



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA



ANA PAULA VIEIRA DA SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS MULTIRRESISTENTES AOS
FATORES DE ESTRESSE DO PROCESSO FERMENTATIVO INDUSTRIAL PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL EM INDÚSTRIAS ALCOOLEIRAS**

Maceió
2020

ANA PAULA VIEIRA DA SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS MULTIRRESISTENTES AOS
FATORES DE ESTRESSE DO PROCESSO FERMENTATIVO INDUSTRIAL PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL EM INDÚSTRIAS ALCOOLEIRAS**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado ao curso de Engenharia
Química, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Bacharel
em Engenharia Química.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia
Almeida.

Coorientador: Gildemberg Amorim Leal
Júnior.

Maceió
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade – CRB-1251

S586s Silva, Ana Paula Vieira da.
Seleção de leveduras selvagens multirresistentes aos fatores de estresse do processo fermentativo industrial para produção de etanol em indústrias alcooleiras / Ana Paula Vieira da Silva– 2020.
68 f. : il.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Coorientador: Gildemberg Amorim Leal Júnior.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química)
– Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia, 2020.

Bibliografia: f. 64-68.

1. Leveduras. 2. Leveduras selvagens. 3. Fermentação. 4. Cepas multirresistentes. 5. Cinética de crescimento. 6. Etanol – Produção. I. Título.

CDU: 663.14

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo livre arbítrio, pela vida, pela saúde e força incondicional, e pela companhia, amor, misericórdia e perseverança que me fazem percorrer com confiança cada passo desta longa estrada.

Aos meus pais, Maria José e Paulo pelo amor incondicional e ensinamentos.

Ao meu esposo Márcio por ser sempre tão amável e solícito.

Aos meus filhos Márcio Henrique e João Vitor, por serem a razão para eu continuar acreditando.

Ao meu irmão Alexandre por ser um exemplo de superação.

Às minhas irmãs Alessandra, Aline e Adriana pela infância maravilhosa.

Ao meu sogro Elizeu e à minha sogra Telma, por serem tão prestativos, serei grata.

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), através do Centro de Tecnologia- CTEC pela oportunidade de cursar a Graduação, e ao Centro de Ciências Agrárias pela oportunidade de desenvolver as pesquisas do trabalho de conclusão de curso.

A professora. Dra. Renata Maria Rosas Garcia pela orientação e disposição.

Ao professor Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, pela excelente orientação e aprendizado, sempre buscando incansavelmente compartilhar o conhecimento.

Ao professor Dr. João Inácio Soletti pela contribuição no plano de trabalho.

A todos os professores do CTEC pelo aprendizado.

A todos do Laboratório de Microscopia do CECA, Ana Paula Silva, Khayke Fernando, Livoney Goes, Élidea, a todos o meu muito obrigado.

Aos Professores Drs. Júlio Assunção e Gaus Silvestre pela disponibilidade de tempo e colaboração para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Engenheiro Químico David da usina Santa Clotilde, por ceder gentilmente as amostras para serem estudadas.

Aos Membros da Banca Prof. Dr. Jorge José Brito Silva e a Prof. Dra Albanise Enide por terem aceitado o convite e contribuírem como examinadores deste trabalho.

Aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram para minha chegada até aqui. Às pessoas que me inspiram por acreditar que para melhorar o mundo a minha parte é fundamental.

Amigos e amigas, gratidão a todos!!!

**Aqueles que esperam no Senhor
renovam as suas forças. Voam
alto como águias. Correm e não
ficam exaustos, andam e não se
cansam. (Isaiás 40:31)**

RESUMO

Leveduras contaminantes em um processo fermentativo industrial podem se tornar predominantes e acarretar prejuízos como quedas na eficiência e rendimento fermentativo. A cepa selecionada da própria unidade industrial predomina durante todo o processo, impedindo que leveduras indesejáveis se instalem no processo. Este estudo teve como objetivo utilizar a diversidade de leveduras provenientes do processo de fermentação industrial para obter linhagens propícias à seleção de isolados multirresistentes. As colônias de levedura para seleção foram obtidas a partir do mosto fermentado de uma dorna da usina no final da safra 2014/2015. Uma amostra foi no início da fermentação (2 horas) e outra no final da fermentação (após 8 horas). A diversidade macro morfológica foi verificada por plaqueamento em superfície em meio WLN. As culturas mistas foram introduzidas em um ciclo fermentativo de seleção para resistência a acidez, alto Brix e alto teor de etanol. O melaço estéril bruto foi utilizado como substrato. A fermentação iniciou com 17°Brix, cada ciclo durou 24 horas, 4 ciclos no mesmo Brix até chegar a 22°Brix. Após cada 24 horas foi realizada uma lavagem das células com 2 mL de ácido sulfúrico diluído (estéril) pH 2,5, deixando em repouso por 2 horas, após as 2 horas deu início a uma nova fermentação. Com o término da fermentação seletiva totalizando 24 dias foi realizado o plaqueamento por superfície em meio WLN para ser observada a diversidade morfológica após a pressão seletiva. A variabilidade genética das leveduras foi verificada antes e a após os 24 ciclos. Também foram avaliadas pela técnica *MSP-PCR fingerprinting* usando o oligonucleotídeo (GTG)₅. Uma avaliação cinética foi realizada determinando o crescimento específico celular medido por absorbância. Foram realizados testes de resistência ao etanol, glicose e sacarose, pH e temperatura. A cepa SC-32 da pressão de seleção, obteve maior resistência combinada a todos os fatores de estresse e foi comparada a CAT-1, em uma fermentação (24 horas) com agitação constante, concentrações de 17 e 22°Brix, temperaturas de 30 e 40°C, analisando a viabilidade celular, consumo de açúcares (°Brix), massa produzida (gravimetria) e pH, obtendo resultados satisfatórios. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a pressão de seleção não variou a diversidade morfológica e variou a diversidade genética dos isolados e que o processo de seleção não forneceu pressão de seleção para leveduras com maiores taxas de crescimento, sendo os isolados com melhor desempenho da diversidade. Entretanto, vários outros parâmetros, como por exemplo, conversão em etanol, eficiência fermentativa, presença de ácidos, glicerol produzido e custos de manutenção desta e de outras linhagens devem ser avaliados para a escolha adequada de uma levedura para produção de etanol.

