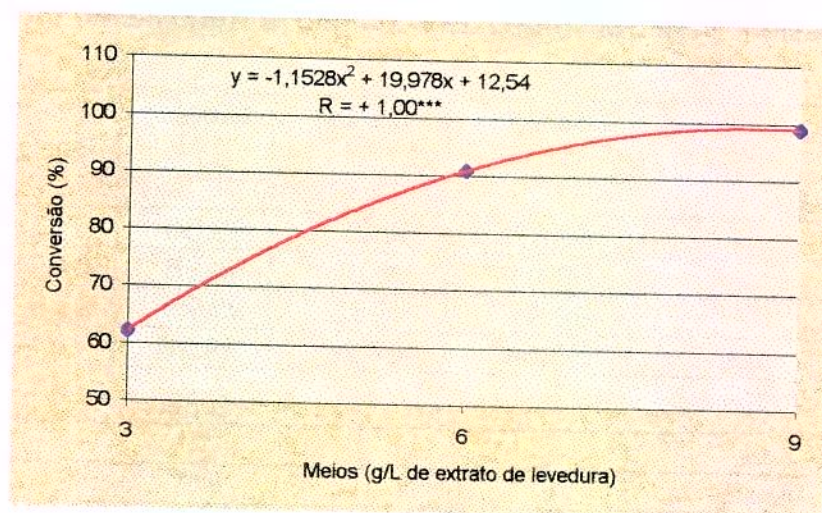


FIGURA 4.3 - Conversão de substrato nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.

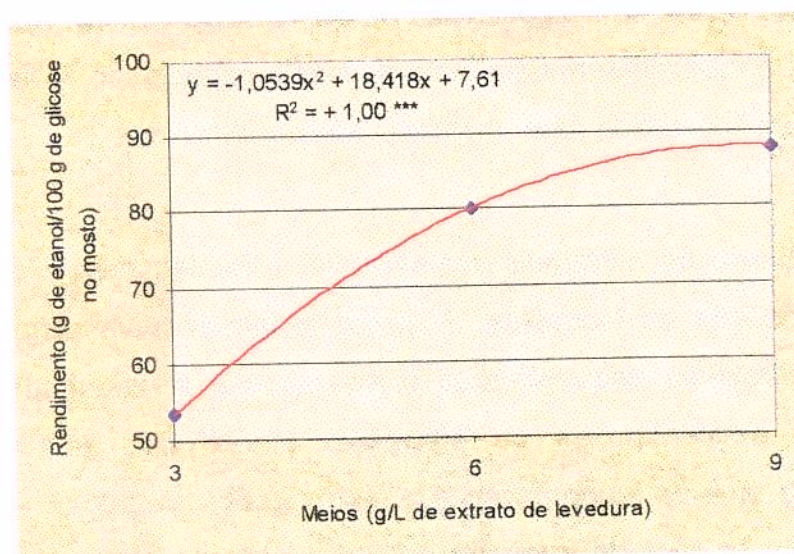


FIGURA 4.4 - Rendimento obtido nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.

A Capacidade Fermentativa (CF) determinada entre todas as cepas e tendo como padrão a cepa da Clealco em meio com 6 g/L de extrato de levedura, variou amplamente entre -390 e +24 (Tabela 4.8). Esses resultados também mostram que em meios de cultura com 6 g/L de extrato de levedura, as cepas Diamante, Goiasa e Clealco (baixo, médio-baixo e médio-alto teor de proteína, respectivamente) apresentam um valor de CF que as classifica como de alta capacidade fermentativa. A adição de mais N-protéico (9g/L) praticamente não alterou a CF. Todavia, é conveniente lembrar que a Capacidade Fermentativa classifica a cepa em alta fermentativa (CF entre - 50 a + 50), média fermentativa (entre -50 a -100) e baixa fermentativa (menor que - 100). A redução do N-protéico no substrato (3 g/L de extrato de levedura) fez com que todas as cepas passassem a apresentar uma CF drasticamente reduzida e classificando-as como de baixa capacidade fermentativa nessa condição. A cepa da Usina Vale do Rosário, com alto teor de proteína, mostrou

um comportamento diferenciado das demais. Esta cepa mesmo nos meios com 3 e 6 g/L de extrato de levedura é classificada como de baixa capacidade fermentativa e no meio com 9 g/L é praticamente uma cepa de média capacidade fermentativa, indicando sua exigência em N-protéico para melhorar sua performance.

A importância do nitrogênio em estimular a fermentação é distinta daquela de estimular a produção de biomassa. A atividade fermentativa responde fortemente a presença de nitrogênio enquanto que o mesmo não é observado na produção de biomassa. Em concentrações de nitrogênio abaixo de cerca de 140 mg/L, o crescimento e a taxa de fermentação são inadequados, enquanto acima de 400 mg/L há forte estímulo da taxa de fermentação, em proporção acima daquela causada por simplesmente estimular a produção de biomassa (Henschke & Jiranek, 1994). Os mesmos autores citam dados que a disponibilidade mínima de nitrogênio para um crescimento adequado da levedura, é de 70 - 140 mg/L, para mostos com concentração inicial de açúcar de 180 - 260 g/L. Outros autores obtiveram taxas de crescimento máximo em meios suplementados com 420 mg/L de nitrogênio amoniacal e 190 mg/L de ácido glutâmico. Em um experimento com excesso de nitrogênio, cerca de 810 mg/L, a formação de biomassa foi estimulada entre 14 e 40 %, enquanto a taxa de fermentação aumentou em 82 a 134 %.

TABELA 4.8 – Resultados obtidos de Capacidade Fermentativa para as cepas das Usinas Diamante, Goiás, Clealco e Vale do Rosário em meios com diferentes relações C/N.

	Cepa com baixo teor de proteína			Cepa com médio-baixo teor de proteína			Cepa com médio-alto teor de proteína			Cepa com alto teor de proteína		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Extrato de Levedura (g/L meio)												
Cepas	Diamante	Diamante	Diamante	Goiasa	Goiasa	Goiasa	Clealco	Clealco	Clealco	Vale do Rosário	Vale do Rosário	Vale do Rosário
CF	-334,37	4,43	-18,18	-361,03	-4,07	-2,12	-294,77	0	24,18	-390,04	-222,29	-46,92

Os teores de proteína (Tabela 4.9 e Figura 4.5) das cepas desenvolvidas no meio padrão (6 g/L de extrato de levedura) mantiveram teores médios que confirmam a sua classificação nos mesmos grupos, ou seja: Diamante, cepa com baixo teor de proteína (39,0 a 42,9 %); Goiasa, com médio-baixo teor em proteína (43,0 a 45,9 %); Clealco, médio-alto (46,0 a 48,9 %) e; Vale do Rosário, com alto teor (49,0 a 51,0 %). Outro resultado a ser notado foi que a adição de 9 g/L de extrato de levedura tender a apresentar valores mais baixos de teor de proteína que os tratamentos com 3 e 6 g/L, com exceção da cepa da Vale do Rosário que manteve um teor de proteína praticamente constante qualquer que fosse a concentração de extrato de levedura.

