



Ciência e Natura

ISSN: 0100-8307

cienciaenaturarevista@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria  
Brasil

Batistote, Margareth; Lima Cardoso, Claudia Andrea; Doffinger Ramos, Dayane;  
Ernandes, José Roberto  
Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de  
etanol em mosto a base de cana de açúcar  
Ciência e Natura, vol. 32, núm. 2, 2010, pp. 83-95  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467546358006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar

Margareth Batistote<sup>1</sup>, Claudia Andrea Lima Cardoso<sup>1</sup>,  
Dayane Doffinger Ramos<sup>1</sup>, José Roberto Ernandes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa em Biodiversidade,  
Universidade Estadual do Mato Grosso Sul, Dourados, MS

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica  
Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP  
e-mail: margareth@uem.br

## Resumo

O processo de produção de álcool combustível no Brasil utiliza a sacarose na forma de caldo de cana ou melão como substrato para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que resulta em alta produção de etanol. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nas usinas sucroalcooleiras da região sul do estado de Mato Grosso do Sul. As principais linhagens utilizadas nas usinas da região são: Catanduva 1, Pedra 2, Barra Grande 1 e Fleischmann. As análises microbiológicas mostraram semelhanças entre os aspectos morfológicos, bioquímicos e fermentativos analisados nas linhagens. A linhagem que apresentou melhor desempenho fermentativo foi a Catanduva 1; as linhagens Pedra 2 e Barra Grande 1 apresentaram respostas semelhantes e a que apresentou menor fermentação foi a linhagem Fleischmann. Este estudo mostrou que a caracterização do potencial das linhagens de leveduras no processo fermentativo pode aumentar a produção de etanol.

**Palavras-chave:** sucroalcooleiro, mosto, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol.

## Summary

The process of ethanol production in Brazil uses sucrose as the sugar cane juice or molasses as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* which results in high production of ethanol. This study aims to evaluate the biotechnological potential of strains of *Saccharomyces cerevisiae* used in sugarcane mills in the southern region of Mato Grosso do Sul, the main

power strain used in the region are: Catanduva 1, Pedra 2, Barra Grande 1 and Fleischmann. Microbiological analysis showed similarities between aspects analyzed in the strains. The strains that showed the best fermentation performance was Catanduva 1, strain Pedra 2 and Barra Grande 1 showed the same response and the lower fermentation was showed in the lineage Fleischmann. This study presented that the characterization of the potential of yeast strains in the fermentation process can increase ethanol production.

**Keywords:** sugarcane mills, must, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol.

## Introdução

Devido aos efeitos das alterações climáticas e da volatilidade dos compostos oriundos do petróleo, as nações de todo o mundo estão, cada vez mais, adotando políticas para promover o uso de fontes renováveis de energia (Robertson *et al.*, 2008). Entre as alternativas mais viáveis, o etanol se destaca como um biocombustível de referência, porque sua produção é baseada em uma comprovada plataforma tecnológica.

Os Estados Unidos e o Brasil são os principais produtores de bioetanol e dividem 70% do mercado mundial, embora seus sistemas de produção difiram em muitos aspectos (Sanderson, 2006; Goldemberg, 2007). Na América do Norte, o bioetanol é atualmente produzido a partir, principalmente, de amido hidrolisado enzimaticamente (Gura, 2009).

O sistema brasileiro utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima, uma gramínea tropical que acumula sacarose, a qual é convertida em etanol diretamente pela levedura *S. cerevisiae* sem pré-tratamento enzimático. Entre outras vantagens, a cana-de-açúcar é preferencial pela ação simbiótica e a fixação de nitrogênio por microrganismos, permitindo que este sistema produza oito vezes mais energia (Goldemberg, 2007; Robertson *et al.*, 2008).

