

## QUANTIFICAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DO METABOLISMO RESPIROFERMENTATIVO DE LEVEDURAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

RICARDO FIGUEIRA<sup>1</sup>, KASSADRA SUSSI MUSTAFÉ OLIVEIRA<sup>2</sup>, LUCAS FELIPE DOS OUROS<sup>3</sup>, THALIA LEE LOPES DE ANDRADE<sup>1</sup>, WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Produção Vegetal / Área Horticultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP. Av. Universitária, 3780 - Altos do Paraíso, CEP 18610-034, Botucatu, SP, Brasil. ricardo.figueira@unesp.br; thalialda@hotmail.com; waldeмар.venturini@unesp.br.

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Rural, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP. Av. Universitária, 3780 - Altos do Paraíso, CEP 18610-034, Botucatu, SP, Brasil. kassandra.oliveira@unesp.br.

<sup>3</sup> Centro de Raízes e Amidos Tropicais, UNESP. Av. Universitária, 3780 - Altos do Paraíso, CEP 18610-034, Botucatu, SP, Brasil. lucas.ouros@unesp.br.

**RESUMO:** Esse trabalho visa estimar o metabolismo respirofermentativo de leveduras selecionadas para produção de etanol (CAT-1, Fermel, FT858, PE-2) por meio de cálculos estequiométricos. O meio de cultivo foi mosto de cana de açúcar (15 °Brix). A fermentação transcorreu durante 8 horas. A cada hora os fermentadores foram pesados. A diferença entre a primeira e a oitava pesagem correspondeu à massa de CO<sub>2</sub> produzida no processo respirofermentativo. A massa de etanol produzida na fermentação foi calculada a partir do teor alcoólico do vinho. A massa de sacarose consumida e a massa de CO<sub>2</sub> produzida durante a fermentação foi estimada usando a equação da fermentação alcoólica. A massa de CO<sub>2</sub> produzida na respiração foi calculada por diferença (massa CO<sub>2</sub> produzida no processo respirofermentativo - massa CO<sub>2</sub> produzida na fermentação). A massa de sacarose consumida na respiração foi estimada usando a equação da respiração. Somando-se as massas de sacarose consumidas na respiração e fermentação obteve-se a massa total de sacarose metabolizada pela levedura. O consumo dos açúcares pelas leveduras foi influenciado pelo Efeito Crabtree *short-term*. O metabolismo respirofermentativo mais intenso foi mensurado para as leveduras CAT-1, FT 858 e PE-2, sendo a levedura CAT-1 a que mais produziu etanol.

**Palavras-chave:** fermentação, respiração, *Saccharomyces cerevisiae*.

## STOICHIOMETRIC QUANTIFICATION OF RESPIRO-FERMENTATIVE METABOLISM OF SELECTED YEASTS FOR ETHANOL PRODUCTION

**ABSTRACT:** This work aims to estimate the respiration-fermentative metabolism of selected yeasts for ethanol production (CAT-1, Fermel, FT858, PE-2) by stoichiometric. The culture medium was sugarcane must (15 °Brix). Fermentation took place during 8 hours. The fermenters were weighed every hour. The difference between the first and the eighth weighing corresponded the CO<sub>2</sub> mass produced in respiration-fermentation process. The mass of ethanol produced in fermentation was calculated from wine alcohol content. The sucrose mass consumed and the CO<sub>2</sub> mass produced during fermentation were estimated by equation of alcoholic fermentation. The CO<sub>2</sub> mass produced in respiration was calculated by difference (CO<sub>2</sub> mass produced in respiration-fermentation process - CO<sub>2</sub> mass produced in fermentation). The sucrose mass consumed in respiration was estimated by respiration equation. Adding the sucrose mass consumed in respiration and fermentation, the total sucrose mass metabolized by the yeast was obtained. The sugar yeast consumption was influenced by short-term Crabtree Effect. The most intense respiration-fermentative metabolism was measured for CAT-1, FT 858 and PE-2 yeasts, with CAT-1 being the yeast that produced the most ethanol.