A Produção de Biomassa (g massa celular seca/kg de vinho), mostrou (Tabela 4.9 e Figura 4.6) valores entre 0,32 a 0,92 g/kg de vinho para as diversas cepas. O meio com 3 g/L de extrato de levedura está associado a baixa produção de biomassa, entre cerca de 0,32 a 0,45 g/L; no meio com 6 g/L a produção ficou entre cerca de 0,51 a 0,72 g/kg de vinho e no meio com 9 g/L, entre cerca de 0,74 a 0,92 g/L. Portanto, a adição de N-protéico mostrou um efeito direto e estatisticamente significativo sobre a produção de biomassa, de todas as cepas, desde as de baixo até as de alto teor de proteína, tal como mostrado na Tabela 4.10.

A presença de maior concentração de N-protéico no substrato, com 9 g/L de extrato de levedura, foi responsável pelo aumento da Produção de Biomassa, em média, de 126,0 e 34,6 % em relação aos tratamentos com 3 e 6 g/L, respectivamente. Assim, vê-se que a presença de N-protéico em quantidades adequadas, é um fator de extrema importância para a multiplicação celular de levedura (Figura 4.6). Durante a fase de crescimento da levedura, o nitrogênio é rapidamente assimilado, dando suporte a altas taxas de crescimento e produção de biomassa, e estimulando a atividade fermentativa. O metabolismo do nitrogênio promove o crescimento, essencialmente com o fornecimento de precursores para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Henschke & Jiranek, 1994).

TABELA 4.9 - Resultados (Médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Proteína e Produção de Biomassa.

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	PROTEÍNA (g proteína/100 g massa celular seca)				
3	41,42 ^{ca}	45,42 ^{ba}	45,80 ^{bab}	49,34 ^{aa}	45,50 ^a
6	41,48 ^{ba}	45,35 ^{ba}	48,16 ^{ba}	49,94 ^{aa}	46,23 ^a
9	40,38 ^{ca}	42,72 ^{bc}	43,33 ^{bb}	49,55 ^{aa}	44,00 ^a
Média de Cepas	41,09 ^c	44,50 ^b	45,76 ^b	49,61 ^a	
Coeficiente de Variação (%)	2,77				
Teste F Cepa	***				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	ns				

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	PRODUÇÃO DE BIOMASSA (g massa celular seca/kg vinho)				
3	0,328 ^{bc}	0,386 ^{abc}	0,445 ^{ac}	0,319 ^{bc}	0,369 ^c
6	0,715 ^{ab}	0,667 ^{abb}	0,585 ^{bc}	0,514 ^{cb}	0,620 ^b
9	0,897 ^{aa}	0,916 ^{aa}	0,785 ^{ba}	0,741 ^{ba}	0,835 ^a
Média de Cepas	0,647 ^a	0,656 ^a	0,605 ^a	0,525 ^b	
Coeficiente de Variação (%)	7,99				
Teste F Cepa	***				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	***				
Coeficiente de Regressão Linear (R)	+ 0,99***				

- ⌘ Comparação das médias de Meios, Cepas e Interações C x M e M x C pelo teste Tukey (5 % de significância): letras em vermelho, comparação na horizontal e, em azul, na vertical.
- ⌘ Níveis de significância estatística do teste F: 5 % (*), 1 % (**) e 0,1 % (***).
- ⌘ ns: não significativo.

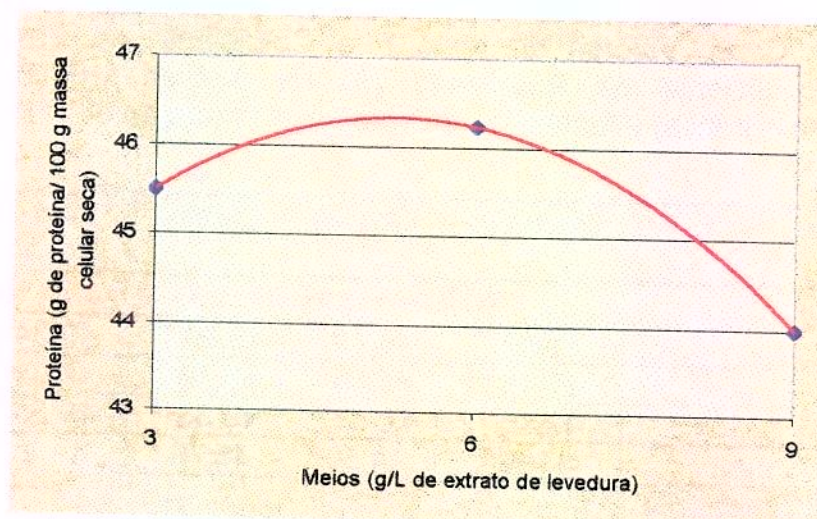


FIGURA 4.5 - Teor de proteína nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro. Gráfico indicativo do comportamento observado (análise de regressão não significativa).

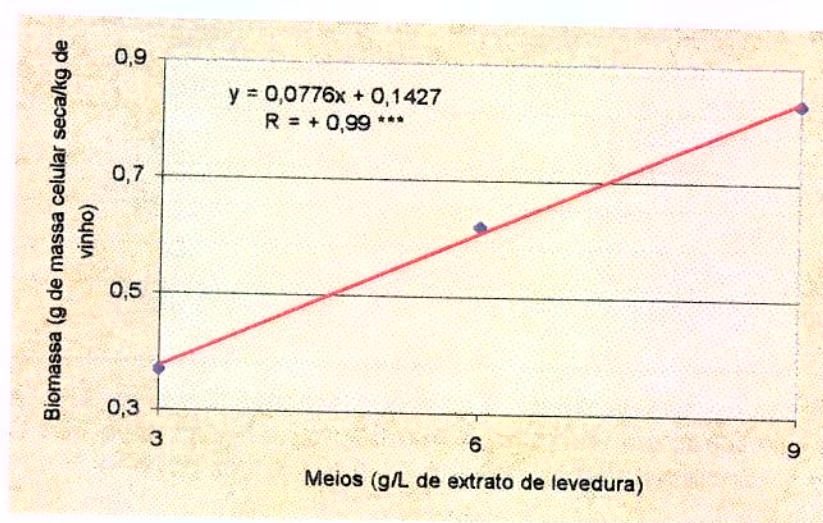


FIGURA 4.6 - Produção de biomassa nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.

TABELA 4.10 - Efeito da adição de N-protéico sobre a produção de biomassa, de todas as cepas.

Extrato de Levedura (g/L)	Produção de Biomassa (g massa celular seca/kg de vinho)	Y _{x/s}
3	0,32 a 0,45	0,039 a 0,045
6	0,51 a 0,72	0,044 a 0,052
9	0,74 a 0,92	0,055 a 0,065

Finalmente, a Produção de Proteína (g proteína/kg de vinho) mostrou valores variados entre 0,13 e 0,40 g/L (Tabela 4.11 e Figura 4.7). O meio com 3 g/L de extrato de levedura produziu entre 0,13 e 0,20 g/L; no meio com 6 g/L a produção ficou entre 0,25 e 0,30 g/L e no meio com 9 g/L entre 0,34 e 0,40 g/L. Ficou portanto visível a influência positiva do teor de N-protéico no substrato sobre a quantidade de proteína produzida, em todas as cepas estudadas, desde as de baixo até as de alto teor de proteína na célula, já que o N-protéico, como já se viu no parágrafo anterior, aumentou significativamente a Produção de Biomassa para todas as cepas sem exceção.

Assim, seria recomendável um experimento em maior escala empregando fontes brutas comerciais de nitrogênio protéico, considerando a avaliação do teor dessa forma de nitrogênio no mosto utilizado, e avaliando o efeito sob condições práticas de Produção de Biomassa celular, rendimento da fermentação, fermentação de componentes secundários e outros parâmetros, para averiguação e obtenção de mais dados para uma avaliação técnico-econômica.