O processo de produção do etanol no Brasil utiliza a sacarose proveniente da cana-de-açúcar, na forma de caldo de cana e melaço, como substrato para fermentação. Esta fermentação ocorre pela ação de células de *S. cerevisiae* que são reutilizadas ao longo de toda a safra. Atualmente o número de destilarias de álcool vem aumentando devido ao aumento da demanda deste combustível.

Durante os processos de fermentação industrial, as leveduras passam por diversas formas de stress (Banat *et al.*, 1998; Brosnan *et al.*, 2000). O ambiente de fermentação é complexo, principalmente em processos que utilizam o caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima. Nesse sistema, ocorre uma sucessão intensiva de linhagens de *S. cerevisiae* no mosto de fermentação. No processo fermentativo, quando o fermento original é substituído por linhagens selvagens, as cepas selvagens podem se tornar mais

adaptadas ao processo fermentativo. Em alguns casos, o fermento original é completamente substituído por linhagens selvagens *S. cerevisiae* (Silva-Filho *et al.*, 2005).

Nas destilarias de álcool combustível, as leveduras são separadas do mosto por centrifugação. Em seguida, o fermento é submetido a um tratamento ácido (ácido sulfúrico – 2N) antes de ser submetido a uma nova fermentação (Silva-Filho *et al.*, 2005). Esse procedimento pode comprometer a viabilidade das células e conseqüentemente provocar uma queda no rendimento da fermentação (Brosnan *et al.*, 2000, Basso *et al.*, 2008). A busca por processos ainda mais eficientes para obtenção do etanol, a partir da cana de açúcar, envolve entre outros fatores a seleção de cepas mais produtivas como as cepas industriais de *S. cerevisiae* CAT-1, PE-2, BG-1, SA-1 e Y904, (Basso *et al.*, 2008).

O setor sucroalcooleiro tem apresentado uma grande expansão de desenvolvimento em vários estados brasileiros.

No Estado de Mato Grosso do Sul, este grande potencial para o crescimento do setor sucroalcooleiro ocorre em grande parte por apresentar uma grande área territorial e, além disso, por possuir clima e solo propícios para o cultivo da cana-de-açúcar. Outro motivo foi a criação de programas de incentivos fiscais (Famasul, 2009).

O Estado possui 14 usinas sucroalcooleiras instaladas e, destas, a maioria está situada na região sul do Estado (Figura 1). Segundo site do Canal da Cana, as Secretarias Estaduais da Produção, Indústria, Comércio e Turismo (Seprotur) estão prevendo, para o período de 2010-2013, um total de onze novas usinas em funcionamento no Estado, o que vem fazendo com que o Estado do Mato Grosso do Sul se torne um novo pólo industrial no setor (Jornal Informe Agropecuário, 2009). Portanto, é necessária a realização de estudos que caracterizem o potencial das diferentes linhagens de leveduras utilizadas nas usinas implantadas no Estado, já que estas são o componente essencial nos processos fermentativos para a produção de etanol.

O presente trabalho visa avaliar o potencial biotecnológico das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas nas usinas do Estado de Mato Grosso do Sul na produção de etanol.

## **Materiais e métodos**

As linhagens estudadas, obtidas através da empresa LNF Latino Americana Biotecnologia Aplicada, localizada (Rua Fioravante Pozza, 198) em Bento Gonçalves, RS, foram: Catanduva 1 (CAT), Fleischmann, (FLE), Barra Grande 1 (BG) e a Pedra 2 (PE) utilizadas por algumas das usinas da região Sul do Estado do Mato Grosso do Sul, na safra de 2008. O

levantamento junto às usinas foi realizado através de um questionário enviado on-line.

