

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO DO SETOR SUCROENERGÉTICO – MTA**

**DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES GLOBAIS DE CONVERSÃO DE  
SUBSTRATOS EM CÉLULAS E PRODUTOS DURANTE A PROPAGAÇÃO DE  
LEVEDURAS NUMA USINA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL  
-ESTUDO DE CASO-**

**DEMÉTRIUS BARBOSA DE FREITAS**

**Catanduva, SP**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO DO SETOR SUCROENERGÉTICO – MTA**

**DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES GLOBAIS DE CONVERSÃO DE  
SUBSTRATOS EM CÉLULAS E PRODUTOS DURANTE A PROPAGAÇÃO DE  
LEVEDURAS NUMA USINA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL  
-ESTUDO DE CASO-**

**DEMÉTRIUS BARBOSA DE FREITAS**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Gestão do Setor  
Sucroenergético – MTA.  
Aluno: Demétrius Barbosa de Freitas  
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

**Catanduva, SP**

**2012**

***Dedico este Trabalho de Conclusão de  
Curso à Irene, minha mulher.***

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus irmãos em Deus que nos inspiraram;

Aos meus pais, José e Yolanda que me educaram;

Aos meus filinhos pelas preces;

Aos companheiros de trabalho pelo apoio técnico;

Ao pessoal da fermentaria e dos laboratórios da Usina pela dedicação;

Aos professores do MTA em especial ao Dr. Reinaldo Gaspar Bastos pelas aulas motivadoras;

Ao Prof. Vico pelo apressado com o MTA da UFScar;

Ao Espírito do Professor Eurípedes Barsanulfo pelo exemplo deixado de simplicidade;

Aos acionistas da Usina Alta Mogiana S.A – Açúcar e Álcool pela bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.1 Fermentadores.....	8
4.2 Procedimentos industriais preliminares.....	9
4.3 Inóculo.....	10
4.4 Preparação do Mosto.....	10
4.5 Inoculação e Fermentações.....	12
4.5.1 Inoculação do levedo pelas cubas.....	12
4.5.2 Propagação do levedo pelas Dornas.....	14
4.5.3 Tratamento do Fermento.....	15
4.6 Determinações analíticas.....	19
4.7 Cálculos dos parâmetros de fermentação.....	20
4.8 Resultados e Discussões.....	22
5. CONCLUSÃO.....	28
6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resultados microbiológicos encontrados no vinho fermentado de viabilidade celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – média diária por dorna.....	16
Figura 2 – Resultados microbiológicos encontrados de brotamento celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> do vinho fermentado – média diária por dorna.....	17
Figura 3 – Resultados microbiológicos encontrados de bastonetes/ml contados ao microscópio ocular em amostras de vinho fermentado – média diária por dorna.....	18
Figura 4 - Valores obtidos de Crescimento Celular ( $R_x$ ) versus Formação de Produto ( $R_p$ glicerol) durante a propagação do fermento em 20 fermentações em planta industrial.....	22
Figura 5 - Valores obtidos de Formação de Produto ( $R_p$ glicerol) versus Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.....	23
Figura 6 – Valores de Produtividade em levedura seca expressos em kg de leveduras seca/h versus Substrato alimentado expresso em kg de AT alimentado/h durante o período de propagação do levedo.....	24
Figura 7 - Valores de Produtividade em etanol expressos em kg de etanol/h versus Substrato alimentado expresso em kg de AT alimentado/h durante o período de propagação do levedo.....	24
Figura 8 - Valores obtidos de Rendimento relativo ( $Y_{p/x}$ ) expresso em g de etanol/g de levedura seca versus Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ etanol) expresso em g de etanol produzido/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.....	25

Figura 9 - Valores obtidos de Rendimento relativo ( $Y_{p/x}$ ) expresso em g de etanol/g de levedura seca <i>versus</i> Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.....	25
Figura 10 - Valores obtidos de Tempo de Geração expresso em hora <i>versus</i> AT % mosto expressos em % m/v durante o período de propagação do levedo.....	26
Figura 11- Resultados obtidos do Rendimento Fermentativo em etanol expresso em g etanol/0,5111 g etanol <i>versus</i> Tempo de Geração da levedura expresso em hora, durante o período de propagação do levedo.....	26
Figura 12 - Valores de Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ - etanol) expresso em g de etanol produzido/g AT <i>versus</i> Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ glicerol) expresso em g de glicerol produzido/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.....	27
Figura 13 - Valores de Produtividade em levedura seca expressos em kg de leveduras seca/h <i>versus</i> Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.....	28
Figura 14 – Valores Substrato alimentado expresso em kg de AT alimentado/h <i>versus</i> coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato e Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ etanol) expresso em g de etanol produzido/g AT consumido.....	28
Figura 15 - Laudo analítico comprobatório da levedura selecionada FT 1255 L usada como inóculo na propagação do levedo juntamente com mais duas linhagens dominantes da Usina Alta Mogiana.....	33

Figura 16 – Análise de cariotipagem das leveduras selecionadas após 17 dias de inoculadas na propagação do levedo da Usina Alta Mogiana.....	34
Figura 17 – Análise de cariotipagem das leveduras selecionadas geneticamente após 31 semanas de inoculadas na propagação do levedo da Usina Alta Mogiana.....	35
Figura 18 – Dados de análise de picos de uma curva de calibração interna do cromatógrafo de íons ICS 3000.....	36
Figura 19 – Exemplo de um cromatograma de uma amostra de mosto realizada em cromatógrafo de íons durante a propagação do levedo.....	37
Figura 20 – Exemplo de um cromatograma de uma amostra de vinho fermentado realizada em cromatógrafo de íons durante a propagação do levedo.....	38



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - mostra os valores de tempo de fermentação, rendimento em etanol ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade obtida para os três tempos de enchimento.....	4
Tabela 2 - Resultados analíticos do melaço de cana-de-açúcar utilizado na formação do mosto.....	11
Tabela 3 - Resultados analíticos encontrados no mosto utilizado nas fermentações etanólicas durante a propagação do levedo.....	11
Tabela 4 - Resultados analíticos encontrados no mosto utilizado nas fermentações etanólicas durante o período de propagação do levedo.....	12
Tabela 5 - Resultados analíticos encontrados no vinho fermentado das fermentações etanólicas durante o período de propagação do levedo – média diária.....	16

## RESUMO

Este trabalho foi elaborado com o objetivo de estudar o comportamento da fermentação alcoólica durante a propagação do levedo para a safra de 2012 numa usina produtora de açúcar, álcool e energia termelétrica da região de Ribeirão Preto, SP. Para a obtenção dos dados experimentais foram utilizadas as instalações como laboratórios, fermentaria e estrutura de apoio da própria usina. A idéia foi inicialmente medir os parâmetros cinéticos para aperfeiçoar esta etapa nas futuras propagações de levedo da usina, permitindo que a mesma pudesse “arrancar” com maior rapidez (menor fase de adaptação) e com menores perdas de ritmo possível. Depois de obtidos os dados operacionais e laboratoriais, foram organizados e aplicados os cálculos para Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), Coeficiente global de conversão de substrato no produto etanol ( $Y_{p/s}$  etanol) e em produto glicerol ( $Y_{p/s}$  glicerol) para 20 fermentações utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de glicose, frutose e sacarose, de onde foram obtidos os seguintes resultados médios:  $Y_{x/s} = 0,064$  g levedura/g AT,  $Y_{p/s}$  etanol = 0,364 g etanol/g AT e  $Y_{p/s}$  glicerol = 0,024 g glicerol/g AT e tempo de geração de 22,3 h, concluindo-se que nesta fase de propagação de levedo o Tempo de geração foi afetado negativamente pelo aumento da concentração do substrato, mas não a produtividade.

Palavras-chave: propagação de leveduras industriais, parâmetros cinéticos, rendimentos, etanol, glicerol.

## 1. INTRODUÇÃO

O período de multiplicação de leveduras também conhecido como “soltura da fermentação” ou “arranque” apresenta poucos estudos de escala industrial. Desta forma, conhece-se o comportamento em fase laboratorial, mas as condições adversas como insuficiência de aeração, aquecimento do mosto e outros decorrentes da instabilidade na partida inicial da fermentação de uma unidade industrial geram imprevistos que tornam esta fase pouco conhecida. Sendo assim, o desempenho da fermentação alcoólica pode estar abaixo do esperado devido aos incidentes ocorridos com a partida da indústria para o início de uma safra.

Além disso, a fase de adaptação de crescimento é extremamente indesejável em termos industriais, uma vez que há consumo de substrato para manutenção da viabilidade celular com crescimento microbiano baixo ou inexistente e nem sempre as unidades produtoras de álcool são destilarias anexas da fabricação de açúcar e não possuem o melaço para ser estocado não tendo instalações industriais projetadas para uma propagação de levedo eficiente tanto para uma destilaria anexa como para uma autônoma sendo economicamente inviável tê-las por um período de 2 a 5 dias de utilização de uma safra, portanto propagam o levedo fazendo as duas rotas ao mesmo tempo: respirativa e fermentativa, com um inconveniente de não possuírem procedimentos padronizados para o arranque da fermentação por faltar um modelo cinético capaz de mitigar estes efeitos.

Neste contexto, medir e avaliar os coeficientes globais de conversão de substratos em produtos bem como propor melhorias para a próxima propagação da usina passou a ser o objeto deste estudo.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho de conclusão de curso foi determinar os coeficientes globais de conversão de substratos em produtos formados como o etanol e o glicerol durante a fase de propagação de levedo utilizando dados reais de uma usina de açúcar e álcool. A partir disto, propor sugestões de melhoria para a próxima safra na sistemática atual adotada. Esta fase foi conduzida pelo corpo técnico da usina, realizada para se obter a quantidade necessária de uma suspensão de leveduras capazes de comportar uma moagem constante desde o primeiro dia de safra de 2012, utilizando como matéria prima os seguintes carboidratos: glicose, frutose e sacarose contidos no melaço de cana-de-açúcar.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

Para SKOLE et al.(1977), a clarificação do caldo misto auxilia muito na eliminação das células vegetativas, porém as formas esporulada podem permanecer viáveis, assim BEVAN & BOND (1971), após o clarificador, que apresenta temperaturas próximas a 100°C. foram isolados bastonetes esporulados identificados com *Bacillus megaterium*.

Para CLARK et al.(1980), mostraram que espécies de Clostridium também podem sobreviver aos tratamentos térmicos utilizados no processo de obtenção de açúcar e álcool.

Para GALLO (1989), a média final de 44,56%, conseguida na redução das bactérias após o tratamento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), no preparo do pé-de-cuba, pode ser considerada boa, uma vez que se iguala ou mesmo supera as percentagens de reduções bacterianas obtidas na própria prática com produtos comerciais, utilizados no controle da infecção bacteriana na fermentação alcoólica, embora a procura de biocidas mais eficientes se faz necessária.

Para Gutierrez (1991), as leveduras durante a fermentação alcoólica produzem além de etanol e gás carbônico, compostos secundários como glicerol, alcoóis superiores, ácido pirúvico e succínico, sendo que o glicerol pode ser considerado como o mais importante componente do ponto de vista quantitativo.

Para Oura (1977), relata que a formação do ácido succínico acarreta maior produção de NADH e, portanto aumentando o glicerol formado e Nordstrom (1966) verificou que a biossíntese do material celular é um processo que produz NADH e assim também contribui para a formação de glicerol.

Para Radler & Schultz (1982) diversos fatores interferem com a formação de glicerol na fermentação alcoólica, como a linhagem de levedura, para Rankine & Bridson (1971) os componentes do meio como sulfito, para Kenyon et al (1986) a atividade da água, para Neish & Blackwood (1950) o pH do meio, para Panchal & Stewart (1980) a pressão osmótica e para Nordstrom (1962) a concentração de ácido pantotênico.

Para os autores Han e Levenspiel (1988) a equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento como Luong (1985) diz

que a cinética de Monod é aplicável somente quando não ocorre a presença de produtos metabólicos tóxicos.

Andrietta et al.(2003) visando determinar a influência da velocidade de alimentação de substrato em processos de produção de etanol em batelada alimentada analisaram a interferência da velocidade de enchimento sobre a produtividade e rendimento do processo em batelada alimentada quando concluíram que o rendimento em etanol é afetado pelo tempo de enchimento, diminuindo linearmente com o mesmo e que a produtividade é pouco afetada pela velocidade de enchimento, conforme demonstrado na tabela 1 dos autores que mostra os valores de tempo de fermentação, rendimento em etanol ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade obtida para os três tempos de enchimento.

A Tabela 1- mostra os valores de tempo de fermentação, rendimento em etanol ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade obtida para os três tempos de enchimento.

Tempo Enchimento (h)	Tempo Fermentação (h)	$Y_{P/S}$	Produtividade (g /Lxh)
1	8,1	0,374	9,02
2	7,0	0,349	9,75
3	6,3	0,324	10,06

Fonte: Andrietta et al.(2003)

No entanto para Borges (2008) considerando a variação dos tempos de enchimento, para as concentrações de sacarose no meio alimentado próximas a 218 e 245 g/l, os tempos de enchimento favoráveis foram os de 4 e 5 horas, os quais segunda a autora forneceram maiores valores de produtividade e rendimentos em etanol (em todo o tempo de enchimento), respectivamente, continuando a autora concluiu que o tempo de enchimento ótimo, para as concentrações de sacarose na alimentação próximas a 285 g/l, foi igual a 5 horas, no qual obteve-se os maiores valores de produtividade e rendimento em etanol, segundo a mesma, os rendimentos em etanol não diminuiram linearmente com o tempo de enchimento e quanto mais rápido se alimentou o fermentador, menor foi o tempo de fermentação.