TABELA 4.11 - Resultados (Médias) de Meios, Cepas e Interações Cepa x Meio e Meio x Cepa, Valores do teste F e Coeficiente de Variação Total (%), Coeficiente de Regressão (R) da Análise Polinomial (Linear e Quadrática) e teste F para Produção de Proteína.

Cepas	Diamante	Goiasa	Clealco	Vale do Rosário	Média de Meios
Meios	PRODUÇÃO DE PROTEÍNA (g proteína produzida/kg vinho)				
3	0,1357 ^{bc}	0,1753 ^{abc}	0,2039 ^{ac}	0,1574 ^{bc}	0,1681 ^c
6	0,2966 ^{abb}	0,3027 ^{ab}	0,2817 ^{abb}	0,2566 ^{bb}	0,2844 ^b
9	0,3623 ^{aba}	0,3915 ^{aa}	0,3403 ^{ba}	0,3671 ^{aba}	0,3653 ^a
Média de Cepas	0,2649 ^{ab}	0,2898 ^a	0,2753 ^{ab}	0,2604 ^b	
Coeficiente de Variação (%)	7,39				
Teste F Cepa	*				
Teste F Meio	***				
Teste F (Regressão)	***				
Coeficiente de Regressão Quadrática (R)	+ 0,99***				

✎ Comparação das médias de Meios, Cepas e Interações C x M e M x C pelo teste Tukey (5 % de significância): letras em vermelho, comparação na horizontal e, em azul, na vertical.

✎ Níveis de significância estatística do teste F: 5 % (*), 1 % (**) e 0,1 % (***).

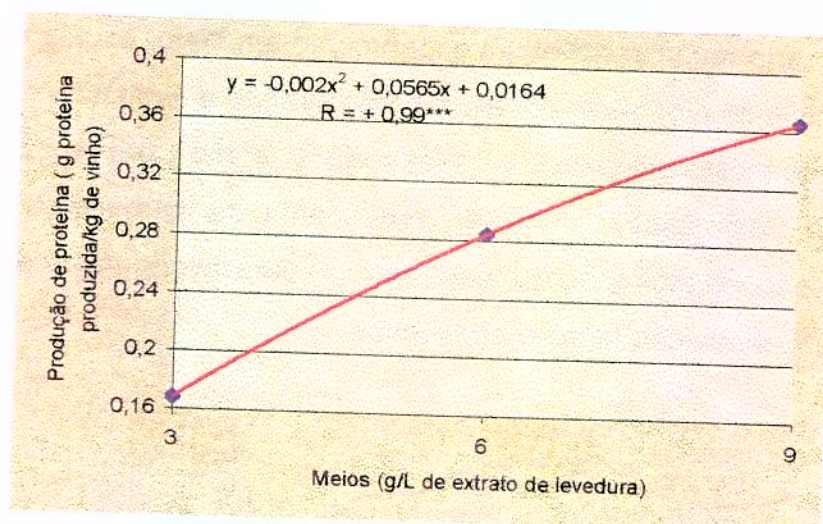


FIGURA 4.7 - Produção de proteína nos meios com 3, 6 e 9 g de extrato de levedura por litro.

4.3. AVALIAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA COM O NÚMERO DE CICLOS DE FERMENTAÇÃO.

Este experimento foi realizado com o objetivo de determinar a variação do teor de proteína com o número de ciclos em que a massa celular é reaproveitada como inóculo.

Neste experimento utilizou-se as mesmas cepas selecionadas na fase anterior, ou seja, as cepas da Usina Diamante (baixo teor de proteína), Usina Goiás (médio-baixo teor de proteína), Usina Clealco (médio-alto teor de proteína) e Usina Vale do Rosário (alto teor de proteína). Foram realizados nove ciclos de fermentação e no final de cada um destes foram coletadas amostras para serem analisadas.

As cepas utilizadas foram inoculadas no meio de fermentação padrão sintético e incubadas em shaker a 32°C, por 22 h e 150 rpm. Completadas 22h os frascos de erlenmeyeres foram retirados do shaker, pesados e de cada um deles foi retirada uma amostra de 30 mL para determinação da massa seca, sendo os 80 mL restantes centrifugados. Do sobrenadante, 40 mL foram coletados para a determinação de etanol e ART e o restante descartado. O precipitado foi utilizado como inóculo do 2º ciclo.

As células resultantes do 1º ciclo foram resuspensas com o próprio meio de fermentação do 2º ciclo, pesando-se o frasco de erlenmeyer. Este trabalho de centrifugação, coleta de amostra e inoculação do novo ciclo foi realizado em 2 h, completando 24 h do 1º ciclo. Novamente as células de levedura foram submetidas a fermentação, sendo assim iniciado o 2º ciclo. Este ciclo e os demais até o último, duraram 12 h cada um, sendo 10 h para incubação em shaker e 2 h de manipulação. A redução do período de fermentação foi feita a partir do 2º ciclo devido à maior massa de inóculo utilizada no estudo.

Neste experimento foi usado no meio de fermentação 4 ppm de antibiótico (Penicilina), em função da manipulação não estéril no reciclo do fermento, visando evitar o crescimento de bactérias que poderiam interferir nos resultados.

A evolução do teor de proteína das quatro cepas em estudo mostraram um comportamento similar, com redução do 1º até o 2º ou 3º ciclos, e teores estáveis do 3º ao 9º ciclos. Os parâmetros de Produção Específica de Etanol, Conversão de Substrato e Rendimento dos diversos ciclos são apresentados e mostram as condições de evolução do experimento (Tabelas 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15).

TABELA 4.12 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Diamante.

Ciclo	Yp/s (g et prod/ g ART cons)	Conversão de Substrato (%)	Rendimento (%)	Proteína (%)
1º	0,4596	97,79	87,93	46,61
2º	0,4771	92,21	86,06	41,18
3º	0,4541	98,51	87,52	40,32
4º	0,4720	99,35	91,76	39,14
5º	0,4553	99,98	89,07	41,08
6º	0,4784	97,14	90,93	41,06
7º	0,4768	98,56	91,83	41,04
8º	0,3799	98,50	73,22	41,86
9º	0,3938	98,58	75,95	40,92
Média Geral	0,4497	97,85	86,03	41,47

TABELA 4.13 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Goiás.

Ciclo	Yp/s (g et prod/g ART cons)	Conversão de Substrato (%)	Rendimento (%)	Proteína (%)
1º	0,4243	93,78	77,85	47,32
2º	0,4903	93,90	90,09	42,55
3º	0,5065	100,00	99,09	41,06
4º	0,4516	100,00	88,36	39,60
5º	0,4445	99,98	86,96	38,83
6º	0,4870	99,61	94,90	39,92
7º	0,5018	99,98	98,15	41,00
8º	0,4731	99,71	92,29	40,82
9º	0,4589	99,97	89,76	41,60
Média Geral	0,4709	98,55	90,83	41,41

TABELA 4.14 - Resultados (médias) nos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Clealco.