Para o crescimento e o acompanhamento das populações de leveduras, o meio de cultivo utilizado foi YPD, contendo 1,0% de extrato de levedo, 1,0% de peptona e 2,0% de glicose. Em seguida, foi realizada diluição seriada em solução salina 0,85% até  $1.10^5$  cel/mL, e 0,1 mL das diluições foram plaqueadas por espalhamento na superfície do meio sólido YPSI (1,0% de extrato de levedo, 1,0% de peptona, 2,0% sacarose e 2,0% agar), na presença de corante rosa bengala (0,003%) e ácido propiônico (0,19%). As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 72 horas. Após o período de crescimento, as linhagens foram submetidas as análises morfológicas.

Para o preparo do pré-inoculo, foi utilizado o meio clássico de cultivo YPSAC 5%, contendo 1,0% de extrato de levedo; 1,0% de peptona; 5,0% sacarose, com pH ajustado para 5,0 com (ácido clorídrico 1N) e esterilizados em autoclave 120°C por 20 minutos. Os frascos contendo as leveduras foram incubados em “shaker” modelo CT-712R, por 24h a 30°C a 200rpm. Após o crescimento as células, foram coletadas por centrifugação (800g, 20min), ressuspendida e lavadas por três vezes consecutivas em solução salina (0,85%) estéril, a uma concentração de 10 mg/mL massa úmida.

Os ensaios de fermentação foram realizados no mosto de caldo de cana esterelizado na concentração de 15°Brix sem correção do pH, em erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do mosto e incubados 30°C, sem agitação em estufa por 16 horas. Em tempos determinados durante o crescimento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas), alíquotas foram retiradas para análises dos parâmetros fermentativos tais como: biomassa, viabilidade, açúcar residual e etanol.

As análises do crescimento celular foram realizadas através de medidas espectrofotométricas a 570nm, correlacionada com curva de calibração.

A determinação da viabilidade celular foi acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (Lee *et al.*, 1981).

O Consumo dos açúcares redutores totais (ATR) foi determinado através do método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959).

A concentração do etanol foi determinada no cromatógrafo a gás CG 3900 com detector de ionização de chama (Varian), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento (ZB-5). A condição cromatográfica empregada foi: volume de injeção 1µL, razão de split 1:20 e temperatura do forno de 90°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C. As amostras foram filtradas em ultrafiltro de 0,22µm.



Figura 1. Mapa do Estado de Mato Grosso do Sul com as usinas implantadas na região sul no ano de 2008. Fonte: Dayane Doffinger

## Resultados e discussão

O levantamento das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas nas destilarias do Estado foi obtido através de um questionário enviado on-line às usinas. Das quatorze usinas inquiridas, 8 responderam os questionários, mostrando que as linhagens mais utilizadas nas usinas, na safra de 2008, no Estado do Mato Grosso do Sul foram às linhagens: Catanduva 1 (CAT), Pedra 2 (PE), Barra Grande 1 (BG) e Fleishmann (FLE) (Figura 2).

O processo de produção de álcool combustível no Brasil difere de outras fermentações industriais. Existem duas peculiaridades em relação a este tipo de fermentação: a primeira é que o mosto a ser fermentado não é submetido a tratamento prévio para a remoção da microbiota nativa da cana-de-açúcar. A segunda são os números de ciclos fermentativos, nos quais as