Para Lima et al. (2001) os diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol.

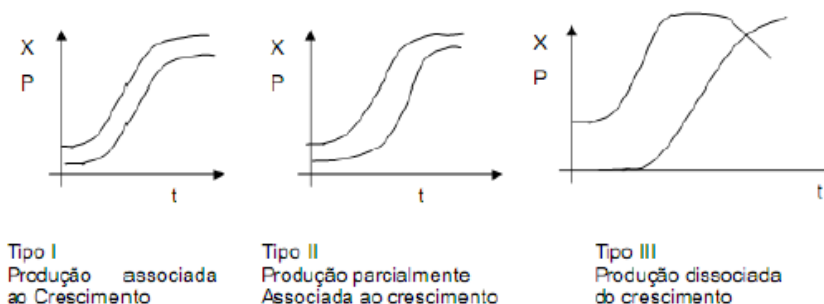
Os autores Oura (1977) e Brumm & Hebeda (1988) concordam que a produção de etanol nas destilarias a formação de glicerol é indesejável, pois reduz a eficiência da fermentação.

Para OKADA (1981) o efeito Crabtree, que é o incremento na produção de etanol em concentrações de glicose superiores a 0,5-1,0 g/L (independentemente da concentração de oxigênio) como prejudicial ao processo de produção de leveduras de panificação, pois parte do açúcar disponível é convertida a etanol e dióxido de carbono em detrimento à biomassa, reduzindo o rendimento.

Para Brumm & Hebeda (1988) o glicerol formado corresponde de 8 a 15 g por 100 g de etanol enquanto que para Oura (1977) relata de 0,03 a 0,05 g de glicerol por g de glucose e ainda que o processo de formação de glicerol por levedura está diretamente correlacionado com o balanço de redox da célula.

Bastos, (2010) cita em seu livro os modelos matemáticos de estimativa de crescimento celular mais simples chamados de “não estruturados”, a produção de um dado metabólito pode estar intimamente associada ao crescimento celular, de forma que só haverá formação de produto quando ocorrer crescimento o autor relata a inter-relação entre produção e crescimento segundo a descrição de Gaden e Luedeking-Piret ilustrada pela figura abaixo:

Figura 43 - Classificação de crescimento associado à formação de produtos



Fonte: Bastos (2010).

E em 1959, Luedeking e Piret, propuseram o seguinte modelo para a formação de produto:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

onde,  $\alpha \frac{dX}{dt}$  termo de produção associado ao crescimento e  $\beta X$  termo de produção associado à massa celular

Assim:

Tipo 1:  $\mu_p = \alpha \mu = Y_{p/x} \mu$

Tipo 2:  $\mu_p = \alpha \mu + \beta$

Tipo 3:  $\mu_p = \beta$

Para Rankine & Bridson (1971) a importância do glicerol na fermentação alcoólica está relacionada com a qualidade da bebida alcoólica para vinho e igualmente em Parfait & Jouret (1980) para a bebida alcoólica rum.

Tosetto, (2002) observou em seus estudos que a velocidade específica de produção de etanol está vinculada a velocidade específica de crescimento microbiano até determinada fase da fermentação, sendo que após esta, observou-se uma diminuição da velocidade de crescimento microbiano, sem que isto ocorresse com a velocidade específica de produção de etanol mostrando que, nesta fase, as mesmas não estão mais associadas. A cinética de produção de glicerol mostrou-se similar ao do etanol, variando somente nos valores de rendimento, onde o do etanol foi 7 a 8 vezes maior que o do glicerol.

Borges (2008) citou em sua pesquisa Thatipamala et al. (1992) que a inibição pelo substrato desativa importantes enzimas, além de modificar o caminho metabólico que é vital à sobrevivência da levedura. O efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera 150 g/L e ainda o autor relata que na fermentação alcoólica o rendimento de biomassa com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diminui de 0,156 para 0,026 com o aumento da concentração de etanol de 0 a 107 g/L, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto, os autores propuseram um modelo para representar a diminuição do rendimento da biomassa ( $Y_x/s$ ) com o aumento das concentrações iniciais de etanol e de substrato e a diminuição da taxa de crescimento específico com o aumento da concentração inicial de substrato e ainda foi considerado um modelo específico para a fase Lag e os mesmos observaram experimentalmente que a inibição pelo substrato afetou mais o rendimento em etanol do que a inibição pelo produto, por provocar a diminuição da viabilidade celular, observaram também que a fase Lag aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato

Alves (1996) em seus estudos sobre a cinética do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio de cultura industrial, levou em consideração a concentração do substrato e a temperatura através ensaios com fermentações contínuas em reator CSTR, em faixa de temperatura de 28 a 38 °C, para isto utilizou leveduras selecionadas e meio de cultura a base de melaço de cana-de-açúcar, obteve



modelos matemáticos expressando os parâmetros  $P_m$  (concentração de etanol da qual não ocorre crescimento celular),  $\mu_{max}$  (velocidade específica máxima de crescimento celular) e  $Y_{x/s}$  (rendimento celular) em função da temperatura. Um valor para  $K_s$  (constante de saturação) também foi obtido experimentalmente. Os modelos matemáticos e o valor de  $K_s$  obtidos são mostrados a seguir:

1)  $P_m = 638,1 \cdot e^{-0,05741 \cdot T}$ , para  $30 < T < 38^\circ\text{C}$ ;

2)  $\mu_{max} = 4,181 \cdot 10^4 \cdot e^{-\frac{3535}{T}} - 5,397 \cdot 10^{69} \cdot e^{-\frac{50475}{T}}$ , para  $28 < T < 38^\circ\text{C}$ ;

3)  $Y_{x/s} = 0,098 \text{ gcel.seca/gART}$ , para  $28 < T < 34^\circ\text{C}$ ;

$Y_{x/s} = 0,292 \cdot e^{-0,032 \cdot T}$ , para  $34 < T < 38^\circ\text{C}$ .

4)  $K_s \cong 4,1 \text{ g ART/L}$ , entre  $28$  e  $38^\circ\text{C}$ .

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para se obter os parâmetros cinéticos  $R_x$ ,  $R_s$ ,  $R_p$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{x/p}$ , tempo de geração e outros, durante o período de propagação do levedo foram extraídos dos procedimentos adotados pela usina e demonstrados neste pequeno estudo de caso.

Para se conhecer os parâmetros cinéticos mencionados, foram utilizadas as cubas e as dornas de fermentação etanólica descritas no item 4.1 deste, aproveitou-se o momento da propagação de levedo da Usina Alta Mogiana para a safra de 2012, quando foram subtraídos os dados da condução de 20 fermentações alcoólicas com mosto derivado do melaço estocado remanescente da safra anterior, armazenado para este fim, os dados foram tomados do levantamento do processo industrial associados aos dados registrados pelos operadores da fermentação alcoólica. O período amostral foi iniciado quando inoculou-se os primeiros 1000 kg de leveduras na forma seca e geneticamente selecionada, desde a sua rehidratação até o consumo final do melaço estocado. A condução da propagação foi realizada pelos operadores da fermentação quando foram tomadas durante o processo as temperaturas, vazões, volumes, tempos de alimentação, tempos de fermentação, tempo de centrifugação e outros apontados nos registros de qualidade da usina. Os ensaios laboratoriais foram realizados pelos técnicos

químicos e técnicos de açúcar e álcool dos laboratórios de processo incluindo o de microbiologia da própria usina e as determinações analíticas aplicadas estão identificadas no item 4.6 deste.

#### **4.1 Fermentadores**

As fermentações foram desenvolvidas em cubas de aço carbono, com revestimento interno em tinta epóxi, com agitadores mecânicos de pás e sistema de injeção de ar comprimido distribuídos em tubulações de Ø ½ ” pelo fundo das cubas de capacidade de 350 m<sup>3</sup> cada uma, as cubas estão providas de sistema anti espuma e não tendo sistema de refrigeração próprio, possuem o fundo cônico com inclinação de 10 a 15<sup>o</sup>, estas são utilizadas pela usina como pré fermentadores e não operam durante a safra como fermentadores. As cubas foram utilizadas no período da propagação do levedo como fermentadores semi aerados, outro equipamento também utilizados como reatores os fermentadores chamados de dornas, construídas em chapas de aço carbono revestidas internamente com tinta epóxi, sem agitadores mecânicos e com sistema alternativo de injeção de ar comprimido que se distribui em tubos de aço galvanizado, perfurados tipo flauta, estas dornas possuem o fundo cônico, com inclinação de 50 graus, com capacidade nominal de 1000 m<sup>3</sup> e possuem sistemas de refrigeração do vinho por trocadores de calor a placas. As dornas são fechadas, providas de coletores de gases para a recuperação do etanol evaporado durante o desprendimento dos gases CO<sub>2</sub> que após recolhidos são direcionados para as colunas de pratos calotados quando são recuperados pela lavagem em contra corrente com água potável. As dornas possuem sistema de distribuição de mosto por anel distribuidor na parte superior do conjunto das dornas e um anel distribuidor da suspensão de fermento tratado paralelo ao anel distribuidor de mosto, as dornas estão providas de um sistema independente de CIP- *Clean in Place*, com cabeçotes rotativos para o hidrojateamento, fixados no topo de cada dorna e um sistema automático de abatimento de espuma com pistolas e bicos que atomizam o tenso ativo ao ser injetado nas bolhas de espuma do vinho em fermentação.

## 4.2 Procedimentos industriais preliminares

Para a realização da propagação do levedo fez-se necessário a realização de testes industriais preliminares para reduzir ou eliminar a possibilidade de se perder a fermentação por micro-organismos indígenas e por incidentes nas instalações industriais que estavam paradas para a manutenção de entressafra, práticas das usinas brasileiras que possuem períodos distintos de safra e entressafra sendo as atividades produtivas sazonais quando na eminência da safra a redução de riscos se faz necessária para a propagação do levedo, pois as instalações na indústria sucroalcooleira não foram projetadas de acordo com as indústrias alimentícias e farmacêuticas, portanto os testes preliminares de:

- Abertura e fechamento de válvulas eletro-pneumáticas com testes de sinais eletrônicos e outros da planta industrial;
- Ligamento e desligamento de bombas com a realização de testes com fluidos checando o funcionamento das bombas de transferências e sentido dos seus fluxos transferindo-os de um vaso para outro;
- Homogeneização por recirculação do melaço estocado remanescente da safra anterior para conferência da transferência de fluidos e possíveis entupimentos por precipitação de sais e cristalização da sacarose,
- Realização de CIP – *Clean in Place* com água quente provenientes de condensados armazenados durante os testes industriais da usina nas linhas: de mosto, fermento diluído, xarope, vinho bruto; realização de CIP utilizando solução de hipoclorito de sódio nos circuitos de vinho, mosto, cubas e dornas de fermentação para eliminação de microorganismos enclausurados durante a entressafra em chamados pontos mortos;
- Realização de limpeza das dornas, cubas e volantes com cabeçotes rotativos utilizando solução de hipoclorito de sódio 30 ppm para desinfecção e checagem dos cabeçotes rotativos de limpeza;
- Conferências do funcionamento das linhas de ar comprimido para a fermentação etanólica;
- Estocagem de macro e micronutrientes próximos ao diluidor de nutrientes sólidos,
- Avaliação do sistema de resfriamento e linhas de mosto quanto à necessidade de

realização de CIP com solução de ácido fosfórico a 5% a 85 °C para a remoção de sais fosfáticos precipitados e incrustados nas superfícies internas das tubulações;

- Para a segurança são conferidas as estanqueidades das válvulas dos fundos das cubas, dornas, diluidor de mosto e demais tanques para garantir de que não ocorram perdas de produtos como fermento, mosto, vinho e mel para os esgotos da fábrica;
- Conferência dos encaixes e posições dos jogos de placas dos trocadores de calor de vinho bruto e mosto teste hidrostático e CIP;
- Avaliação da população microbiana por contagem de Placas de Petri e teores de AT – açúcar total em amostras do melaço estocado;
- Verificação de estoques de bicos para as centrifugadoras de levedo para diversas vazões;
- Programação de pessoal técnico como eletricitistas, instrumentistas, mecânicos, técnicos em eletrônicas para os casos de incidentes não previstos na planta.

#### **4.3 Inóculo**

Na propagação do levedo para o início de safra da Usina Alta Mogiana S.A. foram utilizadas as linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas geneticamente, adquiridas de forma seca, liofilizadas, embaladas a vácuo, produzidas a partir de cultura pura. O processo de propagação iniciou-se com as seguintes quantidades das linhagens: 500 kg de levedura PE-2, 500 kg de levedura CAT-1 com a adição de 50 litros de um vinho contendo uma suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* denominada FT 1255L selecionada pela empresa FERMENTEC S/C LTDA a partir das leveduras permanentes e dominantes da própria usina conforme figuras de n<sup>os</sup>. 15,16 e 17 do ANEXO.