**Keywords:** fermentation, respiration, *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é o principal organismo fermentador utilizado no setor sucroalcooleiro. Suas características fisiológicas permitem adaptar-se à ambientes com diferentes concentrações de açúcares, oxigênio, etanol, pH, estresse salino, estresse proteico, resistência a contaminantes e alterações de temperatura. Quando inserida em um meio com glicose ou outras fontes de açúcares fermentescíveis, essa levedura usa a fermentação alcoólica como via metabólica principal para a obtenção de energia com consequente produção de etanol e CO<sub>2</sub> (Bai; Anderson; Moo-Young, 2008; Gibson *et al.*, 2007; Mussatto *et al.*, 2010).

Nas leveduras alcoólicas a respiração (metabolismo aeróbio) e a fermentação (metabolismo anaeróbio) fazem parte do seu metabolismo primário ocorrem de forma simultânea. Por isso, o metabolismo desses microrganismos é classificado como *respirofermentativo* (Gancedo e Serrano, 1989; Käppeli, 1986). As leveduras metabolizam a glicose do mosto pela via fermentativa, produzindo etanol e gás carbônico. O oxigênio presente no mosto, no início do processo fermentativo, é usado pelas leveduras para a produção de esteróis, ácidos graxos insaturados e crescimento celular por meio da respiração. Mais de 90 % dos açúcares são metabolizados pela via fermentativa e o restante é utilizado no crescimento celular (Ingledeew, 2009).

O metabolismo aeróbio e anaeróbio de uma levedura alcoólica pode ser estimado por método estequiométrico (Venturini Filho *et al.*, 2013; Venturini Filho *et al.*, 2014; Venturini Filho *et al.*, 2018). Estequiometria é o cálculo da quantidade das substâncias envolvidas numa reação química, mensuradas com o auxílio das equações químicas correspondentes. Nas reações químicas, as substâncias reagem entre si originando produtos em proporções específicas (Fiorotto, 2013). Conhecendo a quantidade de etanol e gás carbônico produzidos durante o

processo fermentativo é possível calcular, por meio das equações estequiométricas da respiração e fermentação alcoólica, a quantidade de açúcar consumido pelo microrganismo durante os processos de respiração e fermentação, bem como o rendimento da reação.

Teoricamente, os cálculos estequiométricos definem que a partir de 100 g de glicose são produzidos 51,1 g de etanol e 48,9 g de CO<sub>2</sub> (Bai; Anderson; Moo-Young, 2008). Entretanto, em condições de trabalho, embora com todo o rigor da técnica, obtém-se em torno de 48,5 g de etanol a 15 °C. Isto porque aproximadamente 5 % dos açúcares são reservados para o crescimento celular e para a formação dos subprodutos da fermentação, como glicerol, ácido succínico, etc. Além disso, juntamente com a fermentação alcoólica, reações secundárias promovem a redução do rendimento prático (Menezes, 1980).

As leveduras alcoólicas são organismos vivos, com múltiplas habilidades metabólicas, capazes de alterar a estequiometria da reação, com grande impacto no rendimento do processo fermentativo (Lima, *et al.*, 2001). O uso de cepas selecionadas para a produção de etanol promove o aumento de rendimento, redução dos gastos com insumos, maior tolerância a variações de concentração alcoólica, temperatura e pH, maior velocidade na partida da safra e maior taxa de sedimentação. Pela importância das leveduras no processo de produção de etanol, esse trabalho visa estimar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de leveduras secas selecionadas para produção de etanol por meio de cálculos estequiométricos.

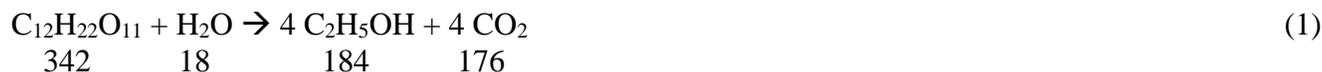
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O planejamento experimental foi inteiramente casualizado e contou com quatro tratamentos compostos pelas leveduras secas (*Saccharomyces cerevisiae*) da marca LNF (CAT-1 – lote 20180822C; Fermel – lote 20180501M; FT858 – lote 20190502F; PE-2 – lote 20180730) e três repetições, totalizando 12

parcelas experimentais. Cada parcela experimental compreendeu um sistema formado por um fermentador aberto de 4 L (béquer), 1 kg de mosto de caldo de cana padronizado a 15,0 °Brix, 100 g de levedura e um bastão de polipropileno.