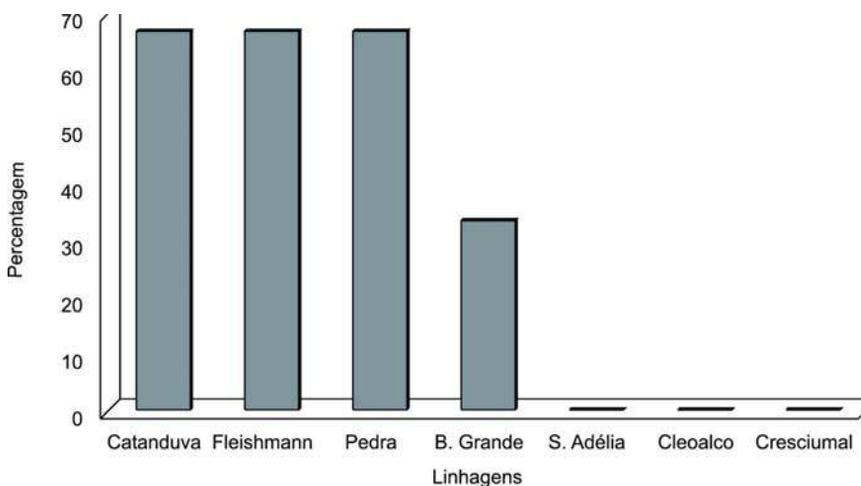


Figura 2. Percentual das principais linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas nas destilarias da região sul do Estado do Mato Grosso do Sul.

leveduras são reutilizadas durante toda a safra. Ultimamente, grandes volumes de linhagens de *Saccharomyces* são isoladas durante o processo fermentativo em destilarias brasileiras e vêm sendo utilizadas como pré-inóculo em diversas unidades industriais. As leveduras isoladas são caracterizadas e sendo boas fermentadoras são utilizadas, como biomassa tanto na unidade em que foi isolada, quanto em outras unidades durante toda a safra. Com isso, a utilização de leveduras isoladas no processo e posteriormente selecionadas constitui uma alternativa viável na iniciação da temporada industrial (Amorim, 2005; Andrietta *et al.*, 2006). As linhagens nas Usinas costumam receber os nomes referentes às iniciais das unidades onde foram isoladas como: BG-1 (Usina Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciumal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), entre outras.

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

Embora a utilização de leveduras selecionadas seja uma alternativa viável para o início da safra, fazer uso de leveduras provenientes do próprio processo é a expectativa para o futuro das usinas. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de álcool está relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo (Stroppa, 2002).

Neste trabalho, a análise microbiológica caracterizou os aspectos morfológicos das colônias entre as linhagens analisadas. Das quatro linhagens submetidas à análise, 100% apresentaram crescimento de colônias com aspectos morfológicos semelhantes entre si (Tabela 1). Os dados mostraram que houve uma variação de tamanho entre as colônias de < 1mm a 2mm e todas as linhagens apresentaram uma textura brilhante. A cor predominante foi branca, com exceção da linhagem Fleischmann que apresentou coloração rosa. A superfície das colônias apresentou-se lisa para a maioria das leveduras, sendo o mesmo observado para os bordos. A elevação predominante foi do tipo convexa. As análises dos aspectos morfológicos, mostraram que as estirpes apresentaram crescimento satisfatório, entretanto a linhagem Pedra 2 apresentou colônias pequenas, porém em maior quantidade, enquanto a levedura Fleischmann apresentou colônias grandes, mas em menor quantidade. As características morfológicas das leveduras variaram, refletindo comportamento morfológico, fisiológico e bioquímico, resultante da variabilidade existente para gênero e mesmo entre espécies.

Os resultados da pesquisa realizada durante 03 safras consecutivas (2002, 2003 e 2004), referentes às características de 300 leveduras selvagens que contaminaram 46 destilarias, mostraram que as leveduras identificadas pela cariotipagem formavam colônias de borda lisa (57%) ou rugosa (43%). Todas as leveduras com borda rugosa apresentaram problemas na fermentação de onde foram isoladas, tais como espuma em excesso, floculação e/ou sobra de açúcar no vinho. Entre as leveduras de colônias de borda lisa, 65% apresentaram pelo menos um dos problemas citados (Fermentec news, 2009).

**Tabela 1.** Caracterização morfológica das colônias de leveduras avaliadas em meio YPD 2% na presença do corante rosa bengala (0,003%) e ácido propiônico (0,19%).