#### **4.4 Preparação do Mosto**

Na preparação do mosto utilizou-se como substrato o melaço de cana-de-açúcar remanescente da safra de 2011 onde foram estocadas 2.225 t deste, seus dados encontram-se evidenciados na Tabela 2. O melaço comumente chamado de mel final foi conservado com 3 mg/kg de antibiótico KAMOURAN HJ com princípio

ativo Monensina sódica mais 3 mg/kg de LACTROL com princípio ativo Virginiamicina quando foram misturados durante o período de armazenamento sob recirculação mecânica até o fim da estocagem e término de safra.

Tabela 2 - Resultados analíticos do melão de cana-de-açúcar utilizado na formação do mosto.

Reservatório de melão	Nº. 1	Nº. 2	Nº. 3
Brix (% m/m)	83,2	80,0	86,1
Pol (% m/m)	39,7	38,2	40,6
Pureza % (pol/brix)	47,7	47,8	47,1
Acidez Total (g/l)	8,6	8,5	9,3
Acidez % Brix	10,3	10,6	10,8
Glicose (% m/m)	5,4	6,4	5,3
Frutose (% m/m)	6,6	7,2	6,8
Sacarose (% m/m)	41,5	42,1	41,5
Leveduras e Fungos (UFC/g)	0	0	0
Bactérias totais (UFC/g)	5,3 x 10 <sup>3</sup>	4,7 x 10 <sup>3</sup>	4,9 x 10 <sup>3</sup>

Fonte: Usina Alta Mogiana S.A – Açúcar e Alcool

O mosto foi produzido em escala industrial nas seguintes concentrações aproximadas de 10, 13, 15 e 20 °Brix, utilizando-se água potável fria para a sua diluição e adicionado aos fermentadores de acordo com o procedimento adotado pela unidade fabril. Os resultados de acompanhamento das fermentações obtidos estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4 que interpretados, percebeu-se uma leve redução da população das bactérias totais, provavelmente pelo efeito da diluição do melão para a formação do mosto, da mesma forma, notou-se a elevada acidez sulfúrica total no mosto, coerentes com Acidez%Brix do melão estocado, es-

Tabela 3 - Resultados analíticos encontrados no mosto utilizado nas fermentações etanólicas durante a propagação do levedo.

Nº. de dia por ordem	pH	Acidez (g/L)	Bactérias totais UFC/ml	Ácido Láctico (mMol)	Sulfito (mg/l)	Nitrogênio Assimilável (mg/L)
1º.	5,38	0,90	3,4 x 10 <sup>3</sup>	7,3	1,85	78,4
2º.	5,39	1,17		7,1	65,38	106,4
3º.	5,37	1,29	1,7 x 10 <sup>3</sup>	8,7	1,27	106,4
4º.	5,31	1,62		13,8	1,52	140,0
5º.	5,35	1,37	2,2 x 10 <sup>3</sup>	10,4	1	120,4
6º.	5,32	1,28		1,7	4,24	131,6
7º.	5,30	2,38		-	2,42	162,4
8º.	5,28	2,35	2,5 x 10 <sup>3</sup>	-	11,75	338,8
9º.	5,30	2,62		-	0,51	215,6

Fonte: Usina Alta Mogiana S.A - Açúcar e Alcool

tes efeitos foram relatados por Basso (1991) onde os altos teores alcoólicos, temperaturas elevadas, acidez do meio, presença de sulfito e contaminação bacteriana são exemplos de condições geradoras de estresse às células de levedura.

Tabela 4 - Resultados analíticos encontrados no mosto utilizado nas fermentações etanólicas durante o período de propagação do levedo.

Composição mineral					
Analito	Potássio	Fósforo	Cálcio	Magnésio	Alumínio
mg/L	375	185,6	475	405	5,14

- Dados obtidos de uma amostra composta do mosto alimentado no período.

Estes efeitos citados podem ter sido atenuados pela diluição do melaço para formação do mosto, não afetando a viabilidade celular da levedura conforme dados da Figura 1, da mesma forma a concentração de sais no mosto demonstrados na Tabela 4.

## 4.5 Inoculação e Fermentações

### 4.5.1 Inoculação do levedo pelas cubas

O °Brix de alimentação do mosto solicitado para esta fase foi de 10 %, temperatura de 30 a 33 °C, estas temperaturas poderão ser atingidas utilizando-se água quente de condensados armazenados durante os pré testes industriais. O procedimento da usina solicitou que temperatura do mosto nesta fase devesse estar entre 30 a 33 °C somente durante o início da alimentação do substrato e depois que o fermento “pegasse” expressão utilizada pelos operadores do setor de fermentaria quando percebessem o desprendimento do gás CO<sub>2</sub> borbulhando o vinho sob agitação mecânica, depois desta fase, o mosto poderia ser preparado com água potável fria, mantendo-se em torno dos 29 °C, controlando assim a temperatura do fermento na cuba pelos operadores conforme fosse a necessidade.

Inoculação inicial: encheu-se a cuba n<sup>o</sup>. 01 da pré fermentaria com cerca de 50 m<sup>3</sup> de água potável e adicionou-se sobre esta os nutrientes previamente diluídos no diluidor de nutrientes nas seguintes quantidades por litro de mosto: uréia: 500 mg/L, MAP- fosfato monoamônico: 500 mg/L, sulfato magnésio: 200 mg/L, sulfato manganês: 100 mg/L, sulfato de zinco: 25 mg/L mais o antibacteriano KAMOURAN

HJ: 3 mg/L ; ligou-se o batedor misturador da cuba, tendo como cuidado de não colocar o fermento seco sem que fizesse previamente esta operação, pois colocado o fermento seco poderia ser emplastado no fundo do equipamento causando à morte das leveduras por falta de contato com substrato; em seguida abriu-se lentamente o ar comprimido para o fornecimento de oxigênio aos microorganismos daí adicionou-se lentamente 1.000 kg do inóculo sobre esta água; aguardou-se aproximadamente 60 minutos para ocorrer a rehidratação das leveduras que estavam secas, hibernadas, embaladas sob vácuo contendo 25 kg, também como medida de segurança, deixou-se um recipiente com tensoativo anti espuma ao lado das cubas e dornas de fermentação.

A usina solicitou a utilização do consumo de melaço do maior tanque de capacidade de 1000 m<sup>3</sup> por questões de segurança do processo fermentativo. A suspensão de levedo ficou sob agitação pelo batedor e pelo arejamento do ar comprimido que foi mantido até que se começasse a alimentação de mosto nesta cuba depois disto iniciou-se a alimentação contínua do mosto, mantendo-se a alimentação de forma que o °Bx do vinho em fermentação fosse mantido abaixo da metade do valor do °Bx de alimentação do mosto (abaixo de 5%) para isto foi utilizado o sistema de preparação do mosto pelo caminho do trocador de calor a placas modelo MX-25 e alternado por outra linha paralela a cada 4 horas a linha de alimentação para a realização da limpeza tipo CIP- clean in place das mesmas. Cuidados foram tomados para que o melaço não entupisse o sistema de diluição devido a sua alta viscosidade a frio; evitando-se ao máximo a interrupção da alimentação de mosto, para que o crescimento celular não parasse em função velocidade de alimentação. Quando o volume do fermentador atingiu cerca de 180 m<sup>3</sup>, a vazão de alimentação do mosto passou a seguir os seguintes parâmetros: °Brix do vinho em fermentação na cuba de 3,0 a 3,5 % e temperatura de 32 a 34 °C mantendo-se as solicitações de que se a temperatura subisse muito e o °.Brix do vinho caísse, menor que 2,0 %, a temperatura poderia ser controlada através da adição de água tratada fria na cuba porque não haver sistema de refrigeração na mesma. No instante que o volume da cuba n°. 1 aproximou-se dos 330 m<sup>3</sup>, foi dosado as seguintes quantidades de nutrientes por litro de mosto: uréia: 500 mg/L, MAP- fosfato monoamônico: 500 mg/L, sulfato magnésio: 200 mg/L, sulfato manganês: 100 mg/L, sulfato de zinco: 25 mg/L mais o antibacteriano KAMOURAN

HJ: 3 mg/L após o operador da fermentação desligou o batedor mecânico e anotou em planilha apropriada o volume exato de vinho; depois disto foram equalizados os volumes da cuba n<sup>o</sup>.1 com n<sup>o</sup>.2 e n<sup>o</sup>.3; foram medidos exatamente os volumes de vinho e anotado em planilha apropriada em seguida abriu-se a injeção do ar comprimido para as três cubas, e continuou-se a alimentação de mosto, mantendo-se os procedimentos solicitados para temperatura e °.Brix no vinho em fermentação; quando os volumes das cubas atingiram valores próximos de 330 m<sup>3</sup>, desligou-se os batedores e anotou-se em planilha apropriada o volume exato de cada uma das cubas; e em seguida foram transferidos estes vinhos, da Cuba n<sup>o</sup>.1 para a Dorna n<sup>o</sup>.1; da Cuba n<sup>o</sup>.2 para Dorna n<sup>o</sup>.3 e o da Cuba n<sup>o</sup>.3 para a Dorna n<sup>o</sup>. 4.

#### **4.5.2 Propagação do levedo pelas Dornas**

Sobre os vinhos (suspensão de levedo) provenientes das cubas, dosou-se a cada uma a quantidade equivalente por litro de mosto: uréia: 500 mg/L, MAP- fosfato monoamônico: 500 mg/L, sulfato magnésio: 200 mg/L, sulfato manganês: 100 mg/L, sulfato de zinco: 25 mg/L mais o antibacteriano KAMOURAN HJ: 3 mg/L; em seguida foram ligados os sistemas de refrigeração do vinho das dornas e o sistema de injeção de ar comprimido e ajustada a alimentação de mosto para as leveduras nas seguintes recomendações: °.Brix do mosto em torno de 10%, °.Brix do vinho em fermentação na faixa de 3 - 3,5 % e temperatura do vinho na faixa 32 e 33 °.C procurou-se alimentar as dornas n<sup>os</sup>. 1, 3, 4 de forma que os mesmos pudessem chegar a volumes próximos de 1000 m<sup>3</sup> em tempos escalonados, para que o início da centrifugação do vinho de cada dorna não coincidissem com as outras, solicitado também que fossem utilizadas nas centrifugadoras de levedo, bicos de saída de vinho centrifugado de menores diâmetros para evitar perdas descontroladas de leveduras. Após o final da alimentação de cada dorna, coletaram-se alíquotas de vinho para a certificação de que a dorna havia “morrido” para daí iniciar o processo de centrifugação, quando o resultado da análise do teor de AT- açúcar total no mesmo fosse abaixo de 0,09%, exceto a Dorna n<sup>o</sup>.1 que deveria ser equacionada ao “morrer” com a Dorna n<sup>o</sup>.2 por motivos de manutenção no fermentador. Assim que as Dornas 3, 4 foram “morrendo” os vinhos delas centrifugados ou turbinados como se usa dizer no chão de fábrica



foram destinados às dornas volantes para posterior destilação e o creme de leveduras das mesmas resultantes da separação física de cada dorna fermentada foram enviados para sua cuba correspondente, este primeiro creme foi depositado sobre uma cama d'água fria e potável de aproximadamente 25 m<sup>3</sup> e tratados com nutrientes previamente diluídos na seguinte proporção: uréia: 500 mg/L, MAP-fosfato monoamônico: 500 mg/L, sulfato magnésio: 200 mg/L, sulfato manganês: 100 mg/L, sulfato de zinco: 25 mg/L mais o antibacteriano KAMOURAN HJ: 3 mg/L, depois disto os três pés-de-cuba foram bombeados para as respectivas dornas de fermentação previamente higienizadas e continuou-se a seqüência da primeira rodada do processo de propagação de levedo onde foram seguidos os mesmos procedimentos para segunda rodada alterando-se a solicitação para o °Brix do mosto de alimentação ficasse em torno 13% e para a terceira rodada em 15 e depois 20%.(entendido aqui por rodada, um campanha de 4 a 5 dornas de fermentação com o mesmo procedimento).

#### **4.5.3 Tratamento do Fermento**

O tratamento do fermento comumente chamado é o tratamento do creme de leveduras que saem na separação física das leveduras contidas no vinho fermentado ou bruto, solicitou-se a utilização de bicos nas centrifugadoras de levedo de menor diâmetro para priorização da contenção de perdas de leveduras para o vinho turbinado, e após uma semana de safra o aumento dos diâmetros dos bicos a priorização da concentração do levedo no creme de leveduras que retorna às cubas de tratamento para que a recirculação de vinho dentro da fermentação alcoólica fosse diminuída. Foi programado que a partir da segunda rodada de fermentação, os pés-de-cuba fossem tratados da seguinte forma: diluir o creme de leveduras com água fria tal que a concentração final ficasse pela metade da concentração do creme nas saídas das centrifugadoras de levedo, por exemplo: se o creme estivesse com 60% de concentração; diluir o mesmo para que a sua concentração final ficasse em 30% de levedo e depois deste passo aguardasse por duas horas e acertasse o pH deles a 2,80 e a partir da terceira rodada 2,60 e as rodadas posteriores avaliassem de acordo com os resultados do desempenho do processo de propagação em função dos estoques de melaço e resultados microbiológicos do processo

fermentativo como viabilidade celular, brotamento e níveis de infecções. Os resultados de acompanhamento das fermentações obtidos foram demonstrados na Tabela 5 e Figuras nºs. 1,2 e 3.