O mosto padronizado foi transferido para o fermentador aberto. Em seguida foi adicionada a levedura seca a qual foi misturada ao mosto com o auxílio do bastão de polipropileno que se manteve inserido no interior do fermentador. A temperatura inicial do mosto foi de 23 °C e a fermentação transcorreu à temperatura ambiente de 28±1 °C.

Após a montagem dos sistemas, esses foram pesados em uma balança de precisão (Gehaka BG 2000) e a massa inicial anotada. O processo de pesagem do sistema foi feito a cada hora totalizando oito pesagens. A diferença entre



Conhecendo a massa total de gás carbônico produzida durante o processo respirofermentativo e a massa de gás carbônico produzida durante o processo de fermentação alcoólica, foi calculada por diferença a massa de



Somando-se as massas de sacarose consumidas nos processos de respiração e fermentação alcoólica, obteve-se a massa total de sacarose metabolizada pela levedura.

No mosto foram feitas análises de sólidos solúveis (refratômetro digital marca Reichert, modelo r<sup>2</sup>i300), pol (polarímetro marca Anton Paar, modelo MCP 200) e pH (medidor de pH marca Tecnal, modelo TEC-5). Com os resultados da pol e dos sólidos solúveis foi calculado a sua pureza (pol/Brix).

Os teores alcoólicos e as quantidades da sacarose consumidas durante o metabolismo respirofermentativo pelas leveduras CAT-1, Fermel, FT858 e PE-2 foram avaliados por meio de análise de variância e as médias dos resultados

a primeira e a oitava leitura correspondeu à massa de gás carbônico produzida durante o processo respirofermentativo.

Ao termino das oito pesagens da massa de mosto em fermentação, o vinho foi destilado em um destilador de bancada (Buchi K355) e o teor alcoólico mensurado em densímetro digital (Mettler Toledo DM 45).

A partir da determinação do teor alcoólico do vinho foi calculada a massa de etanol produzida na fermentação alcoólica. Com esse resultado e utilizando a equação estequiométrica simplificada da fermentação alcoólica (Equação 1), mensurou-se a massa de sacarose consumida e a massa de gás carbônico produzida durante o processo de fermentação alcoólica. O açúcar de referência usado para os cálculos foi a sacarose por ser o carboidrato predominante no caldo de cana.

CO<sub>2</sub> produzida durante a respiração. Com esse dado e usando a equação estequiométrica simplificada da respiração (Equação 2), foi calculada a massa de sacarose consumida durante o processo de respiração.

comparados pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) (Vieira, 2006) utilizando o programa MiniTab 16 (Minitab, 2010).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma usina sucroalcooleira, o caldo de cana obtido por meio do processo de moagem, seja para a produção de etanol ou açúcar, deve conter concentração de sacarose entre 8 e 20 % (m/m) e pH na faixa de 5,0 a 5,5 (Lima; Marcondes, 2002; Lopes; Gabriel; Borges, 2011). Em relação ao grau de pureza, essa matéria-prima pode ser classificada como: muito baixa (< 80 %), baixa (de 80 % a 85 %), média (de 85 % a 90 %) e alta (> 90 %) (Lopes, Gabriel

e Borges, 2011). Baseado nas análises supracitadas e nas informações desses autores, o mosto de caldo de cana usado nessa pesquisa

apresentou alto grau de pureza com concentração de sacarose e pH recomendados para o processo fermentativo (Tabela 1).