Linhagens	Catanduva1	Fleischmann	Pedra 2	Barra Grande1
Diâmetro (mm)	1	2	<1	1-2l
Textura	brilhante	brilhante	brilhante	brilhante
Cor	branca	rosa	branca	branca
Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa
Bordo	liso	liso	liso	liso
Elevação	convexa	convexa	convexa	convexa

Nas análises dos parâmetros morfológicos, 100% das colônias analisadas apresentaram bordas lisas. Também não apresentaram problemas na fermentação, tais como excesso de espuma e açúcar além do mecanismo de floculação onde as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada, fenômeno comum nas dornas de fermentação.

Os estudos dos efeitos da fermentação de leveduras crescidas em mosto a base de caldo de cana na concentração de 15°Brix, partindo de um pré-inoculo (10mg/mL), são importantes à medida que os mostos são os principais substratos utilizados nas destilarias brasileiras para a produção de etanol combustível. A busca por processos fermentativos mais eficientes e por entender a capacidade metabólica de utilização de sacarose pelas diferentes linhagens industriais pode ser um dos fatores importantes para promover melhoria na eficiência fermentativa das leveduras industriais e melhorar a produção de etanol.

As figuras 3 a 6 mostram os parâmetros fermentativos das linhagens de leveduras crescidas no mosto, na concentração de 15° Brix durante um período 12 horas de fermentação, nos intervalos de 2 horas. Estas análises demonstraram que as linhagens apresentaram diferenças no perfil fermentativo. A linhagem que apresentou melhor desempenho fermentativo foi a levedura Catanduva 1 e um baixo desempenho fermentativo foi obtido com a linhagem Fleischmann ( Figura 3-4).

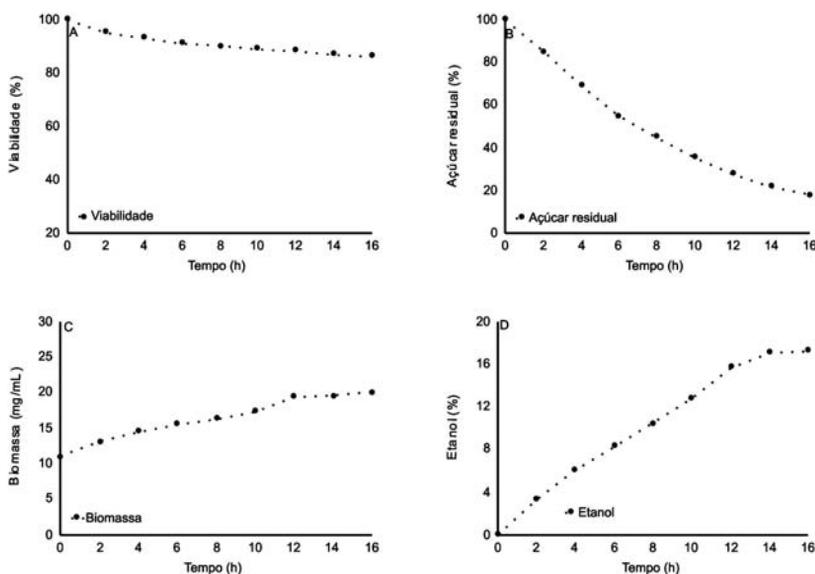


Figura 3. Parâmetros de viabilidade (A), açúcar residual (B), biomassa (C) e etanol (D) da linhagem *S. cerevisiae* Catanduva 1 a 30°C.