Tabela 5 - Resultados analíticos encontrados no vinho fermentado das fermentações etanólicas durante o período de propagação do levedo – média diária.

Período dia	pH	Acidez Sulfúrica g/L	Nitrogênio Assimilável	Ácido Lático mmo/L
2º.				6,18
3º.	4,71			7,15
4º.	4,83	1,67	70,0	6,76
5º.	4,88	1,75	182,0	7,06
6º.	4,69	1,75	142,8	8,23
7º.	4,79	1,72	126,0	
8º.	4,78	2,35	274,4	
9º.		1,69	114,8	

Fonte: Usina Alta Mogiana S.A – Açúcar e Álcool

Durante o período de propagação de levedo obteve-se resultados crescentes de células viáveis como demonstrado na Figura 1, os valores demonstram um aumento significativo a partir do 4º. dia e depois se manteve alta no 5º.,6º.,7º. e 8º. dias com uma pequena queda no 9º. dia devido a maiores residências nas dornas por motivos operacionais, a espera pela centrifugação associada ao teores alcoólicos maiores ocasionaram esta leve queda.

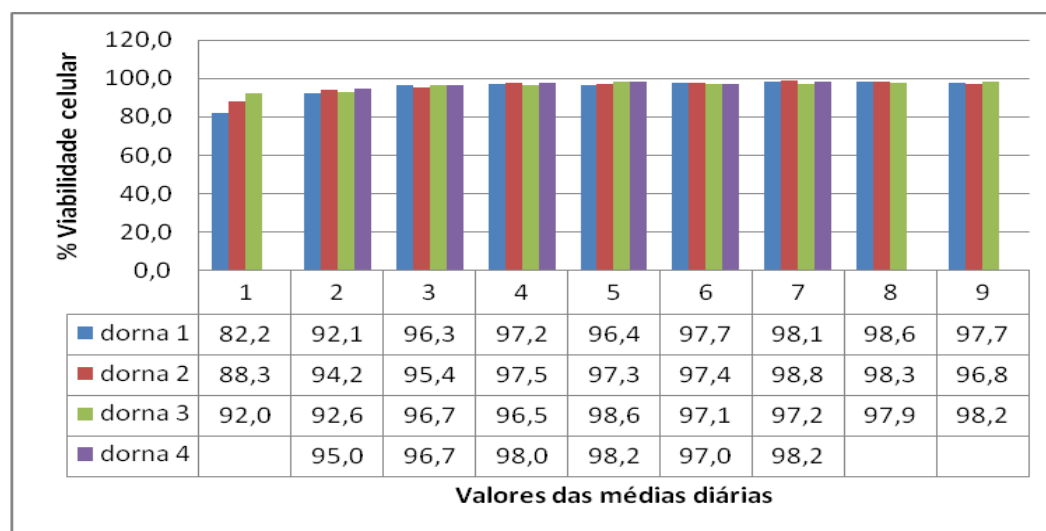


Figura 1 - Resultados microbiológicos encontrados no vinho fermentado de viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* – média diária por dorna.

Avaliando os valores obtidos da % de brotamento celular, indicadores que demonstraram o crescimento celular na Figura 2, observou-se que os menores valores estiveram concentrados nos 7<sup>o</sup>., 8<sup>o</sup>., e 9<sup>o</sup>. dias de propagação, quando foram aumentados os teores de AT no substrato de alimentação e como conseqüência o teor alcoólico no vinho, no primeiro momento esperou-se que pelo estímulo provocado na fermentação para a rota da reprodução, altas porcentagens de brotamento ocorreriam, no entanto observações realizadas ao microscópio ocular de amostras de vinho notou-se o desprendimento do broto da célula mãe muito cedo e muito rápido, tendo uma população de células independentes muito pequenas e frágeis, podendo-se concluir que as células adultas neste período predominaram no vinho em fermentação causados pelo estímulo do nitrogênio fornecido pela uréia adicionada e pelo nitrogênio presente no mosto de alimentação, portanto influenciando no resultado da % de brotamento para baixo.

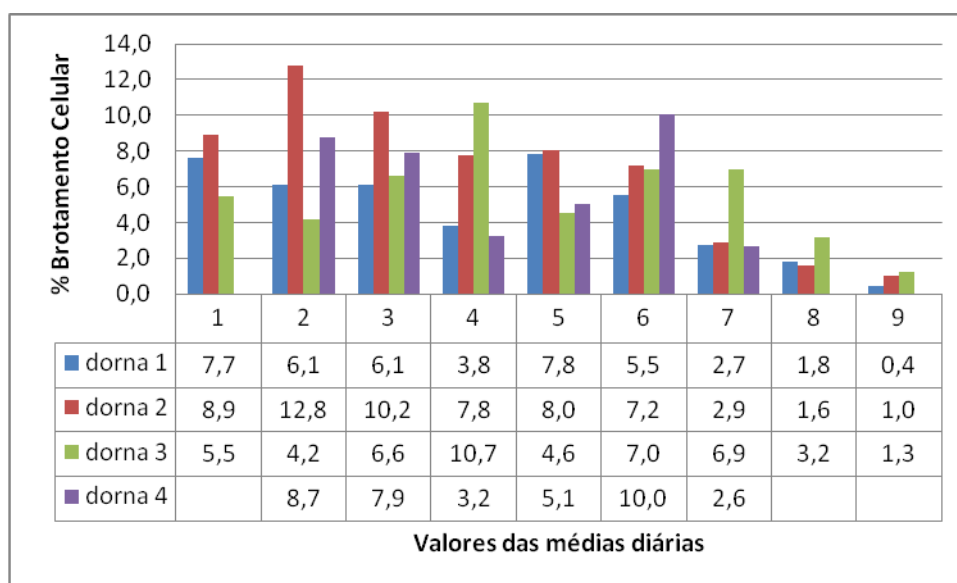


Figura 2 – Resultados microbiológicos encontrados de brotamento celular da *Saccharomyces cerevisiae* do vinho fermentado – média diária por dorna.

Durante a condução das fermentações, o monitoramento da contaminação foi realizado como demonstrado na Figura 3, evidenciando o aumento de bastonetes no vinho fermentado ao longo dos dias, mesmo sendo utilizados antibióticos de forma preventiva para que os níveis de infecção ficassem controlados, notou-se que do 1<sup>o</sup>. ao 9<sup>o</sup>. dia houveram aumentos na ordem de 6 vezes da população na média calculada, daí a necessidade da assepsia dos sistema. Notou-se que o reciclo de células, pela centrifugação do vinho contribuiu

também para este aumento, como neste período a acidificação do fermento tratado é branda, evitou-se o abaixamento rigoroso do pH na acidificação do fermento nas cubas e assim a mortes das leveduras ainda jovens e inadaptadas a este meio ácido. O tratamento ácido utilizado no pré tratamento do fermento nas usinas tem a função de acidificar o meio pela injeção de ácido sulfúrico nos pés de cuba de forma diluída ou concentrada, a levedura sendo um microorganismo acidófilo trabalha melhor neste habitat e o controle de pH e tempo de exposição das leveduras ao ácido deverá ser feito, recomenda GALLO, 1989, para um bom controle das bactérias do meio, pH 2,5 a uma exposição de 2 h, o qual não pode ser aplicado por motivos justificados acima. Na Figura 3 pôde-se observar na contagem de bastonetes no vinho fermentado alinhamento com RODINI, 1985, que trabalhando

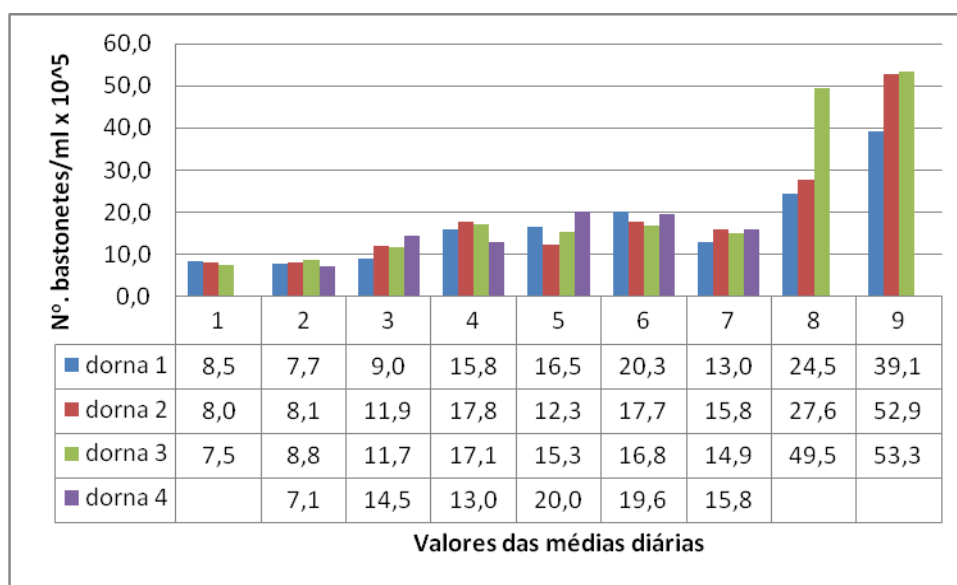


Figura 3 – Resultados microbiológicos encontrados de bastonetes/ml contados ao microscópio ocular em amostras de vinho fermentado – média diária por dorna.

com amostras de vinho de dornas em final de fermentação alcoólica, identificou como principais bactérias contaminantes: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Lactobacillus SP*, *Micrococcus lylae*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Planococcus SP.*, enquanto que para GALLO, 1989, em sua tese concluiu o autor que em relação às espécies predominantes isoladas destacam-se principalmente *B. coagulans* (15,09%), *L. fermentum* (15,04%), *L. helveticus* (14,08%), *B. stearothermophilus* (6,91%), *L. plantarum* (5,69%), *L. animalis* (4,55%), e *L. buchneri* (3,76%).

#### 4.6 Determinações analíticas

- Brix areométrico, efetuada através de metodologia codificada FC3M3 para caldo de cana adaptado vinho bruto (Amorim et al., 2003);
- Brix refratométrico, efetuada através de metodologia codificada FC3M39 para melaço e xarope (Amorim et al., 2003);
- Pol, efetuada através de metodologia codificada FC3M41 para melaço e xarope (Amorim et al., 2003);
- Açúcares totais, efetuada através da determinação cromatográfica de glicose, frutose e sacarose em amostras de vinho bruto, mosto, melaço de cana-de-açúcar, procedimento baseado no método oficial GS7/8/4-24, ICUMSA Methods Book (2011) adaptado pela FERMENTEC S/C LTDA.;
- Glicerol, efetuado através da determinação cromatográfica de vinho bruto conforme recomendação da Dionex Application Note 122;
- Concentração de leveduras, em % levedo, efetuada através de metodologia codificada FC4M19 para vinho bruto (Amorim et al., 2003);
- % Álcool, densímetro ANTON PAAR, efetuada através de metodologia codificada FC4M16 para vinho bruto e levedo tratado (Amorim et al., 2003);
- Acidez sulfúrica fixa, efetuada através de metodologia codificada FC4M7 para o mosto e metodologia codificada FC4M18 para vinho bruto (Amorim et al., 2003);
- pH, efetuada através de metodologia codificada FC4M22 para vinho bruto (Amorim et al., 2003);
- Sulfito, efetuada através de metodologia codificada FC4M6 para mosto (Amorim et al., 2003);
- Nitrogênio assimilável, efetuada através de metodologia codificada FC4M9 para o mosto e vinho bruto (Amorim et al., 2003);
- Potássio, efetuada através de metodologia codificada FC4M12 para mosto (Amorim et al., 2003);
- Cálcio e Magnésio, efetuada através de metodologia codificada FC4M13 para mosto (Amorim et al., 2003);
- Fósforo, efetuada através de metodologia codificada FC4M11 para mosto (Amorim et al., 2003);

- Alumínio, efetuada através de metodologia codificada FC4M14 para mosto (Amorim et al., 2003);
- Leveduras e Fungos, efetuada através de metodologia especificada por plaqueamento em meio de cultivo para as amostras de melaço e mosto (OLIVEIRA, A. J. et al., 1999);
- Bactérias totais, efetuada através de metodologia especificada por plaqueamento em meio de cultivo para as amostras de melaço e mosto (OLIVEIRA, A. J. et al., 1999);
- Viabilidade e Brotamento celular, determinada através de metodologia especificada para contagem em câmara de Neubauer em amostras de vinho bruto (FERMENTEC, 2007);
- Bastonetes/mL, determinada através de metodologia especificada para contagem ao microscópio óptico em amostras de vinho (FERMENTEC, 2007);
- Ácido láctico – Manual de Instruções (Roche, 2007).

#### 4.7 Cálculos dos parâmetros de fermentação

Com os resultados de glicose, frutose e sacarose (ver ANEXOS, figuras n<sup>os</sup>. 18,19 e 20) tomados durante a propagação do levedo foi possível calcular os açúcares totais do melaço, mosto e vinho em fermentação, determinou-se o término das fermentações quando o AT no vinho de cada uma delas ficou abaixo de 0,09 % m/v, a conversão seguiu a equação:

$$AT = \left( \left( \frac{\text{sacarose}}{0,95} \right) + \text{glicose} + \text{frutose} \right) \times 100, \text{ onde}$$

AT = Açúcares totais, expressos em g de glicose/100 mL e 100 g de acordo com a matriz.