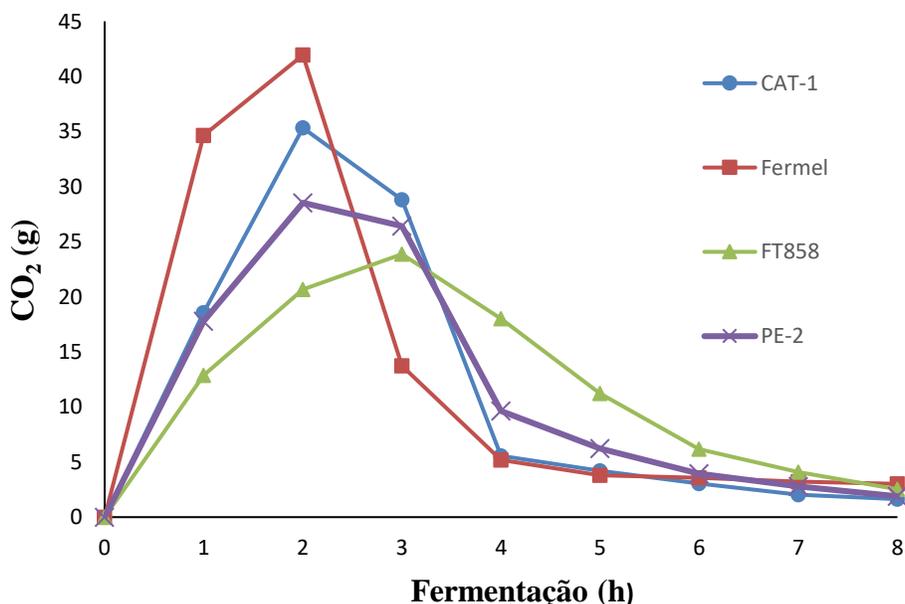
**Tabela 1.** Composição do mosto de caldo de cana.

Análises	Resultados
Sólidos solúveis (°Brix)	15,00
Pol (% m/m)	13,51
Pureza (%)	90,10
pH	5,30

As leveduras Fermel, CAT-1 e PE-2 tiveram o pico de produção de CO<sub>2</sub> na segunda hora do processo fermentativo (respectivamente, 41,94 g, 35,32 g e 28,53 g de CO<sub>2</sub>). A levedura FT 858 obteve a máxima produção de CO<sub>2</sub> na terceira hora do processo fermentativo (23,87 g de CO<sub>2</sub>) (Figura 1). Diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos afetam o metabolismo das leveduras destacando-se temperatura, concentração de inoculo, pH,

contaminação bacteriana, nutrientes e presença de agentes inibidores (Lima *et al.*, 2001). Como as características físicas e químicas do substrato foram as mesmas para todas as leveduras, bem como a concentração de inócuo adicionado no início do processo fermentativo, características genéticas inerentes às leveduras e potencializadas pelo processo de seleção de cepas, determinaram comportamentos distintos quanto a produção de CO<sub>2</sub>.

**Figura 1.** Cinética da produção de gás carbônico das leveduras CAT-1, Fermel, FT858 e PE-2.



Para a levedura Fermel, a alta produção de CO<sub>2</sub> nas duas primeiras horas sugere o consumo de sacarose pela via aeróbica; a taxa respiratória dessa levedura foi estatisticamente maior em relação às demais leveduras. As

leveduras CAT-1, PE-2 e FT 858 não tiveram diferença estatística quanto a taxa de sacarose consumida na respiração (Tabela 2).

Comportando-se de forma inversamente proporcional, a taxa de sacarose consumida na

fermentação da levedura Fermel foi estatisticamente menor que as demais leveduras. CAT-1, PE-2 e FT 858 não tiveram diferença estatística quanto a taxa de sacarose consumida na fermentação (Tabela 2). Em um estudo que avaliou o metabolismo respirofermentativo de leveduras de cerveja, vinho e pão, Figueira *et al.* (2021) relataram que a taxa de sacarose consumida na respiração é inversamente proporcional à taxa de sacarose consumida na fermentação.