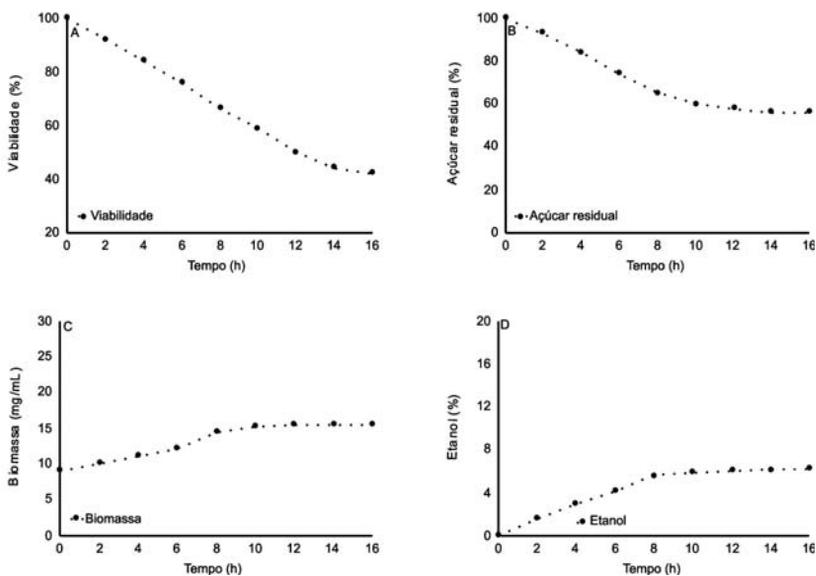


Figura 4. Parâmetros de viabilidade (A), açúcar residual (B), biomassa (C) e etanol (D) da linhagem *S.cerevisiae* Fleischmann a 30°C.

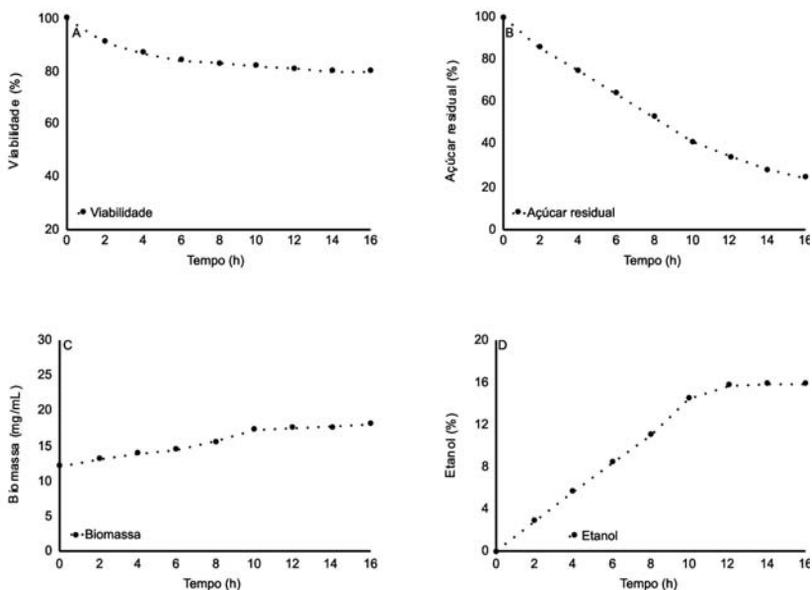
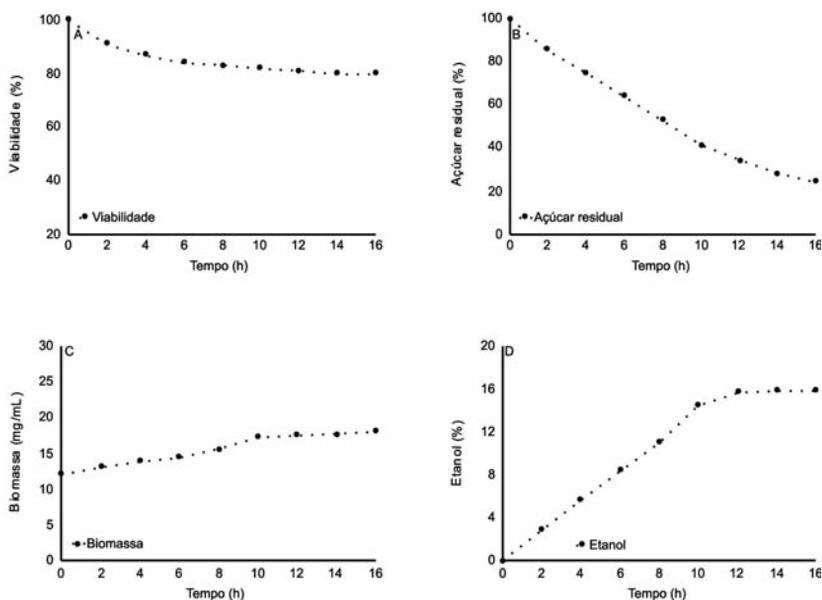