Conforme Bastos (2010) os rendimentos são definidos com base no consumo de um material para formação de outro, portanto:

Coefficiente de rendimento celular:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \text{ onde,}$$

$Y_{x/s}$  = Coeficiente global de conversão de substrato em células expresso em g de levedura seca/g AT consumido;

$X_f$  = concentração de células ao final da fermentação, expresso em g levedura seca/L;

$X_0$  = concentração de células inicial da fermentação, expresso em g levedura seca/L;

$S_f$  = concentração de substrato ao final da fermentação, expresso em g AT/L;

$S_0$  = concentração de substrato inicial da fermentação, expresso em g AT/L;

Coeficiente de rendimento de produto em etanol:

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \text{ onde,}$$

$Y_{p/s}$  = Coeficiente global de conversão de substrato em produto expresso em g de etanol/g AT consumido;

$P_f$  = concentração de produto ao final da fermentação, expresso em g etanol/L

$P_0$  = concentração de produto inicial da fermentação, expresso em g etanol/L

$S_f$  = concentração de substrato ao final da fermentação, expresso em g AT/L;

$S_0$  = concentração de substrato inicial da fermentação, expresso em g AT/L;

Coeficiente de rendimento de produto em glicerol:

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \text{ onde,}$$

$Y_{p/s}$  = Coeficiente global de conversão de substrato em produto expresso em g de glicerol/g AT consumido;

$P_f$  = concentração de produto ao final da fermentação, expresso em g glicerol/L

$P_0$  = concentração de produto inicial da fermentação, expresso em g glicerol/L

$S_f$  = concentração de substrato ao final da fermentação, expresso em g AT/L;

$S_0$  = concentração de substrato inicial da fermentação, expresso em g AT/L;

$$Pr = \frac{P}{t}, \text{ onde}$$

$P_r$  = Produtividade em etanol, expresso em kg de etanol/h

$P = P_f - P_i$ , onde  $P_f$  é a quantidade de etanol ao final da fermentação e  $P_i$  é a quantidade de etanol inicial da fermentação, expresso em kg;

$t$  = tempo total de fermentação (h) - aqui o tempo para cálculo da produtividade foi considerado o tempo total de fermentação mais o tempo de espera para centrifugação do vinho.

Rendimento Fermentativo (RF) em etanol, com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (51,1 g etanol . 100 g glicose<sup>-1</sup>);

$$RF = \frac{Y_p}{s} \times 100$$

Cálculo de geração ou duplicação:

$$g = \frac{t}{n} \text{ onde,}$$

g = tempo médio de uma geração

t = tempo de duração da batelada alimentada expresso em hora

n = número médio de gerações que ocorreram durante o crescimento celular

$$n = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{0,693} \text{ onde,}$$

n = número médio de gerações que ocorreram durante o crescimento celular

ln = logaritmo neperiano

$X_f$  = número da concentração celular no início do crescimento exponencial expresso em g.

$X_0$  = número de concentração celular ao final do crescimento exponencial expresso em g.

#### 4.8 Resultados e Discussões

O período de propagação do levedo teve uma duração de aproximadamente nove dias e a medida em foi se avançando o enchimento das dornas em batelada alimentada pode-se observar a correlação entre as velocidades de crescimento celular ( $R_x$ ) com as de formação de glicerol ( $R_p$  glicerol) observado

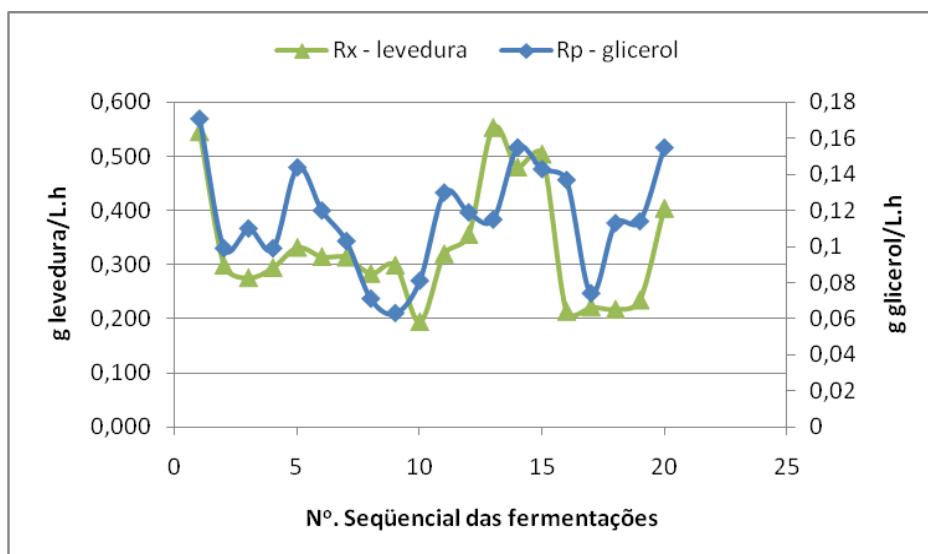


Figura 4 - Valores obtidos de Crescimento Celular ( $R_x$ ) e Formação de Produto ( $R_p$  glicerol) durante a propagação do fermento em 20 fermentações em planta industrial.



na Figura 4 onde foi obtido uma correlação de  $r = 0,6075$ , paralelamente foi obtido uma correlação  $r = 0,5829$  entre as variáveis  $Y_{x/s}$  o coeficiente global de conversão de células com a  $R_p$ , velocidade de formação do produto excretado glicerol, concluindo-se que a conversão de células está associada a produção de glicerol bem como associada a produção de etanol, pois os valores de rendimentos de células como mostrado na Figura 5, e em Oura,1977, concordaram com esta afirmação assim como com o modelo proposto por Luedeking-Piret citado em Bastos, 2010.

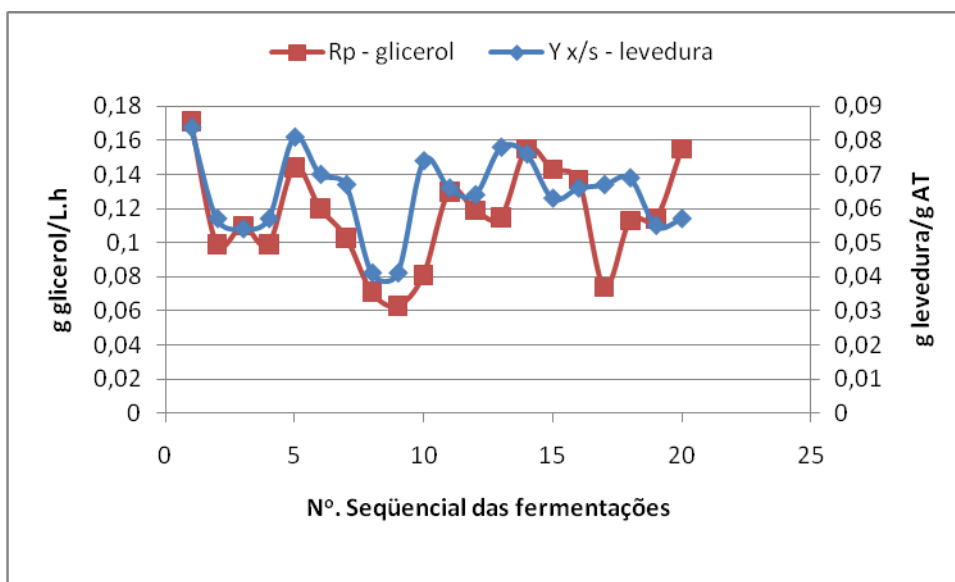


Figura 5 - Valores obtidos de Formação de Produto ( $R_p$  glicerol) versus Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.

Da mesma forma pode-se observar nas Figuras 6 e 7 correlações mais altas quando se avaliou a produtividade em leveduras e a produtividade em etanol, com  $r = 0,9123$  para leveduras e  $r = 0,9723$  para etanol, valores considerados altos em se tratando de processo de escala industrial. Na medida em que se foi aumentando a quantidade de kg AT/h na alimentação da fermentação houve um aumento significativo na produção de leveduras bem como na produção de etanol por hora, o que não foi constatado, ver Figura 14, confirmado pela correlação pouco significati-

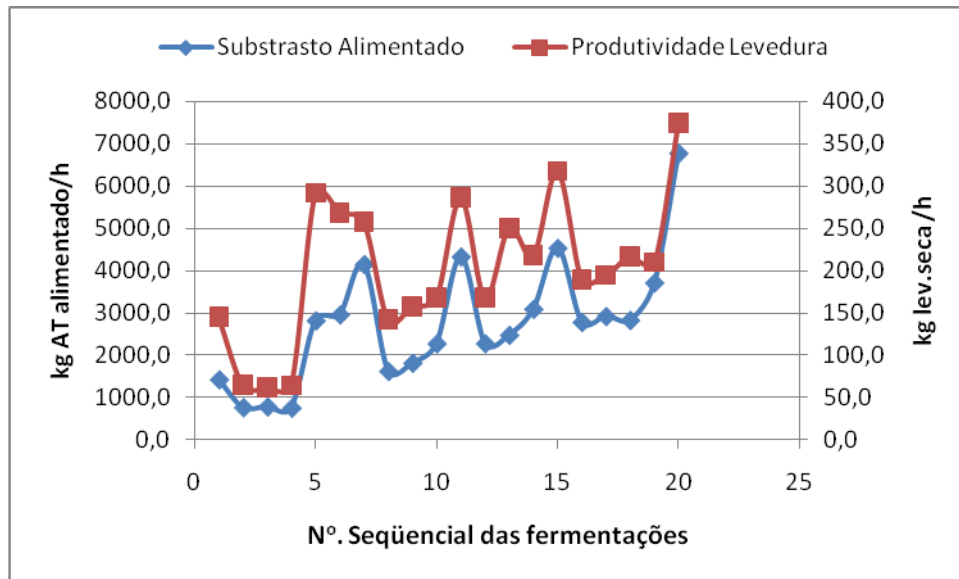


Figura 6 – Valores de Produtividade em levedura seca expressos em kg de leveduras seca/h versus Substrato alimentado expresso em kg de AT alimentado/h durante o período de propagação do levedo.

-va,  $r = 0,1114$  para  $Y_{x/s}$  contra correlação de  $r = 0,6480$  para  $Y_{p/s}$  etanol, portanto o aumento da produtividade está associada ao aumento na dosagem de kg AT alimentado/h para o rendimento em etanol, mas não para o rendimento em células.

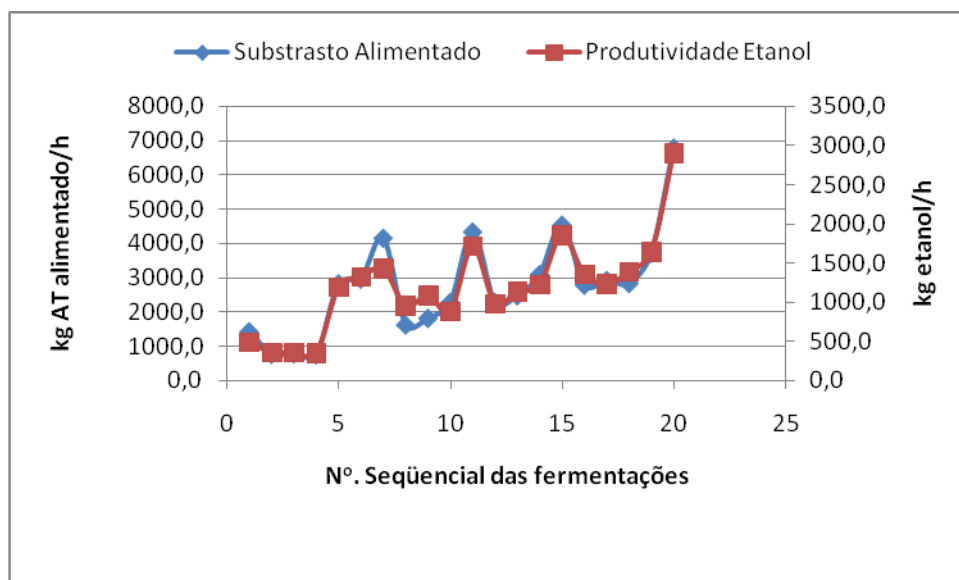


Figura 7 - Valores de Produtividade em etanol expressos em kg de etanol/h versus Substrato alimentado expresso em kg de AT alimentado/h durante o período de propagação do levedo.