Ciclo	Yp/s (g et prod/g ART cons)	Conversão de Substrato (%)	Rendimento (%)	Proteína (%)
1º	0,4652	92,12	83,84	50,62
2º	0,4691	99,72	91,53	45,97
3º	0,4752	100,00	92,97	46,47
4º	0,4502	99,97	88,06	45,46
5º	0,4465	99,98	87,34	43,35
6º	0,4711	99,63	91,83	44,18
7º	0,4659	99,97	91,13	45,00
8º	0,4756	99,97	93,02	44,39
9º	0,4502	99,97	88,06	45,51
Média Geral	0,4632	99,04	89,75	45,66

TABELA 4.15 - Resultados (médias) dos diversos ciclos de fermentação das variáveis Produção Específica de Etanol (Yp/s), Conversão de Substrato, Rendimento e teor de Proteína para a cepa da Usina Vale do Rosário.

Ciclo	Yp/s (g et prod/g ART cons)	Conversão de Substrato (%)	Rendimento (%)	Proteína (%)
1º	0,4519	68,46	60,53	54,29
2º	0,4767	57,20	53,38	52,12
3º	0,4566	93,78	83,77	51,02
4º	0,4554	94,19	83,93	49,92
5º	0,3985	87,08	67,88	50,19
6º	0,4635	82,76	75,05	50,18
7º	0,4854	89,76	85,08	50,17
8º	0,4378	91,12	78,28	50,07
9º	0,4068	99,08	78,85	51,07
Média Geral	0,4481	84,83	74,08	51,00

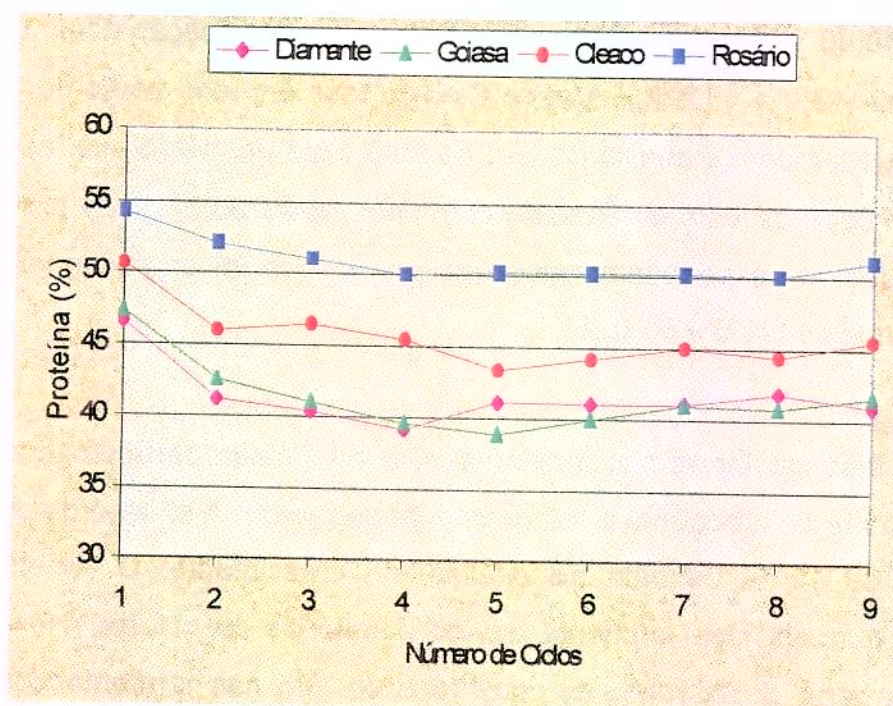
Os teores de proteína observados neste experimento não se enquadram perfeitamente com aqueles obtidos nos demais experimentos, ou seja, as cepas apresentaram no primeiro ciclo um teor de proteína um pouco mais elevado (cerca de 9 %, em média) que aquele determinado para caracterização das cepas nos grupos de baixo a alto teor em proteína (Figura 4.8). O teor de proteína médio do 3º ao 9º ciclo, das cepas Goiasa e Clealco também se diferenciaram daquele característico, mostrando teores inferiores (cerca de 8%, em média). Como a única alteração observada nas condições experimentais foi a introdução de penicilina no substrato de fermentação, visando auxiliar no controle de contaminações bacterianas que pudessem ocorrer devido a manipulação da massa celular em cada reciclo. Uma hipótese é que estes resultados estejam sendo afetados pela presença da penicilina, induzindo um maior teor de proteína de forma direta, ou indireta, alterando outros componentes na massa celular.

A cepa da Diamante apresentou um teor de proteína médio do 3º ao 9º ciclo de 40,77 %, que a inclui no grupo das leveduras com baixo teor de proteína, como havia sido classificada anteriormente. A cepa da Goiasa, do 3º ao 9º ciclo, apresentou uma média de 40,40 % que a colocaria abaixo de sua classificação como cepa média-baixa em proteína (43,0 a 45,9 %). A cepa Clealco teve um teor médio do 3º ao 9º ciclo, de 44,91 % que também é abaixo do teor de uma cepa de médio-alto teor protéico (46,0 a 48,9 %). A cepa da Vale do Rosário com uma média 50,37 % de proteína do 3º ao 9º ciclo, enquadrou-se perfeitamente no grupo em que foi originalmente classificada de alto teor protéico (49,0 a 51,0 %).

Em fase celular de não proliferação, onde a maior parte do açúcar é fermentado, a necessidade de nitrogênio é relativamente pequena. A síntese de proteínas se reduz a menos de 10 % daquela de células em crescimento. O reciclo ("turnover") de proteínas naquela fase, aumenta devido à autólise de células (Henschke & Jiranek, 1994) . A partir deste relato e, considerando que nas fermentações com reciclo de células ocorre proliferação reduzida de levedura, pode ser esperado que os teores de proteína nas células sejam reduzidos em relação ao primeiro ciclo de fermentação.

A cepa da Vale do Rosário, também neste experimento, teve confirmada as suas características de cepa com baixa Produção Específica de Etanol, Conversão de Substrato e Rendimento na Fermentação, lembrando que o substrato fermentativo foi preparado com 6 g/L de extrato de levedura.

FIGURA 4.8 - Teor de proteína na massa celular seca de 4 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, em fermentação com reciclo de fermento.



4.4. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNA NA MASSA SECA OBTIDA DE LEVEDURA

A prática industrial utilizada para enriquecer as células de levedura em proteína tem sido manter a suspensão de células, recuperadas da fermentação alcoólica recém terminada, em uma temperatura de cerca de 40°C, provocando assim o estresse e consumo de carboidratos de reserva das mesmas com aumento relativo do teor de proteína. Devido ao consumo de açúcares endógenos esta fermentação é chamada de fermentação endógena. Com este experimento buscou-se avaliar esta prática, e também verificar sua ação sobre as cepas que apresentam diferentes teores de proteína.

A viabilidade da fermentação endógena deve ser determinada pelo acréscimo ao preço do produto em função do teor protéico e pela quantidade de massa celular seca obtida com esta técnica, de modo a cobrir os custos envolvidos e a obtenção de um produto com melhor aceitação e demanda no mercado.

Neste ensaio as cepas das Usinas Diamante, Goiasa e Vale do Rosário, respectivamente com teores de proteína baixo, médio-baixo e alto foram submetidas a fermentação, convencional e endógena. O experimento foi monitorado pelas análises de massa seca (na fermentação convencional e no processo de enriquecimento) e proteína na massa seca (na fermentação convencional e no processo de enriquecimento).