Figura 5. Parâmetros de viabilidade (A), açúcar residual (B), biomassa (C) e etanol (D) da linhagem *S. cerevisiae* Pedra 2 a 30°C



**Figura 6.** Parâmetros de viabilidade (A), açúcar residual (B), biomassa (C) e etanol (D) da linhagem *S. cerevisiae* Barra Grande 1 a 30°C.

No estudo do potencial fermentativo, a linhagem Catanduva 1 apresentou a melhor eficiência na produção de biomassa no período de 10 a 12 horas de fermentação, manteve uma elevada viabilidade celular, com valores médio de 88%, alto consumo de açúcar e uma produção de 16% (v/v) de etanol, sendo a linhagem que apresentou um melhor desempenho nas condições estudadas (Figura 3).

Embora a linhagem Fleishmann tenha apresentado um bom crescimento celular no período de 6 a 8 horas de fermentação, apresentou uma grande perda da viabilidade celular, valor médio de 66%, baixo consumo de açúcar e uma baixa produção de etanol 5% (v/v), o que reflete um baixo rendimento fermentativo (Figura 4).

A taxa de crescimento da linhagem Pedra 2 foi de 6mg/mL no período de 8 a 10 horas de fermentação, mostrou uma alta taxa da viabilidade celular, em torno de 82%, bom consumo de açúcar e uma produção de 14%(v/v) de etanol, apresentando bom rendimento fermentativo nas condições estudadas (Figura 5).

Para os parâmetros bioquímicos analisados, a linhagem Barra Grande 1 apresentou um bom crescimento celular no período de 8 a 10 horas de fermentação, manteve a viabilidade celular em torno de 82% , um bom consumo de açúcar e uma produção de 14%(v/v) de etanol, sendo possí-

vel considerar essa linhagem como de elevado rendimento fermentativo (Figura 6).

Observou-se, com estes experimentos, que os parâmetros bioquímicos analisados apresentaram uma cinética diferente em todas as etapas da produção de etanol, pelas linhagens de levedura estudadas. As diferenças da eficiência fermentativa entre as linhagens pode estar relacionada à resposta da repressão catabólica que tem forte influência no desempenho das leveduras, uma vez que as leveduras de destilarias, durante o processo de fermentação, estão expostas a vários fatores de stress, sofrem fortes pressões catabólicas, resultando em queda de rendimento de etanol.

Em seus estudos, Messias *et al* (2009) analisou a cinética de produção de biomassa e consumo de açúcar das linhagens Catanduva-1 e Barra Grande, crescidas em meio sintético (YNB 17%), acrescido de 22% de sacarose, suplementado com 1% de diferentes fontes de nitrogênio (peptona, casaminoácidos e sulfato de amônio). As linhagens estudadas cresceram mais no meio suplementado com peptona, obtendo-se uma biomassa de 4mg/mL para as duas linhagens. Comparando esses resultados, na forma estática, com os obtidos neste estudo, observou-se que o mosto apresentou melhor produção de biomassa que o meio sintético.

## **Conclusão**

Nas análises morfológicas, as leveduras apresentaram-se semelhantes entre si.