Outro dado importante verificado durante o processo de propagação do levedo e estudado por Borges, 2008, quanto maior o rendimento relativo em g etanol por g de levedura seca ( $Y_{p/x}$ ) maior o rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) evidenciado no quadro da

Figura 8, confirmando a teoria de que o desvio da rota para a produção de etanol, fermentativa em detrimento da produção de células, rota respirativa, confirmados

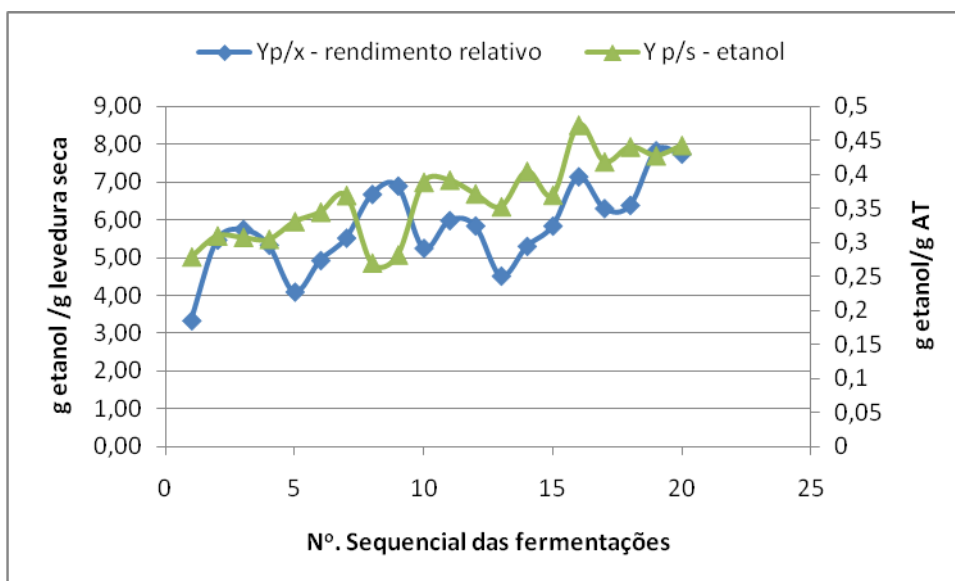


Figura 8 - Valores obtidos de Rendimento relativo ( $Y_{p/x}$ ) expresso em g de etanol/g de levedura seca versus Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$  etanol) expresso em g de etanol produzido/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.

também pela correlação  $r = -0,7003$  conforme evidenciado abaixo pela Figura 9.

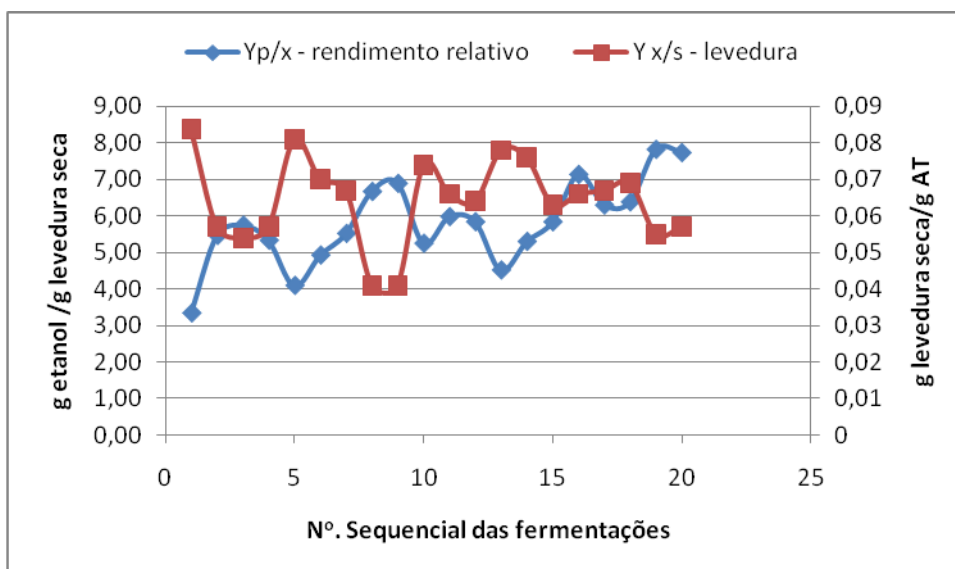


Figura 9 - Valores obtidos de Rendimento relativo ( $Y_{p/x}$ ) expresso em g de etanol/g de levedura seca versus Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.

Na Figura 10, pôde ser evidenciado o efeito do aumento da concentração do substrato durante os ciclos fermentativos, obteve-se correlação bastante significativa com  $r = 0,8276$ , entre as variáveis Tempo de geração e o AT%mosto, em acordo com estudos de Han e Levenspiel (1988) e Lima et al.

(2001), portanto o melaço de cana de açúcar utilizado contém vários agentes tóxicos prejudiciais a vitalidade das leveduras e estes são potencializados pelos aumentos da concentração do mosto em contrapartida pelo efeito Pasteur aumentando assim o Tempo de geração neste caso a reprodução das leveduras foi assim prejudicada pelo

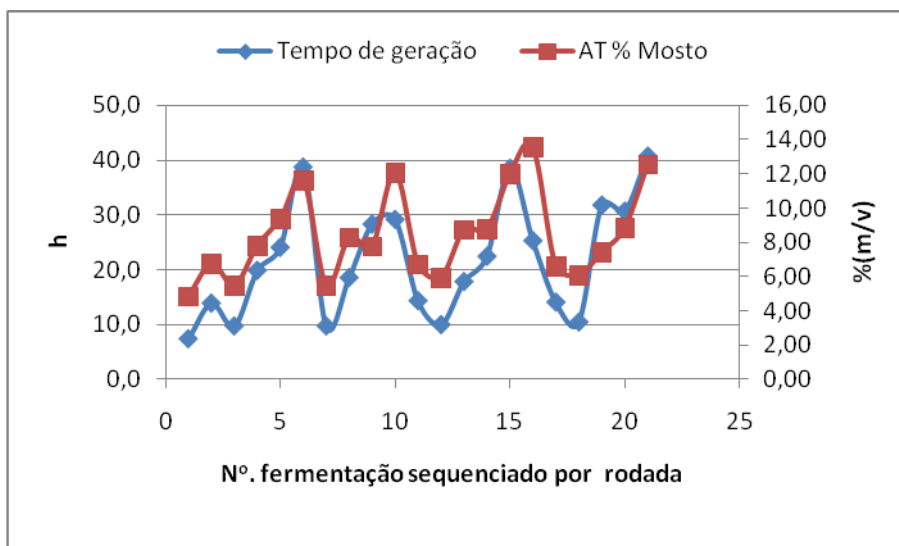


Figura 10 - Valores obtidos de Tempo de Geração expresso em hora *versus* AT % mosto expressos em % m/v durante o período de propagação do levedo.

aumento do Tempo de geração (g) que variou de 7,4 a 40,7 h enquanto para o AT % mosto a variação foi de 4,825 a 12,536 g/100 mL. Neste mesmo sentido pôde – se

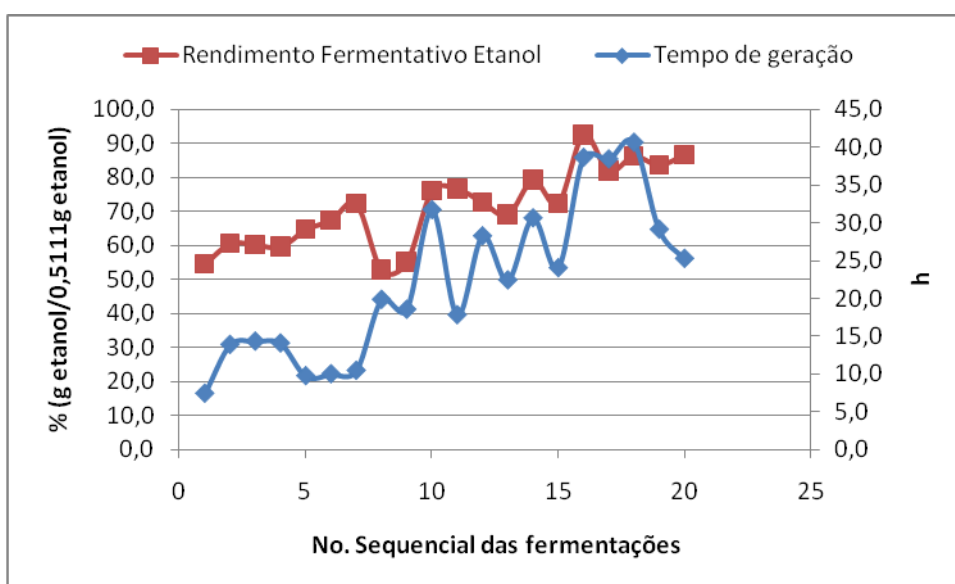


Figura 11 - Resultados obtidos do Rendimento Fermentativo em etanol expresso em g etanol/0,5111 g etanol *versus* Tempo de Geração da levedura expresso em horas, durante o período de propagação do levedo.

obter uma correlação de 0,7675 entre as variáveis Rendimento Fermentativo e Tempo de Geração ou seja a medida que se aumentou a concentração de substrato houve uma maior produção de etanol com conseqüente aumento do Rendimento Fermentativo em detrimento da produção da levedura expressados no aumento do Tempo de geração apresentados na Figura 11.

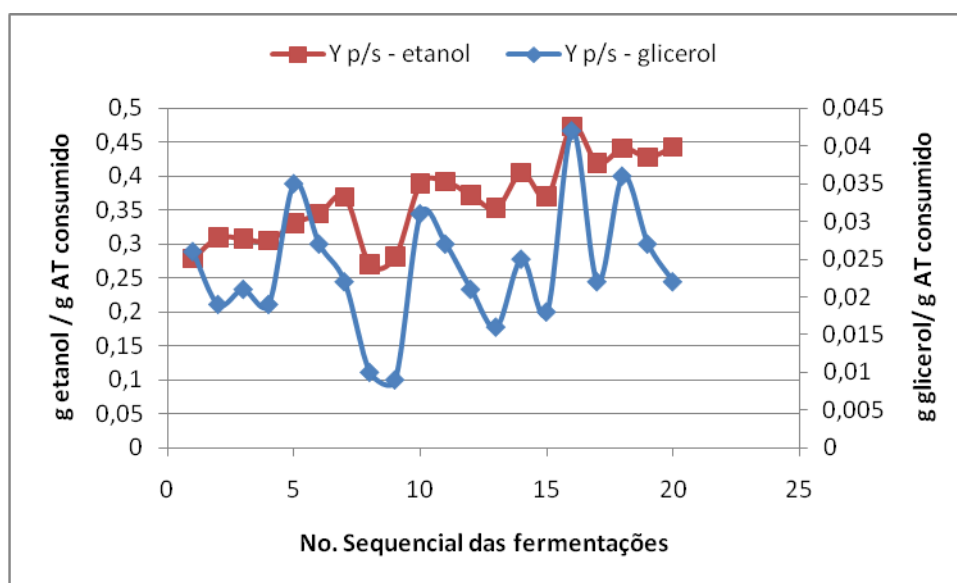


Figura 12 - Valores de Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$  etanol) expresso em g de etanol produzido/g AT versus Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$  glicerol) expresso em g de glicerol produzido/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.

Os dados demonstrados na Figura 12 apresentaram uma correlação de  $r = 0,6247$  entre as variáveis  $Y_{p/s}$  etanol e  $Y_{p/s}$  glicerol, variando de 0,270 a 0,473 g de etanol por g de AT com média de 0,364, enquanto para o produto glicerol houve uma variação de 0,009 a 0,042 g de glicerol por g de AT com média 0,0238, abaixo dos dados obtidos por Oura, 1977, de 0,03 a 0,05 g de glicerol por g de glucose.

Ao estudar os dados das Figuras 13 e 14, esperou-se que o Coeficiente Global de conversão de substrato em células  $Y_{x/s}$  estivesse intimamente correlacionado com a Produtividade de leveduras, porém a correlação entre estas variáveis foi da ordem de  $r = 0,3190$ , pouco significativa, portanto os melhores rendimentos em células estiveram associados às maiores vazões horárias de mosto com baixas concentrações de AT % mosto e não simplesmente com os altos valores de kg de AT/h, estes dados foram confirmados quando avaliados pelas seguintes

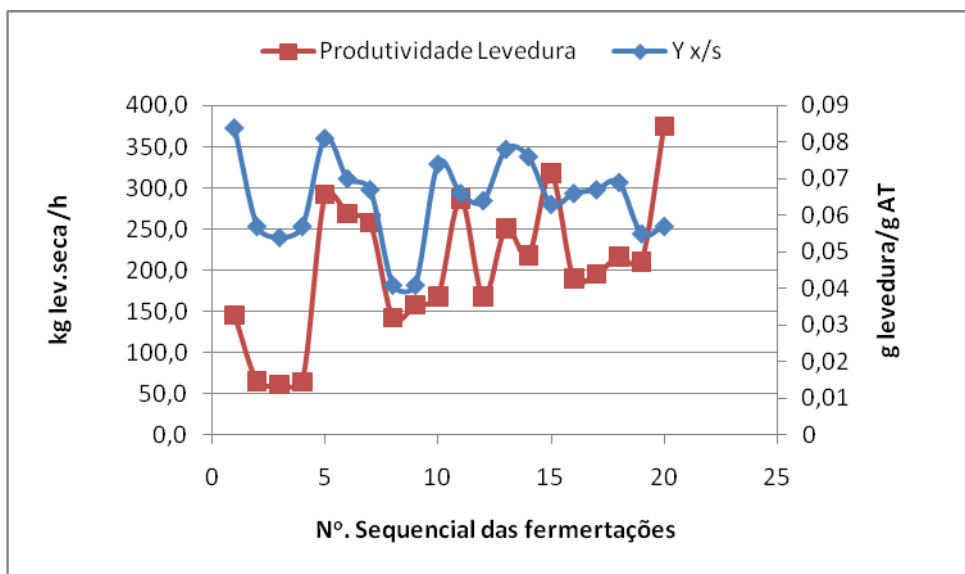


Figura 13 - Valores de Produtividade em levedura seca expressos em kg de leveduras seca/h versus Coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato durante o período de propagação do levedo.

correlações: quantidade de kg de AT alimentado/h do substrato alimentado e  $Y_{x/s}$  foi de  $r = 0,1114$  e também entre a quantidade de kg de AT alimentado/h e  $Y_{p/s}$  etanol foi de  $r = 0,6480$ .