Na 1ª parte deste experimento as cepas foram submetidas a fermentação convencional, em meio sintético com 6 g/L extrato de levedura, sendo vinte frascos de erlenmeyeres preparados para cada cepa de forma a obter uma

quantidade adequada de biomassa para a condução da fermentação endógena. Ao final da fermentação, quando praticamente todo o açúcar foi consumido, o vinho fermentado foi centrifugado. Todos os precipitados eram recolhidos em um único béquer, e homogeneizados. Desta massa de células, denominada de massa úmida, foram recolhidas cerca de 3 g para determinação da massa seca e posterior análise do teor de proteína. Da massa úmida restante cerca de 20 g foram transferidas para frasco de erlenmeyer e ressuspensa em 200 mL de vinho delevurado homogeneizado, proveniente da fermentação alcoólica. O pH foi ajustado para 4,5 com solução diluída de ácido sulfúrico.

Este material foi incubado em shaker a 40°C, conduzindo-se a fermentação endógena, por um período de 7h em rotação de 150 rpm (para evitar a decantação das células).

Ao final do experimento as amostras de massa seca obtidas, tanto do meio fermentativo (temperatura de 32°C por 24 h) quanto daquele em que as células foram expostas a fermentação endógena (temperatura de 40°C, pH 4,5 e por 7h), foram submetidas a análise do teor de proteína. Este experimento foi repetido três vezes e os resultados estão mostrados na Tabela 4.16.

De acordo com Basso et al. (1993) e Ferreira (1998) ao final da fermentação alcoólica a levedura apresenta açúcares de reserva acumulados, que em grande parte são consumidos pela fermentação endógena na primeira hora de fermentação. Basso et al. (1993) mostrou que o nitrogênio presente no fermento apresentou uma elevação de 12 % em 8 h, atingindo 16 % em 24 h e descendo ao nível inicial em 48 h.

Observando os teores de proteína apresentados na Tabela 4.16, verifica-se um aumento dos teores de proteínas celulares, nas cepas das Usinas Diamante, Goiasa e Vale do Rosário, de 41,33 para 50,79 %, de 45,24 para 55,65 % e de 52,91 para 61,06 %, respectivamente, com acréscimos de 22,9, 23,0 e 15,4 %.

Ferreira (1998) estudando fermentação endógena com leveduras isoladas das Usinas da Pedra e Vale do Rosário, verificou acréscimos no teor de proteína, após 7 h de fermentação, de 32,6 e 31,5 %, para aquelas cepas, cujos teores iniciais de proteína eram de 36,8 e 35,6 %, respectivamente. Esse autor também verificou que o tempo ótimo para o término da fermentação endógena variou de 6 a 8 h, em pH 4,5 e temperatura de 40°C.

Ferreira (1998) também apresenta dados que mostraram que após 7 h de fermentação endógena a quantidade de fermento seco obtida foi reduzida em relação a inicial, em vários experimentos realizados em 18 a 29 % e 24 a 44 % para as cepas isoladas das Usinas da Pedra e Vale do Rosário, respectivamente.

Reed (1982) destaca que na fermentação endógena, a quantidade total de proteína não se altera, mas que sua porcentagem relativa nos sólidos celulares é que aumenta. A biomassa apresenta um aumento protéico de 13 % e redução de 40 % nos carboidratos.

No decorrer da fermentação endógena a elevação do teor de proteína observado na célula de levedura é um aumento relativo devido ao consumo dos carboidratos de reserva que são transformados em álcool. A partir de determinado período as células se rompem liberando o citoplasma no meio (Basso & Amorim,

1989a, Basso & Amorim, 1991 e Basso et al., 1993), permitindo deduzir-se que, ao longo da fermentação endógena deve haver uma redução na massa celular de levedura.

Os resultados (Tabela 4.16) mostraram que o processo de fermentação endógena de fato tende a reduzir a massa celular seca de levedura, o que por certo influi na viabilização da condução deste processo, uma vez que não se observa ganho na quantidade de proteína produzida.

A massa de levedura seca nas cepas das Usinas Diamante, Goiás e Vale do Rosário foram reduzidas em proporções entre 19,4 a 23,8 %, com 7 h de fermentação endógena. Assim, embora os teores de proteína tenham aumentado de 15,4 a 23,0 %, a quantidade de proteína produzida foi reduzida de cerca de 1 a 12 %. As três cepas responderam de forma similar ao tratamento com fermentação endógena não havendo indícios de comportamento diferencial considerando seus diferentes teores de proteína. Deste modo, se o acréscimo no preço devido ao maior teor de proteína não for suficientemente compensador, o resultado financeiro pode significar a inviabilidade econômica da condução da fermentação endógena.

Por outro lado, Ferreira (1998) em suas conclusões destaca que com a fermentação endógena, nas condições dos ensaios conduzidos, podem ser produzidos até 68 L de álcool/t de levedura seca e com um acréscimo relativo de 30 % de proteína no fermento.

A viabilidade da fermentação endógena deve portanto ser considerada frente a avaliação de 4 fatores básicos: o álcool originado, o incremento no teor

de proteína das células, a valorização no preço do produto, e finalmente a quantidade de levedura seca resultante. Com relação ao álcool produzido, admitindo uma sangria média de 30 g de levedura/L de álcool produzido, e a produção média de 50 L de álcool/t de levedura seca, verifica-se que o álcool originado da fermentação endógena representa ao redor de 0,15 % da produção de uma destilaria. Ou seja, aproximadamente 150 L de álcool para cada 100.000 L produzidos. Assim, frente ao pequeno impacto do álcool obtido como subproduto da fermentação endógena, a viabilidade desta não deve contemplar esse subproduto.

Com relação ao mercado verifica-se atualmente que os preços não mantêm uma relação direta com a qualidade da levedura seca, isto é, com seu teor de proteína. Provavelmente isto pode estar ocorrendo em vista da levedura seca ser um produto ainda de baixa oferta no mercado e disponibilizada sazonalmente o que limita o interesse do mercado consumidor.

Em consulta à ICC - Comércio, Exportação e Importação Ltda (1999) que comercializa levedura seca de fermentação alcoólica sob a marca Nutricell, o preço de venda informado variava numa ampla faixa, sem definição precisa quanto à correspondência entre o preço e o teor de proteína das células, indicando que o preço de venda pela ICC varia conforme a disponibilidade sendo o preço negociado com os produtores de levedura seca. O preço médio atualmente pago pela ICC está ao redor de R\$ 300,00 (trezentos reais) a tonelada de levedura seca de fermentação alcoólica contendo 40 % de proteína; os preços para esta levedura oscilam entre R\$ 250,00 a R\$ 350,00. Para a levedura seca proveniente de cervejaria foi informado um preço médio de R\$ 600,00, tendo também 40 % de proteína; há leveduras de cervejaria com teores

mais elevados de proteína, entre 45 - 48 %. Esses preços foram coletados em outubro de 1999, com valor do dólar cotado a R\$ 1,95.

TABELA 4.16 - Resultados de médias de teor de proteína na massa celular, produção de massa seca e proteína (fermentação convencional e fermentação endógena) nas cepas das Usinas Diamante, Goiás e Vale do Rosário.