Os dados mostraram que as linhagens de leveduras cultivadas em mosto a base caldo de cana na concentração de 15° Brix apresentaram performances fermentativas diferentes. A linhagem que apresentou o maior desempenho fermentativo foi a levedura Catanduva 1 e a que apresentou menor desempenho fermentativo foi a linhagem Fleischmann. As linhagens Pedra 2 e Barra Grande1 apresentaram perfis fermentativos semelhantes.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao apoio financeiro recebido da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Usina ETH – Bionergia, pelo mosto fornecido e à Empresa LNF, Latino Americana Biotecnologia Aplicada, pelas amostras enviadas.

## Referências bibliográficas

- AMORIM, V.A. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. Piracicaba: FERMENTEC. 434p, 2005.
- ANDRIETTA, M. G. S; STECKELBERG, C. E ANDRIETTSA .S.R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. *MultiCiências*, v.7, p. 1-16, 2006.
- BANAT, I.M., NIGAM, P, SINGH, D. MARCHANT, R., MCHALE, A.P. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I : Yeasts ingenral. *Word Journal Microbiology Biotechnology*, v.13, p. 808-821, 1998.
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J. , LOPES, L. M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v.8, p.1155-1163, 2008.
- BROSNAM, M. P, DONNELLY, D., JAMES, T.C., BOUD, U. The estress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *Journal of Appied Microbiology*, v.88, p.746-755, 2000.
- FAMASUL.Federação da agricultura e pecuária de MS. Disponível na internet no endereço <http://www.famasul.com.br/index.php?ir=famasul/visualizar.php&comissao=9&pcodigo=129>, (acesso 05 Março de 2009). 2009a
- FERMENTEC NEWS, Criado em 13/04/2005. Disponível na internet no endereço <http://www.fermentec.com.br/br/news/Fermentec%20News%2002%20-%202005.pdf>, (acesso 02 de dezembro de 2009).2009b.
- GOLDEMBERG , J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, v.315, p.808-810, 2007.
- GURA, TDriving biofuels from field to fuel tank. *Cell*, v.138, p.9-12, 2009.
- JORNAL CANA. Adecoagro inaugura Angélica Agroenergia em MS. Disponível na internet no endereço <http://www.truman.com.br/htm/noticias/noticias.php>,(Acesso 02 de dezembro de 2009).2009 a.
- JORNAL INFORME AGROPECUÁRIO. Com unidade do Grupo Dreyfus, MS conta com 14 usinas de álcool. Disponível na internet no endereço <http://www.srcg.com.br/noticias.php?id=3182>,(acesso 10 Março de 2009). 2009a.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of east viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v.11, p. 641-649, 1981.

MESSIAS, JR. M., BATISTOTE., CILLI, M.F. ERNADES, J.R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. *Journal of the Institute of Brewing*, v.115, p.191-197,2009.

MAIA, A. B. R. A. Fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*: desenvolvimento de um novo sistema e novas concepções sobre a formulação de meios. Tese (Doutorado em microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1992.

MILLER, G. L.; Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*,v.31, p. 426-430,1959.

ROBERTSON GP, DALE VH., DOERING OC, HAMBURG SP, MELILLO JM., WANDER MM, PARTON WJ., ADLER PR., BARNEY JN., CRUSE RM. Agriculture.Sustainable biofuels redux. *Science*, v.322, p.49-50, 2008.

SANDERSON, K. 2006. US biofuels: A field in ferment. *Nature*, v.444, p.673-676,2006.

SILVA-FILHO, E.A., SANTOS, S.K.B., RESENDE, A.M., MORAIS. J.O.F., MORAIS. Jr. M.A., SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics on industrial fuel ethanol fermentation processes assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.88, p.13-23, 2005.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação alcóolica. In: CARDOSO, M das G. *Produção de aguardente de cana-de-açúcar*. Lavras: UFLA, v. 22, p. 45-57, 2001.

STROPPA, C. T. Dinâmica populacional de leveduras por eletrocariótipos e desempenho em processo de fermentação alcoólica. Tese (Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos ) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

Submetido em: 2/dezembro/2009

Aceito em: 23/setembro/2010