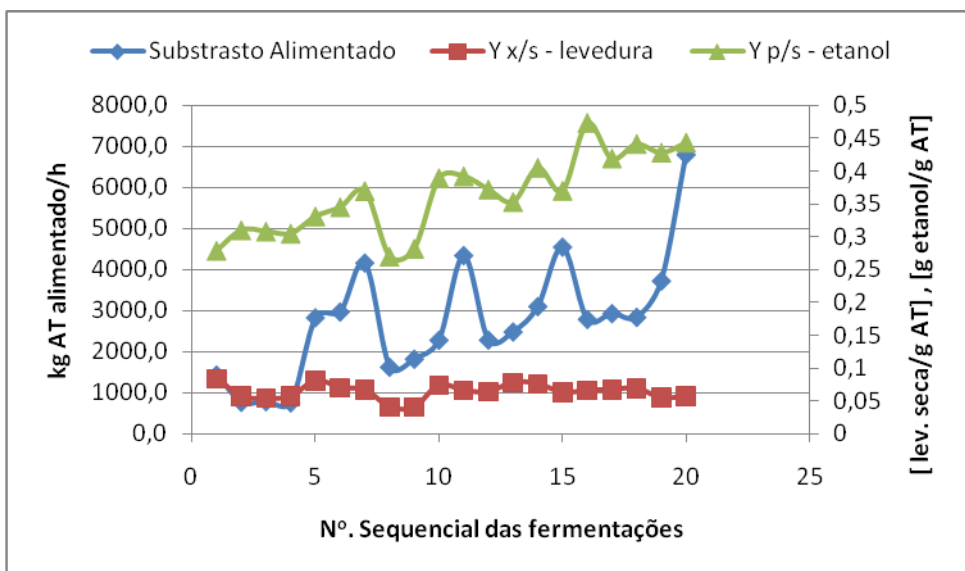


Figura 14 – Valores Substrato alimentado expresso em kg de AT alimentado/h versus coeficiente global de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) expresso em g de levedura seca/g AT consumido do substrato e Coeficiente global de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$  etanol) expresso em g de etanol produzido/g AT consumido.

## 5. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais, podemos concluir que:

- a propagação deveria ser realizada na metade do tempo realizado com maior produtividade em leveduras, trabalhando com vazões limitadas de acordo com o tamanho do fermentador e pré fermentador.
- tempo de reidratação da levedura seca poderia ser reduzido com uma solução fraca de melaço cerca de 1,5 % de AT no mosto.
- durante a propagação do levedo não se deve aumentar a concentração do substrato para economia do combustível no caso o bagaço, pois haverá um desvio na rota metabólica e um aumento no tempo de geração;
- para a economia de bagaço, pode-se começar com uma quantidade de massa celular maior, reduzindo o tempo de propagação e conseqüentemente paradas de moenda no caso de destilaria autônoma;
- é muito arriscado começar a propagação de levedo para a safra com levedura selecionada na fase laboratorial devido aos riscos de se perder a linhagem por contaminação. Na fase industrial, o início com grandes quantidades de leveduras selecionadas, dominantes e persistentes faz com que esta massa seja maior do que a massa de uma levedura indígena.
- as formas de limpeza e sanitização das instalações no período que precede a propagação de levedo deve ser garantida primeiro por um agente químico por não se ter uma garantia que haverá vapor de aquecimento para uma limpeza quente e úmida.
- para reduzir o tempo de propagação do levedo é importante protelar a centrifugação do levedo ao máximo, para evitar perdas durante a centrifugação de levedo quando a massa celular ainda é muito baixa em detrimento da perda de rendimento fermentativo.
- para se ter uma boa propagação de levedo é preciso ter uma boa produtividade em células, mesmo que o rendimento fermentativo seja baixo.

## **6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Após ter realizado este trabalho percebi a necessidade de se estudar a influência do AT % mosto em função do AT % residual no vinho fermentado durante o processo de fermentação batelada alimentada, pois no processo industrial espera-se a dorna “morrer”, ou seja, esgotar o AT do substrato após um período estipulado de alimentação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.G.L.; Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*, Tese mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 1996.

AMORIM, H. V.; SILVA, L.F.; BERNARDINO, C.D.; RÉ, F.E.; FURTADO, C.H.F., Apostila de métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool, FERMENTEC S/C LTDA, 3ª. Edição, Piracicaba, SP, 2003.

ANDRIETTA, S. R.; FERREIRA, E.; ANDRIETTA, M.G., "Avaliação da Influência da Velocidade de Alimentação sobre o Rendimento e Produtividade dos Processos de Produção de etanol Operando em Batelada Alimentada." *Anais do Sinaferm 2003* (2003).

BASSO, L.C. 1991. In: ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. (Tese Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 1994, pgs.199.

BASTOS, R. G.; Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos, EdUFSCar, 2010, São Carlos, SP, pg.88 (Coleção UAB-UFSCar).

BEVAN, D. & BOND, J., 1971. Microorganisms in Field and Mill – a preliminary survey. Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol., 38th Confer., 137-143.

BORGES, P.C.S.; Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada, Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2008.

BRUMM, P.J. & HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. *Biotechnology Letters*, Surrey, 10 (9): 677-82, 1988.

CLARK, M.A. et al., 1980. Sucrose loss in manufacture of cane sugar. *Sugar y Azucar* 75,64-68.

Dionex Application Note 122, The determination of Carbohydrates, Alcohols, and Glycols in fermentation broths. Disponível em <[http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5047-AN122\\_LPN1029-03.pdf](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5047-AN122_LPN1029-03.pdf)> acesso em 27/02/2013, 21:09 h.

FERMENTEC, Apostila: Roteiro para treinamento de controle microbiológico por microscopia, revisão jan/2007, editora Fermentec LTDA, Piracicaba, SP, pgs 5-17.

GALLO, C.R., Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. (Tese Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1989.

GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, SP, v. 48, p. 55-69, 1991.



HAN, K., LEVENSPIEL, O. (1988). Extended Monod Kinetics for Substrate, Product, and Cell Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 430-437.

ICUMSA Methods Book 2011. Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin, Germany, 432pp.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43. (*Biotecnologia Industrial*; v.3)

NEISH, A.C. & BLACKWOOD, A.C. Dissimilation for glucose by yeast at poised hydrogen ion concentrations. *Canadian Journal of Technology Ontario*, 29: 123-9, 1950.

NORDSTROM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's. III. Participation of coenzyme-A. *Journal of Institute of Brewing, London*, 68: 398-407, 1962.

NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. *Acta Chemica Scandinavica, Copenhagen*, 20 (4): 1016-25, 1966.

OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; GARCIA, C.E., Apostila: Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica, FERMENTEC S/C LTDA, Piracicaba, SP, 1999. Pgs 18-19.

OKADA, W.; FUKUDA, H.; MORIKAWA, H., Kinetic expressions of ethanol production rate and ethanol consumption rate in baker's yeast cultivation *J.Ferment. Technol.*, 59:103-109, 1981.

OURA, E., Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry, London*, 12: 19-21, 35, 1977.

PARFAIT, A. & JOURET, C. Le glycerol dans la fermentation alcoolique des melasses et des jus de cannes a sucre. *Industries Alimentaires et Agricoles. Paris*, 97(7/8): 721-4, 1980.

PANCHAL, C.J. & STEWART, G.G. The effect osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *Journal of the Institute of Brewing, London*, 86: 207-10, 1980.

RANKINE, B.C. & BRIDSON, D.A. Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *American Journal of Enology and Viticulture, Davis*, 22: 6-12, 1971.

RADLER, F. & SCHUTZ, H. Glycerol production & various strains of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture, Davis*, 33 (1): 36-40, 1982.

THATIPAMALA, R., ROHANI, S., HILL, G.A.(1992). Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomass and Product Yields During Ethanol Batch Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 289-297.

Roche Diagnostics, 2007. Manual de Instruções Accutrende®Plus

RODINI, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, 1985. 92p.(Mestrado-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”/USP).

SKOLE, R.D. et al., 1977. Microbiology of sugar: a taxonomie study. Tech. Sess. Cane Sugar Refining Res., New Orleans.

TOSETTO, G. M., Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP: [s.n.], 2002.

## ANEXOS

Figura 15 - Laudo analítico comprobatório da levedura selecionada FT 1255 L usada como inóculo na propagação do levedo juntamente com mais duas linhagens dominantes da Usina Alta Mogiana.

### Relatório de Análise Laboratorial



#### Dados de Referência

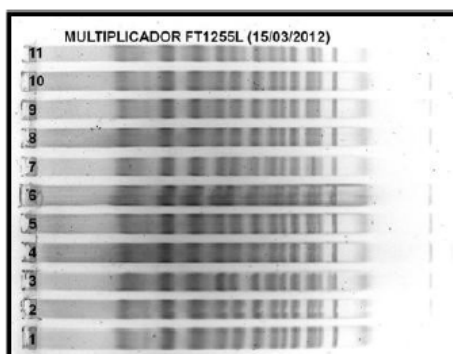
Nome do Cliente:	Alta Mogiana		
Nome do Solicitante:	Cleia Dutra		
Identificação da Fermentec:	Req. 6957		
Amostra(s):	Fermento		
Análise(s):	Cariotipagem		
Responsável pela Coleta:	Fermentec		
Data de Coleta:	15/03/2012	Data de Aprovação do Cliente:	15/03/2012
Data de Entrada no Laboratório:	15/03/2012	Data de Conclusão da Análise:	23/03/2012
Data de Elaboração do Relatório:	23/03/2012	Data de Envio do Relatório:	09/05/2012

#### Plaqueamento

Colônias	Bordo	Cor	Consistência	Brilho	Proporção na Amostra (%)	Perfis Eletroforéticos
Lisas	Regular	Creme	Cremosa	Brilhante	100	1 a 11

#### Cariotipagem

Leveduras Observadas	Proporção na Amostra (%)	Perfis Eletroforéticos
FT1255L	100	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11



Obs.: A amostra apresentou 100% da levedura FT1255L. Amostra multiplicada na Fermentec e enviada para a Usina Alta Mogiana.

#### Referência Metodológica

Cariotipagem - Metodologia Analítica Fermentec cod. CM.200. Rev.04.

Determinação da contagem de leveduras e bactérias pelo método de plaqueamento por superfície (*Spread-Plate*) cod. CM. 232. Rev.02.

Silene Cristina de Lima Paulillo  
Resp. Lab. Biologia Molecular  
CRBio 14871-01

Figura 16 – Análise de cariotipagem das leveduras selecionadas após 17 dias de inoculadas na propagação do levedo da Usina Alta Mogiana.

## Relatório de Análise Laboratorial



### Dados de Referência

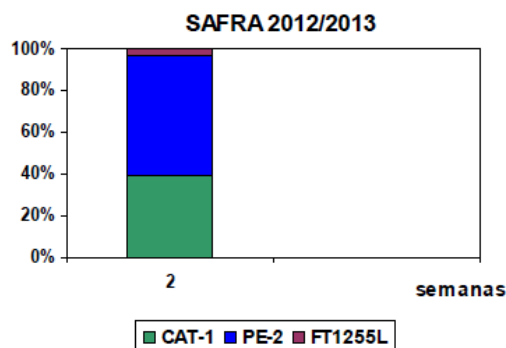
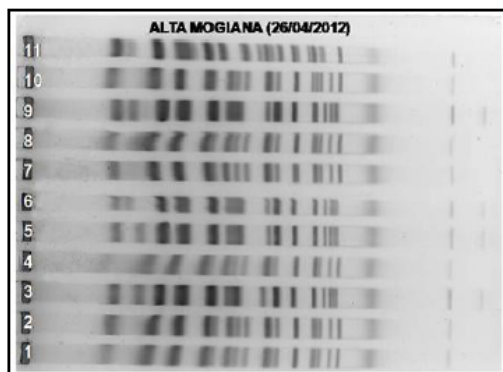
Nome do Cliente:	Alta Mogiana		
Nome do Solicitante:	Cléia C. S. Dutra   Demétrius B. de Freitas   Viviane R. S. Perri		
Identificação da Fermentec:	Req. 7018		
Amostra(s):	Fermento		
Análise(s):	Cariotipagem		
Responsável pela Coleta:	Cliente		
Data de Coleta:	26/04/2012	Data de Aprovação do Cliente:	26/04/2012
Data de Entrada no Laboratório:	27/04/2012	Data de Conclusão da Análise:	16/05/2012
Data de Elaboração do Relatório:	18/05/2012	Data de Envio do Relatório:	24/05/2012

### Plaqueamento

Colônias	Bordo	Cor	Consistência	Brilho	Proporção na Amostra (%)	Perfis Eletroforéticos
Lisas	Regular	Creme	Cremosa	Brilhante	99	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10
Rugosas	Irregular	Creme	Seca	Opaca	1	11

### Cariotipagem

Leveduras Observadas	Proporção na Amostra (%)	Perfis Eletroforéticos
PE-2	59	1,2,4,7,8,10
CAT-1	40	3,5,6,9
FT1255L	1	11



**Obs.:** A amostra apresentou 99% das leveduras selecionadas PE-2 e CAT-1 e 1% da levedura personalizada FT1255L multiplicada na Fermentec.