Cepas	Massa Seca (g/kg de vinho)	
	Fermentação Convencional	Fermentação Endógena (7h)
Diamante	8,66	6,98
Goiás	7,43	5,46
Vale do Rosário	5,43	4,14

Cepas	Proteína (g/kg de vinho)	
	Fermentação Convencional	Fermentação Endógena (7h)
Diamante	3,58	3,55
Goiás	3,36	3,04
Vale do Rosário	2,87	2,53

Cepas	Proteína na Massa Celular Seca (%)	
	Fermentação Convencional	Fermentação Endógena (7h)
Diamante	41,33	50,79
Goiás	45,24	55,65
Vale do Rosário	52,91	61,06

Segundo informações colhidas junto à Usina Santo Antônio (Sertãozinho/SP) (julho/99), o teor médio de proteína na levedura seca comercializada por essa Usina está ao redor de 40 %, sendo que a secagem é realizada em spray-drier. Foi ainda relatado que na região o teor médio é de 32

%, havendo até mesmo produtos com 28 % e que o valor da tonelada do produto com 40 % de proteína fica em torno de R\$ 300,00 e o de 32 % ao redor de R\$ 250,00.

Considerando valores praticados pelo mercado de R\$ 300,00 a tonelada de levedura seca com 40 % de proteína, verifica-se que o preço por kg de proteína é de R\$ 0,75. Admitindo, para efeito de macro avaliação, que com a fermentação endógena o teor de proteína seja elevado para 50 % e a produção de massa seca seja reduzida em 20 %, conclui-se que para obter o mesmo resultado financeiro a tonelada de levedura deveria ser cotada a R\$ 375,00. Mas se deve ainda considerar os custos de produção, maior incidência proporcional de impostos, custos de ensaque e armazenamento e, taxa de retorno, frente a isto, deve-se estimar uma remuneração mínima para essa levedura entre R\$ 410,00 a R\$ 430,00.

O preço alcançado pela levedura seca proveniente da fabricação de cerveja mostra que o mercado poderia contemplar, com melhores preços o produto oriundo da fermentação alcoólica, o qual por sua vez deveria apresentar melhor qualidade e armazenamento pelas destilarias de modo a garantir o suprimento durante todo o ano, tal como a levedura de cervejaria.

Assim, para avaliar a viabilidade da prática industrial da fermentação endógena deve ser verificado, nas condições operacionais de cada destilaria, qual o balanço efetivo entre a maior proporção de proteína nas células e a quebra na produção de massa seca celular resultante.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados analíticos obtidos, a análise estatística dos dados e discussão, as seguintes conclusões são evidenciadas nas condições circunscritas ao estudo:

- as leveduras predominantes na fermentação alcoólica das destilarias estudadas, cultivadas em meio sintético padrão, apresentam uma ampla variação no teor de proteína, apresentando valores entre 39 a 51 %, e indicando ser esse teor uma característica da linhagem de levedura;
- a oferta de fonte de nitrogênio complexa, como o extrato de levedura, influenciou marcadamente o rendimento em etanol, massa celular e outros parâmetros da fermentação alcoólica, mesmo na presença de fonte de nitrogênio mineral não limitante, em leveduras de baixo a alto teor de proteína;
- a oferta de fonte de nitrogênio protéico complexa não alterou os níveis de proteína em leveduras de baixo a alto teor de proteína. Contudo, os níveis de extrato de levedura causaram a elevação da produção de biomassa celular, mostrando sua influência direta até na concentração de 9 g de extrato de levedura por litro de meio, e mesmo em presença de fonte de nitrogênio mineral não limitante;
- em relação ao meio com 3 g/L de extrato de levedura, a presença de 6 g/L conduziu ao aumento, no Rendimento da fermentação e Produção de Biomassa, de cerca de 50 e 68 %, mesmo na presença de fonte de nitrogênio amoniacal não limitante. Com 9 g/L esses aumentos foram de cerca de 65 e 125 %.

- a fermentação com reciclo de células mostrou haver um decréscimo inicial no teor de proteína da célula, até o 2º - 3º ciclos, e que se estabiliza em seguida;
- a fermentação endógena influi reduzindo a quantidade de levedura seca produzida, o que em conjunção com os teores de proteína obtidos, mantiveram a quantidade de proteína produzida inalterada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABRAMOV, S. A.; ÉFENDIEVA, D. A.; KOTENKO, S. T. Effect of the growth medium on the protein content of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 30, n. 2, p. 225-227, 1994.
02. AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLS N. F. E. **Engenharia Bioquímica**. 1971. Cap. 2: p.16-42.
03. ALMEIDA, J. R. Processo de recuperação de leveduras. In: Almeida , J. R. **Curso sobre fermentação alcoólica**. Piracicaba, Instituto Zimotécnico/ESALQ, 1960. v. 2, p.254-262.
04. AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. Fermentação endógena com a levedura JA-1. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Departamento de Química, ESALQ/USP. Piracicaba. n.14, p. 62-70, 1994.
05. ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB**, Piracicaba, v.13, n.4, p.22-24, 1995.
06. AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) - **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists**. Washington, D.C., 1984.
07. BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Estudos dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, no transcorrer da fermentação e durante o reciclo do fermento. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Departamento de Química, ESALQ/USP. Piracicaba. n. 9, p.39-40, 1989a.

08. BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Efeito da temperatura sobre os teores de glicogênio e trealose no transcorrer da fermentação. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Departamento de Química, ESALQ/USP. Piracicaba. n. 9, p. 51-52, 1989b.
09. BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Fermentação da trealose endógena. Efeito da temperatura. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Departamento de Química, ESALQ/USP. Piracicaba. n. 11, p. 57-59, 1991.
10. BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; BERNARDINO, C. D. Fermentação da trealose e do glicogênio endógenos. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Departamento de Química, ESALQ/USP. Piracicaba, n. 13, p. 1-10. 1993.
11. BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H. V. **Processos de produção de álcool**. Piracicaba: ESALQ/USP. 1996. cap. 4: p. 38-85.
12. BERKE, H. L.; ROTHSTEIN, A. The metabolism of storage carbohydrates in yeast, studied with glucose-1-C¹⁴ and dinitrophenol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 72, p. 380-395, 1957.
13. BURR, G.O.; TAKAHASHI, D. Absorption and distribution of nutrients in sugarcane. Part I: Nitrogen. **Hawaiian Planters Record**. v. 55, n. 1, p. 3-10, 1955.
14. BUTOLO, J. E. Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: Propriedades, custo relativo a outras fontes de nutrientes. **Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**. Campinas, 1996. p.70-89.

15. CABEZAS, W. A. R. L.; TRIVELIN, P. C. O.; SILVEIRA, J. A. G. Distribuição de $^{15}\text{N}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ complementado no processo de fermentação etanólica nas frações de N-insolúvel e N-solúvel. **STAB**, Piracicaba. v. 9, n. 12, p. 41-44, 1990.
16. CHESTER, V. E. The dissimilation of the carbohydrate reserves of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 86, p.153-160, 1963
17. CLIFFORD, A. J.; STORY, D. L. Level of purines in foods and their metabolic effects in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.106, n.3, p. 435-442, 1976.
18. COZZOLINO, S. M. F. **Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*: Estudos em gerações sucessivas de ratos**. São Paulo, 1982. 147p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
19. CROWE, J. H.; O'DEIL, S. J.; ARMSTRONG, D. A. Anhydrobiosis in nematodes: permeability during rehydration. **Journal of Experimental Zoology**, v. 297, p. 431, 1979.
20. DESMONT, R. Utilização do lêvedo na alimentação da criança. **Pediatria Prática**. São Paulo, 1968, v. 39, p.7-18.
21. DUARTE, M. C. T. **Efeito da lecitina e do óleo de soja sobre o desempenho fermentativo e a reserva de carboidrato em *Saccharomyces uvarum* IZ 1904**. Rio Claro, 1994. 179p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, UNESP.