A taxa de consumo de carboidratos durante o processo de respiração foi usada por alguns autores como parâmetro para classificar as leveduras. Para Kocková-Kratochvílová (1990) as leveduras podem ser classificadas em três grupos: a) prevalência da respiração: a via aeróbia é responsável por 100 % do catabolismo dos carboidratos (ex.: leveduras forrageiras); b) equiparidade entre respiração e fermentação: a via aeróbia corresponde a 40 a 50 % do catabolismo dos carboidratos (ex.: leveduras patogênicas, de panificação e cervejeira de alta fermentação); c) prevalência da fermentação: a via aeróbia responde por 10 a 15 % do catabolismo dos carboidratos (leveduras de destilaria, vinho e cervejeira de baixa fermentação). Já Briggs *et al.* (2004) classificou as leveduras em dois grupos: a) aeróbias obrigatórias: catabolizam o açúcar apenas por via aeróbia (ex.: *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* e *Saccharomycopsis*); b) anaeróbias facultativas: catabolizam o açúcar de forma simultânea pelas vias aeróbias e anaeróbias. Dentro deste último grupo temos a subdivisão: b<sub>1</sub>) leveduras respiratórias: catabolizam mais de 70 % dos açúcares pela via aeróbia (ex.: *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* e *Pichia*); b<sub>2</sub>) leveduras fermentativas: catabolizam até 10 % dos açúcares pela via aeróbia (ex.: *Saccharomyces*, *Brettanomyces* e *Schizosaccharomyces*). Baseado nas informações desses autores, as leveduras CAT-1, Fermel, FT 858 e PE-2 são classificadas como anaeróbias facultativas com prevalência da fermentação em relação à respiração. Contudo, as taxas de sacarose consumida por essas leveduras pela via

aeróbia foram superiores aos valores de referência propostos pelos autores supracitados (Tabela 2).

Boulton e Quain (2001) relatam que a regulação do consumo de açúcares pelas leveduras pode ser influenciada por cinco tipos de mecanismos: a) Efeito Crabtree *short-term*: quando inseridas em um substrato açucarado ocorre redução da taxa de respiração; b) Efeito Crabtree *long-term*: quando inseridas em substrato açucarado ocorre repressão ou inativação das enzimas respiratórias; c) Efeito Pasteur: redução da taxa de glicólise sob condições aeróbias; d) Efeito Kluyver: utilização aeróbia obrigatória de dissacarídeos; e) Efeito Custer: estimulação aeróbia da taxa de fermentação da glicose. Como as leveduras CAT-1, Fermel, FT 858 e PE-2 apresentaram metabolismo respirofermentativo com redução da taxa de respiração em relação à fermentação, podemos concluir que o consumo dos açúcares nessas leveduras foi influenciado pelo Efeito Crabtree *short-term*.

A massa de sacarose consumida durante os processos de respiração e fermentação permite estimar o metabolismo dessas leveduras. O metabolismo respirofermentativo mais intenso foi mensurado para as leveduras CAT-1, FT 858 e PE-2. A levedura Fermel teve a menor taxa metabólica diferenciando-se das demais (Tabela 2).

A massa de sacarose existente em um substrato pode ser calculada por meio da Pol. Para o mosto usado nessa pesquisa a massa de sacarose calculada foi de 135,10 g (Tabela 1). Porém, a massa de sacarose consumida pelas leveduras durante os processos de respiração e fermentação variaram de 141,07 g a 147,08 g (Tabela 2). Além da sacarose, o mosto obtido a partir do caldo-de-cana possui outros açúcares fermentescíveis como glicose e frutose. Segundo Lopes, Gabriel e Borges (2011), a composição do caldo da cana, muitas vezes denominado nas usinas sucroalcooleiras como caldo absoluto, pode conter 1 % de glicose e 0,5 % de frutose.

A produção de etanol ocorre durante o processo fermentativo à medida que os açúcares contidos no mosto são transformados em álcool

etílico por ação das leveduras (Lopes; Gabriel; Borges, 2011). As leveduras CAT-1, PE-2 e FT 858 apresentaram taxas estatisticamente iguais de sacarose consumida durante o processo de fermentação. Porém, a levedura CAT-1 foi a que mais produziu etanol, com diferença estatística

em relação às demais. As leveduras PE-2 e FT 858 tiveram concentração de etanol estatisticamente iguais. Já a levedura Fermel foi a que menos produziu etanol, pelo fato de ter apresentado maior taxa de sacarose consumida pelo processo respiratório (Tabela 2).

**Tabela 2.** Quantificação da sacarose consumida durante metabolismo respirofermentativo pelas leveduras CAT-1, Fermel, FT858 e PE-2.