Início da multiplicação: 09/04/2012. Leveduras utilizadas: PE-2 (500 kg), CAT-1 (500 kg) e FT1255L (5 kg).

### Referência Metodológica

Cariotipagem - Metodologia Analítica Fermentec cod. CM.200. Rev.04.

Determinação da contagem de leveduras e bactérias pelo método de plaqueamento por superfície (*Spread-Plate*) cod. CM. 232. Rev.02.

Silene Cristina de Lima Paulillo  
Resp. Lab. Biologia Molecular  
CRBio 14871-01

Figura 17 – Análise de cariotipagem das leveduras selecionadas geneticamente após 31 semanas de inoculadas na propagação do levedo da Usina Alta Mogiana.

## Relatório de Análise Laboratorial



### Dados de Referência

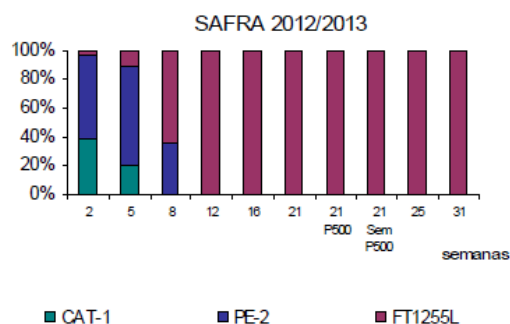
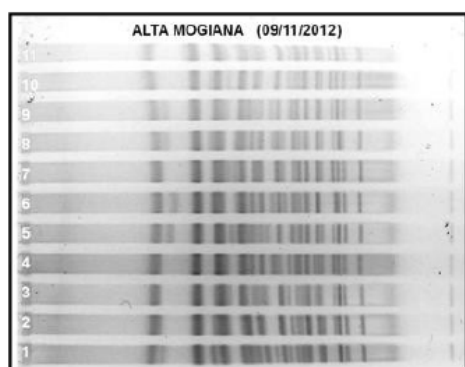
Nome do Cliente:	Alta Mogiana		
Nome do Solicitante:	Cleia C. S. Dutra   Demétrius B. Freitas   Viviane Perri   Marcelo Chedid		
Identificação da Fermentec:	Req. 7805		
Amostra(s):	Fermento		
Análise(s):	Cariotipagem		
Responsável pela Coleta:	Fermentec		
Data de Coleta:	09/11/2012	Data de Aprovação do Cliente:	09/11/2012
Data de Entrada no Laboratório:	12/11/2012	Data de Conclusão da Análise:	23/11/2012
Data de Elaboração do Relatório:	23/11/2012	Data de Envio do Relatório:	29/11/2012

### Plaqueamento

Colônias	Bordo	Cor	Consistência	Brilho	Proporção na Amostra (%)	Perfis Eletroforéticos
Rugosas	Irregular	Creme	Seca	Opaca	100	1 a 11

### Cariotipagem

Leveduras Observadas	Proporção na Amostra (%)	Perfis Eletroforéticos
FT1255L	100	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11



**Resultado:** A amostra apresentou 100% da levedura personalizada FT1255L. Os perfis 1,4 e 6 apresentam muitos rearranjos cromossômicos

Início da multiplicação: 09/04/2012. Leveduras utilizadas: PE-2 (500 kg), CAT-1 (500 kg) e FT1255L (5 kg).

### Referência Metodológica

Cariotipagem - Metodologia Analítica Fermentec cod. CM.200. Rev.05.

Determinação da contagem de leveduras e bactérias pelo método de plaqueamento por superfície (*Spread-Plate*) cod. CM. 232. Rev.02.

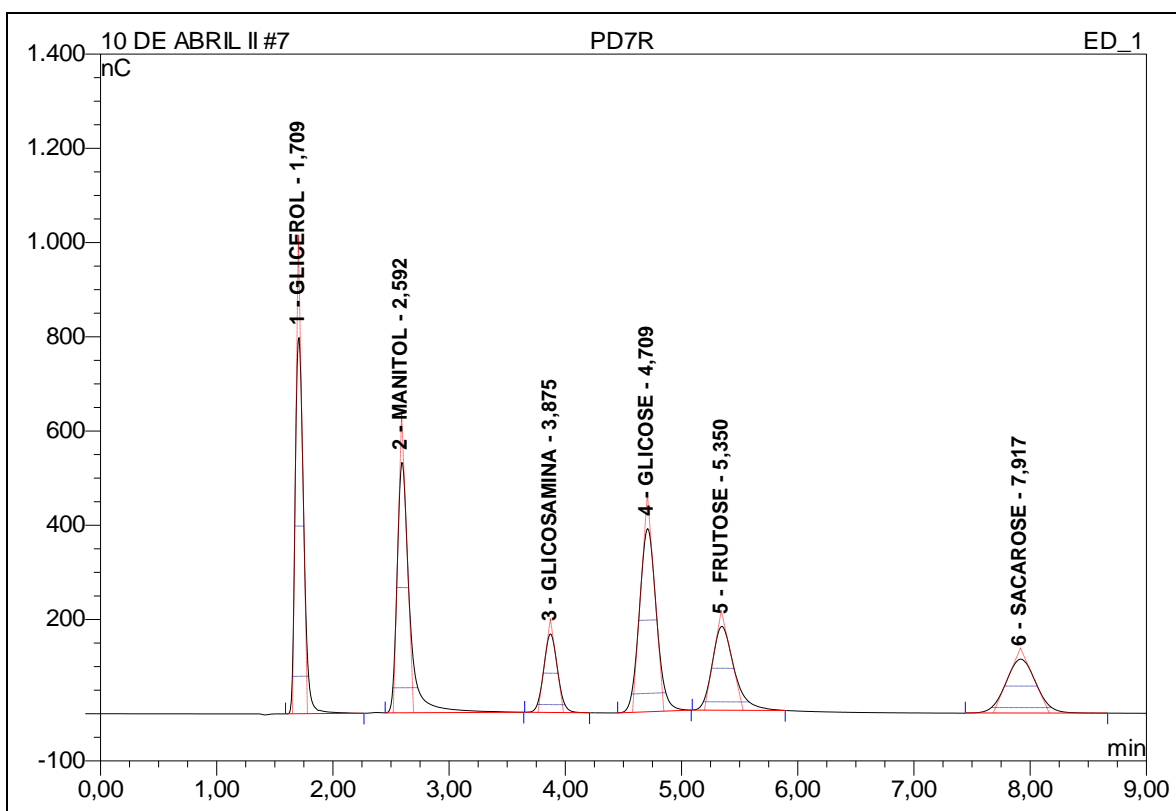
Ariane Mendes Ferreira  
Responsável pela Análise

Silene Cristina de Lima Paulillo  
Resp. Lab. Biologia Molecular  
CRBio 14871-01

Figura 18 – Dados de análise de picos de uma curva de calibração interna do cromatógrafo de íons ICS 3000.

### Peak Analysis Report

Sample Name:	PD7R	Inj. Vol.:	25,0
Sample Type:	standard	Dil. Factor:	1,0000
Program:	FERMENTEC	Operator:	n.a.
Inj. Date/Time:	10.04.12 15:09	Run Time:	9,00



No.	Time min	Peak Name	Width min	Height nC	Resol. (USP)	Resol. (EP)	Plates (USP)	Plates (EP)	Asymmetry
1	1,709	GLICEROL	0,129	798,220	5,799	5,748	2793	2614	1,272
2	2,592	MANITOL	0,175	531,176	6,487	6,556	3497	3531	1,622
3	3,875	GLICOSAMINA	0,220	166,558	3,401	3,446	4950	5052	1,043
4	4,709	GLICOSE	0,270	388,767	2,129	2,156	4878	4983	1,091
5	5,350	FRUTOSE	0,333	177,744	6,296	6,352	4126	4207	1,313
6	7,917	SACAROSE	0,482	114,262	n.a.	n.a.	4314	4346	1,050
		AVERAGE:	0,268	362,788	4,822	4,852	4.093,	4.122,	1,232

Figura 19 – Exemplo de um cromatograma de uma amostra de mosto realizada em cromatógrafo de íons durante a propagação do levedo.

Sample Name:	<b>MOSTO 00:00</b>	Inj. Vol.:	<b>25,0</b>
Sample Type:	<b>unknown</b>	Dilution Factor:	<b>2000,0000</b>
Program:	<b>FERMENTEC</b>	Operator:	<b>n.a.</b>
Inj. Date/Time:	<b>10.04.12 01:13</b>	Run Time:	<b>8,90</b>

No.	Time min	Peak Name	Type	Area nC*min	Height nC	Amount %
1	1,77	GLICEROL	BMB	0,349	3,082	0,0048
2	2,63	MANITOL	BMB	0,673	4,072	0,1043
3	3,88	GLICOSAMINA	BMB	23,083	165,454	0,0005
4	4,72	GLICOSE	BMB	8,479	48,700	0,5562
5	5,41	FRUTOSE	BMB	5,513	23,024	0,7260
6	7,91	SACAROSE	BMB	35,583	116,593	4,4311
<b>TOTAL:</b>				<b>73,68</b>	<b>360,92</b>	<b>5,82</b>

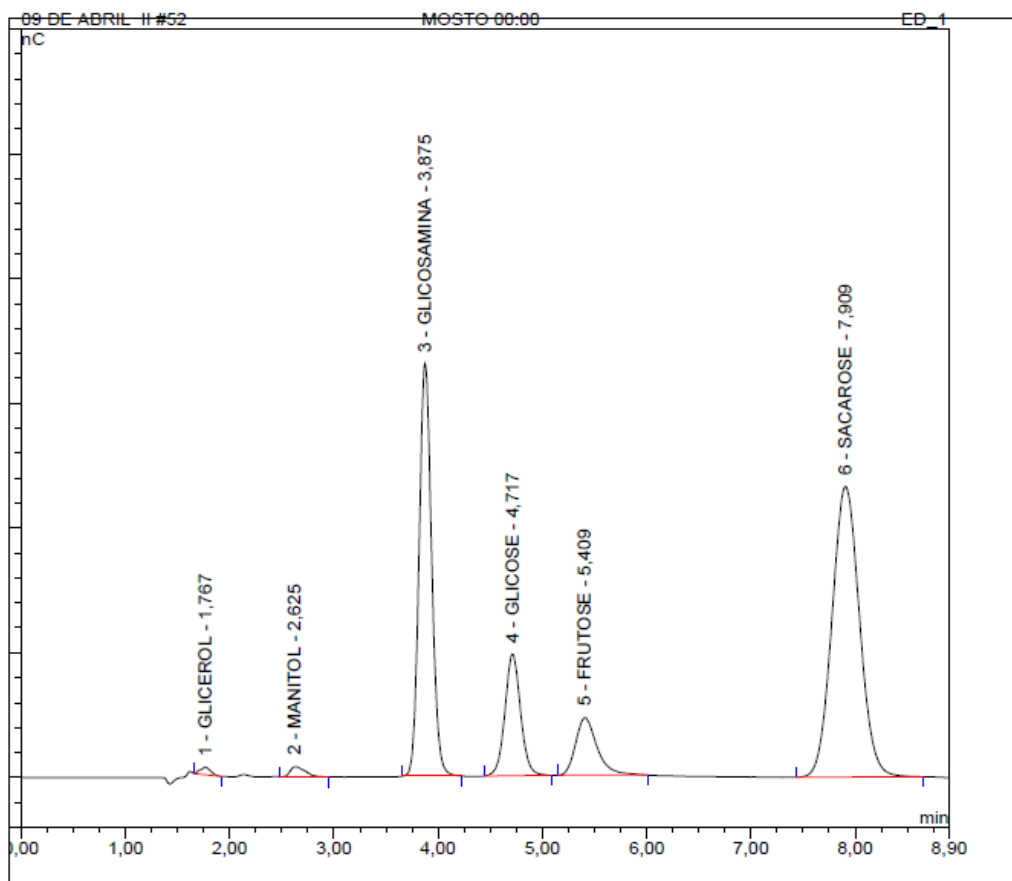


Figura 20 – Exemplo de um cromatograma de uma amostra de vinho fermentado realizada em cromatógrafo de íons durante a propagação do levedo.

Sample Name:	DORNA 3 16:00	Inj. Vol.:	25,0
Sample Type:	unknown	Dilution Factor:	200,0000
Program:	FERMENTEC	Operator:	n.a.
Inj. Date/Time:	10.04.12 16:35	Run Time:	9,00

No.	Time min	Peak Name	Type	Area nC*min	Height nC	Amount %
1	1,71	GLICEROL	BMB	30,888	365,706	0,1615
5	2,60	MANITOL	bMB	5,072	37,893	0,0328
6	3,88	GLICOSAMINA	BMB	23,698	169,119	0,0005
7	4,72	GLICOSE	BMB	9,835	54,175	0,0579
8	5,37	FRUTOSE	BMB	17,295	77,648	0,1774
9	7,90	SACAROSE	BMB	5,083	14,602	0,0547
TOTAL:				91,87	719,14	0,48