22. FAO/WHO/ONU. **Energy and protein requeriments**. Report of the joint FAO/WHO/ONU. Expert Consultation Technical Report. Series n. 724, FAO/WHO/ and the United Nations University, Geneva, 1985.
23. FERREIRA, V. L. **Fermentação de Trealose e Glicogênio Endógenos em *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 1998. 125p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) - ESALQ/USP.
24. FIALHO, E. T., GOMES, P. C.; ALBINO, I. F. T.; COSTA, V. Determinação dos valores de composição química e de digestibilidade de alguns ingredientes nacionais para suínos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 12, n. 2, p.337-356, 1983.
25. FURCO, A. M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. **Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**, Campinas, p.52-58, 1996.
26. GAMBIRÁSIO, A. Fermentos auxiliam indústria. **Química e Derivados**. v. 2, n. 16, p.43-46, 1967.
27. GRBA, S.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. On the formation of glycogen and trealose in baker's yeast. **European Journal Applied Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 29-37, 1975.
28. GUTIERREZ, L. Z. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica – Parte 2. **Anais da ESALQ/USP**, Piracicaba, v. 47, p. 597-608, 1990.

29. GUTMAN, A. B.; YU, t. Uric acid metabolism in normal man and in primary gout. **New England Journal of Medicine**. Waltham, v.29, n.5, p. 252-260, 1965.
30. HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Chemical composition and biochemistry of yeasts biomass**. Boca Raton: Academic Press, 1991, 312p.
31. HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. Yeasts - Metabolism of nitrogen compounds. In: **Wine Microbiology and Biotechnology**. FLEET, G. H. ed. Suissa: Harwood Academic Publishers, 1994, 510p.
32. HONIG, P. **Principles of Sugar Technology**. In: Honig, P. Amsterdam: Elsevier, 1963, v. 3, 523 p.
33. HSE, W. Protein from sugar of Taiwan. **Sugar & Azucar**, v. 56, n. 7, p. 33-36, 1961.
34. JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, v. 16, p. 42-49, 1981.
35. JORGENSEN, A. **Microbiologia de las fermentaciones industriales**. Zaragoza: Acribia, 1959. 591p.
36. KANECO, H.; HOSOHARA, M.; TANAKA, M.; ITON, T. Lipid composition of 30 species of yeasts. **Lipids**, v. 11, n. 12, p. 837, 1976.
37. KIHLEBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.26, n.4, p.426-465, apr., 1972.

38. KINSELLA, J.E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for food uses : methods for isolation. In: Marcel Dekker ed. **Food Biotechnology**, Dietrich Knorr, New York . 1987. Cap. 14: p.363-391.
39. KRIDER, J. L.; CARROL, W. E. **Swine Production**. 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 1971, 528p.
40. KUENZI, M. T.; FIECHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 84, p. 254-265, 1972.
41. LABUZA, T. P.; JONES, K. A.; SINSKEY, A. J.; GOMEZ, R. WILSON, S.; MILLER, B. Effect of drying conditions on viability and functional properties of single-cell protein. **Journal of Food Science**, v. 37, n. 1, p. 103-107, 1972.
42. LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J. A., ROSSELL, C. E. V. Estudos da otimização da Recuperação de biomassa de levedura em destilarias. **Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**. Campinas, 1996, p.5 9-67.
43. LEE, C. W.; CHANG, H. N. Kinetic of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 1105 - 1112, 1987.
44. LEWIS, M. T.; KUIPER, H. A. Effect of growth temperature and glucose on thermal injury of *Saccharomyces calshbergensis*. **Journal of Institute Brewing**, v. 78, n. 5, p. 465-471, 1972.

45. LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 143, p. 1384-1394, 1980.
46. LIMA, G. J. M. M. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação**. Piracicaba, 1983. 139p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/Universidade de São Paulo.
47. LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 27, p. 280-285, 1984.
48. MARKS, J. **A guide to the vitamins**. Lancaster, 1975, 208p.
49. MATELES, R. I.; TANNENBAUM, S. R. **Single-cell protein**. Massachussets: MIT Press, 1968. 480p.
50. MIYADA, V. S. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento**. Piracicaba, 1978. 106p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/Universidade de São Paulo.
51. MOREIRA, J. R. A. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar em rações isocalóricas para suínos em crescimento e acabamento**. Piracicaba, 1984. 107p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/Universidade de São Paulo.
52. NOBREGA, F. J. **Desnutrição intra-uterina e pós-natal**. 2. ed. São Paulo: Panamed, 1985, 567p.

53. OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Microbial biomass as a protein source. In: JOHN BU'LOCK; BJORN KRISTIANSEN. **Basic Biotechnology**. London: Academic Press, 1987. p. 285-308.
54. ORELLI, V. F. M.; AMORIM, H. V.; ORELLI JÚNIOR, A. A.; OLIVEIRA, A. J. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por levedura. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 170-178, 1991.
55. PACHECO, M. T. B. Levedura como fonte de proteína: extração, isolamento, propriedades nutritivas e funcionais. **Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**. Campinas, 1996, p.5-14.
56. PANEK, A. D. **Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae***. Rio de Janeiro, 1975. 115p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
57. PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry**. Amsterdam: Elsevier, 1969, 274p.
58. PEPPLER, H. J. Food Yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. eds. **The Yeasts**. London: Academic Press, 1970, Cap. 8: p. 421-457.
59. PEPPLER, H. J. Production of yeasts and yeast products. In: PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D. eds. **Microbial Technology**, Academic Press, 1979. v. 1, 157p.

60. PEZZATO, A. C. Utilização de levedura na alimentação de monogástricos: I Aves. In: **Simpósio sobre aproveitamento de los subproductos de la agroindustria em la alimentación animal**, Botucatu, 1985, p. .
61. PINOTTI, R. F. Ração: Um novo subproduto da cana. **Revista Meios e Métodos**, n. 39, p. 10-12, 1983.
62. PINOTTI, R. F. Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool. **STAB**, v. 10, n. 1, p. 34-35, 1991.
63. PORTER, L. J.; OUGH, C. S. The effects of ethanol, temperature, and dimethyl dicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet nº 522 in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 4, p. 222-228, 1982.
64. QUAIN, D. E. Studies yeast physiology-impact on fermentation performance and product quality. **Journal Institute Brewing**, v. 95, n. 5, p. 315-323, 1988.
65. REED, G. Microbial biomass , single-cell protein, and other microbial products. In: REED, G. **Prescott & Dunn's Industrial Microbiology**. 4. ed., Westport: AVI, 1982, p.541-592.
66. REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast Technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 378p.
67. REVILLA, J. L. G. Levadura *Saccharomyces*. **Manual de los derivados de la caña de azucar**. Colección GEPLACEA, Mexico. 1990, p. 266 - 270.