	<b>CAT-1</b>	<b>Fermel</b>	<b>FT858</b>	<b>PE-2</b>
TA (% v/v)*	7,98 a	6,84 c	7,80 b	7,85 b
E (g)	66,86	56,82	65,38	65,93
CO <sub>2</sub> F (g)	63,95	54,34	62,54	63,06
SF (g)	124,27	105,60	121,53	122,54
CO <sub>2</sub> FR (g)	99,17	109,11	99,42	97,21
CO <sub>2</sub> R (g)	35,22	54,76	36,88	34,14
SR (g)	22,81	35,47	23,89	22,12
SRF (g)*	147,08 a	141,07 b	145,41 a	144,66 a
TSF (%)*	84,49 a	74,86 b	83,57 a	84,71 a
TSR (%)*	15,51 b	25,14 a	16,43 b	15,29 b

TA = Teor alcoólico; E = Massa de etanol; CO<sub>2</sub> F = Massa de CO<sub>2</sub> produzida na fermentação; SF = Massa de sacarose consumida na fermentação; CO<sub>2</sub> FR = Massa de CO<sub>2</sub> produzida na fermentação e respiração; CO<sub>2</sub> R = Massa de CO<sub>2</sub> produzida na respiração; SR = Massa de sacarose consumida na respiração; SRF = Massa de sacarose consumida na respiração e fermentação; TSF = taxa de sacarose consumida na fermentação; TSR = taxa de sacarose consumida na respiração; \*Teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ).

#### 4 CONCLUSÕES

As leveduras alcoólicas estudadas nesse trabalho apresentaram metabolismo respirofermentativo, com prevalência da fermentação em relação à respiração. O consumo dos açúcares nessas leveduras foi influenciado pelo Efeito Crabtree *short-term*.

O metabolismo respirofermentativo mais intenso foi mensurado para as leveduras CAT-1, FT 858 e PE-2, sendo a levedura CAT-1 a que mais produziu etanol.

Como forma de estimar o metabolismo primário das leveduras, o método estequiométrico demonstrou ser efetivo para essa finalidade. Além disso, pela simplicidade e rapidez no desenvolvimento prático do estudo, esse método pode ser usado para fins didáticos.

#### 5 REFERÊNCIAS

- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 89-105, 2008.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. London: Blackwell Science, 2001.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. Metabolism of wort by yeast. *In*: BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. **Brewing: science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap. 12, p. 401-468.
- FIGUEIRA, R.; OUROS, L. F. dos; OLIVEIRA, I. P.; ANDRADE, T. L. L.; VENTURINI

- FILHO, W. G. Quantificação do metabolismo respirofermentativo de leveduras de cerveja, vinho e pão por método estequiométrico. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 10-16, 2021.
- FIOROTTO, N. R. **Química: estrutura e estequiometria**. 1. ed. São Paulo: Érica, 2013.
- GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. *In*: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (ed.). **The yeast**. New York: Academic Press, 1989. v. 3, p. 205-259.
- GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. J.; LECLAIRE, J. P.; POWELL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 535-569, 2007.
- INGLEDEW, W. M. Yeast: physiology, nutrition and ethanol production. *In*: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. **The alcohol textbook**. 5. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. cap. 9, p. 101-113.
- KÄPPELI, O. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. **Advances in Microbial Physiology**, Maryland Heights, v. 28, p. 181-208, 1986.
- KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Yeast metabolism. *In*: KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeast and yeast-like organisms**. Weinheim: VCH, 1990. cap. 5, p. 304-390.
- LIMA, L. R.; MARCONDEZ, A. A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Curitiba: UFPR, 2002.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 3.
- LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar**. São Carlos: UFSCar, 2011.
- MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda., 1980.
- MINITAB. **Minitab 16®**. Statistical Software. State College: Minitab Inc., 2010.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.
- VENTURINI FILHO, W. G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F. V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 31, n. 2, p. 227-236, 2013.
- VENTURINI FILHO, W. G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T. Quantificação do metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica por método estequiométrico. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 135-141, 2014.
- VENTURINI FILHO, W. G.; FIGUEIRA, R.; SARTORI, M. M. P.; AUER, S.; ANDRADE, T. L. P. Quantificação do metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica sob diferentes condições ambientais. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 1-10, 2018.
- VIEIRA, S. **Análise de variância**. São Paulo: Atlas, 2006.