68. RHEIBOLDT, P. H. H.; LEIMER, K. H. & ROSSELL, C. E.V. Sangria e secagem de levedura de destilaria – processo Copersucar. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 4., 19, **Anais**. 1987, p. 589-593.
69. RODRIGUES, M. I.; ANDRIETTA, M. G. S. **Controle da fermentação alcoólica através de testes microbilógicos e bioquímicos**. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 1995. 54p. (Curso de Extensão).
70. RODRÍGUEZ, C. W.; VALDÉS, P.; MARTÍNEZ M. Los carbohidratos y las proteínas solubles de la canã de azúcar en diferentes etapas de su crecimiento. **Ciencias de la Agricultura**, Academia de Ciencias de Cuba, n. 24, p. 55-61, 1985.
71. ROSE, A. H.; HARRISON, J. N. **The yeasts**. London: Academic Press, 1970, v. 3, 423p.
72. ROUSSEAU, S.; ROULEAU, D.; YERUSHALMI, L.; MAYER, R. C. Effect of temperature on fermentation kinetcs of waste sulphite liquor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Chemical technology and Biotechnology**, v. 53, p. 285-291, 1992.
73. SÁ-CORREIA, I. ; VAN UDEN, N. Temperature profiles of ethanol tolerance: Effects of ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth oh the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology and Bioengeneering**., v.25, p. 1665, 1983.

74. SALGADO, J. M. **Alguns fatores que afetam a qualidade do concentrado protéico obtido em destiladores de álcool.** Piracicaba, 1976. 102p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/ Universidade de São Paulo.
75. SARWAR, G.; SHAH, B. G.; MONGEAU, R.; HOPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal Food Science**, Chicago, v. 50, n. 2, p.353-357, March-April, 1985.
76. SERRA, G. E. **Efeitos da Adubação Fosfatada sobre Algumas Características Agro-Industriais do Caldo de Cana-de-Açúcar, Variedade CB 41-76.** Tese (Doutor em Ciências). Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu. 104 p., 1973.
77. SHARMA, S. C.; JOHARY, P. C. Amino-acid removal during cane juice clarification. **International Sugar Journal**, v. 86, n. 1021, p. 7-11, 1984.
78. SLAPACK, G. E.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. **Thermophilic microbes in ethanol production.** Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 99-107.
79. STROPPIA, C. T. **Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos /UNICAMP, 1998, 71p.
80. SU, K.; HSIE, M.; LEE, H. C. Amino acid composition of various yeasts prepared from cane molasses. In: Congr. Int. Soc. Sug. Cane Technol., 13., Taiwan, 1968. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier, 1969. p.1934-1942.

81. SUOMALAINEN, H.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrates reserves of baker's yeast during growth and on standing. **Journal of Institute Brewing**, v. 67, p. 249-254, 1961.
82. SUOMALAINEN, H.; OURA, E. Yeast nutrition and solute uptake. In: ROSE, A. A.; HARRISON, J. S. **The yeast**. 3. ed. London: Academic Press, v. 2, cap. 2, p. 127-144, 1971.
83. TEIXEIRA, C. G. Composição do fermento alcoólico: nutrição e fatores de crescimento. In: ALMEIDA, J. R. *et al.*- **Curso sobre fermentação alcoólica**. Piracicaba. Instituto Zimotécnico da Universidade de São Paulo, 1960, v. 1, Cap. 5. p. 85-102.
84. THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effect of high product and substrate inhibitions on kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 40, p. 289-297, 1992.
85. TUSÉ, D. SCP: Current status and future prospects. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 19, n.4, p. 273-325, 1984.
86. VANANUVAT, P.; KINSELLA, J. E. Amino acid composition of protein isolates from *Saccharomyces fragilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 23, n. 3, p.595-597, May-June, 1975.
87. VASCONCELOS, J. N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. **Brasil Açucareiro**. v. 105, n. 1, p. 41-48, 1987.

88. VIEGAS, M. C. **Desenvolvimento de um reator de bancada de leite fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras flocculantes.** Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, 1999, 86p.
89. WASLIEN, C. I. Unusual sources of proteins for man. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.6, n.1, p.77-151, June, 1975.
90. WIGGINS, L. F. No-azucres nitrogenados (los aminoacidos y las proteinas). In: HONIG, P. **Principios de Tecnologia Azucarera**. 1969, v. 1, cap. 5, p.155-172.

Errata

Página 19, 2º parágrafo, penúltima linha

Onde se lê: ...prevenir a desidratação, haver necessidade de aumentar a rigidez da membrana.

Leia-se: ...prevenir a desidratação, sem haver necessidade de aumentar a rigidez da membrana.

Página 47, 1º parágrafo, 2ª linha

Onde se lê: O teor portanto varia entre 6,0 a 10,0 g/L entre os autores citados.

Leia-se: O teor de Nproteico varia de 6,0 a 10,0 g/L de extrato de levedura entre os diversos autores citados.

Página 54

Onde se lê: $VCS = \frac{ART \text{ cons} \times 100}{\text{massa mosto} \times 24}$

Leia-se: $VCS = \frac{ART \text{ cons} \times 1000}{\text{massa mosto} \times 24}$

Página 62, 1º parágrafo: desconsiderar última frase.

Página 63, 2º parágrafo, 2ª linha

Onde se lê: ...capacidade fermentativa de - 12 e - 4.

Leia-se: ...capacidade fermentativa de + 1 e + 43.

Página 69, 7ª linha

Onde se lê: Todavia, mesmo em meio com 9 g/L esta cepa apresentou valor menor de etanol no

vinho em relação às demais cepas em meio com 6 g/L.

Leia-se: Todavia, diferentemente das demais cepas esta em meio com 9 g/L apresentou valor menor de etanol no vinho em relação ao meio com 6 g/L.

Página 71, Tabela 4.5, Etanol no Vinho

Onde se lê: Coeficiente de Regressão Quadrática (R) + 1,00

Leia-se: Coeficiente de Regressão Quadrática (R) + 1,00

Página 74, 1º parágrafo, 6ª linha

Onde se lê: ...Rendimento de 61.65 %.

Leia-se: ...Rendimento de 65.61 %

Página 101, referência nº 14

Onde lê-se: ...Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal. Campinas, 1996. p.70-89.

Leia-se: ...In: Workshop "Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal". Anais. ITAL. Campinas, 1996. p.70-89.

Página 103, referência nº 25

Onde lê-se: ... Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal. Campinas, 1996. p. 52-58

Leia-se: ...In: Workshop "Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal". Anais. ITAL. Campinas, 1996. p. 52-58.

Página 105, referência nº 42

Onde lê-se: ... Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal. Campinas, 1996. p. 59-67.

Leia-se: ...In: Workshop "Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal". Anais. ITAL. Campinas, 1996. p. 59-67.

Página 107, referência nº 55

Onde lê-se: ... Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal. Campinas, 1996. p. 5-14.

Leia-se: ...In: Workshop "Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal". Anais. ITAL. Campinas, 1996. p. 5-14.

Página 108, referência nº 60

Onde lê-se: ... In: Simpósio sobre aproveitamento de los subproductos de la agroindustria em la alimentación animal, Botucatu, 1985. p.

Leia-se: ... In: Simpósio sobre aproveitamento de subprodutos da agroindustria na alimentação animal, 1. Semana de Zootecnia, 4, 1985, Botucatu. Anais... Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, 1985. p.37-55

Página 109, referência nº 68

Onde lê-se: ...In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 4., 19., Anais. 1987. p. 589-593

Leia-se: ... In: IV CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 19., Anais. 1987. p. 589-593.

Página 112, referência nº 90

Onde lê-se: ... Principios de Tecnologia Azucarera. 1969, v.1, cap 5, p.155-172.

Leia-se: ... Principios de Tecnologia Azucarera. Mexico: Continental. 1969. v.1, cap 5, p.155-172.