Palavras-chave: Leveduras selvagens. Cepas multirresistentes. Pressão de seleção. Cinética de crescimento.

ABSTRACT

Contaminant yeasts in an industrial fermentation process may become predominant and lead to losses such as decreases in efficiency and fermentative yield. The selected strain of the plant itself prevails throughout the process, preventing undesirable yeasts from settling in the process. This study aimed to use the yeast diversity from the industrial fermentation process to obtain strains suitable for the selection of multiresistant isolates. The yeast colonies for selection were obtained from the fermented must and a dorn from the plant at the end of the 2014/2015 harvest. One sample was at the start of the fermentation (2 hours) and another at the end of the fermentation (after 8 hours). The macro morphological diversity was verified by surface plating in WLN medium. Mixed cultures were introduced in a fermentation cycle of selection for resistance to acidity, high Brix and high ethanol content. Crude cane molasses was used as a substrate. The fermentation started with 17°Brix, each cycle lasted 24 hours, 4 cycles in the same Brix until reaching 22°Brix. After each 24 hours a cell wash was performed with 2 mL dilute sulfuric acid (sterile) pH 2.5, left standing for 2 hours, after 2 hours a new fermentation began. With the conclusion of the selective fermentation totaling 24 days, the surface plating was performed in WLN medium to observe the morphological diversity after the selective pressure. Genetic variability of yeasts before and after 24 cycles. They were also evaluated by the MSP-PCR fingerprinting technique using the oligonucleotide (GTG)₅. A kinetic evaluation was performed determining cell-specific growth measured by absorbance. Resistance tests were performed on ethanol, glucose and sucrose, pH and temperature. The SC-32 strain of the selection pressure, obtained greater combined resistance to all stress factors and was compared to CAT-1, in a fermentation (24 hours) with constant agitation, concentrations of 17 and 22°BRIX, temperatures of 30 And 40°C, analyzing cell viability, sugar consumption (BRIX), mass produced (gravimetry) and pH, obtaining satisfactory results. The results obtained in this work demonstrated that the selection pressure did not vary the morphological diversity and varied the genetic diversity of the isolates and that the selection process did not provide selection pressure for yeasts with higher growth rates, being the isolates with better diversity performance. However, several other parameters, such as conversion to ethanol, fermentative efficiency, presence of acids, glycerol produced and maintenance costs of this and other strains should be evaluated for the proper choice of a yeast for the production of ethanol.

Keywords: Wild yeast. Multiresistant strains. Selection pressure. Kinetics of growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sequência de reações enzimáticas da fermentação alcoólica.....	16
Figura 2 – Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras presentes no início da fermentação industrial com o primer (GTG) ₅ . Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 100pb.....	32
Figura 3 – Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras presentes após 8 horas de fermentação com o primer (GTG) ₅ . Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 100pb.....	33
Figura 4 – Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras obtidas após 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados da amostra do mosto no início da fermentação com o primer GTG ₅ . Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kb.....	37
Figura 5 – Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras obtidas após 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados da amostra de mosto após 8 horas de fermentação com o primer GTG ₅ . Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kb.....	39
Figura 6 – Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras selecionadas para a cinética de crescimento com o primer (GTG) ₅ . Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado n o preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kb.....	41
Figura 7 – Ilustração do teste de resistência a diferentes valores de pH.....	43
Figura 8 - Fotos do teste de resistência a concentrações de 0%, 11% e 22% de etanol (v/v)...	44
Figura 9 - Fotos do teste de resistência para as temperaturas de 30, 35 e 40°C.....	46
Figura 10 - Fotos do teste de resistência para as concentrações de 100 e 250 g.L ⁻¹ de glicose.....	47
Figura 11 - Fotos do teste de resistência para as concentrações de 100 e 250 g.L ⁻¹ de sacarose.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nutrientes necessários ao crescimento de leveduras e suas respectivas concentrações.....	18
Tabela 2 - Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto em fermentação inicial (após 2 horas de fermentação) utilizado no processo fermentativo da usina Santa Clotilde correspondente a safra 2014/2015.....	31
Tabela 3 - Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto fermentado (após 8 horas de fermentação) utilizado no processo fermentativo da usina Santa Clotilde correspondente a safra 2014/2015.....	32
Tabela 4 – Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto em fermentação (2 horas de fermentação) após pressão de seleção por meio de 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados.....	33
Tabela 5 – Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto fermentado (após 8 horas de fermentação) após pressão de seleção por meio de vinte ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados.....	34
Tabela 6 – Código do isolado, morfologia da colônia em meio WLN e grupo genético determinado pelo padrão de amplificação obtido com o iniciador (GTG) ₅ do mosto em fermentação inicial (2 horas de fermentação)	36
Tabela 7 – Código do isolado, morfotipo, coloração da colônia em meio WLN e grupo genético determinado pelo padrão de amplificação obtido com o iniciador (GTG) ₅ do mosto fermentado final (8 horas de fermentação).....	37
Tabela 8 - Associação dos grupos genéticos aos morfotipos provenientes do mosto no início da fermentação (2 horas de fermentação) de um reator após 24 ciclos fermentativos com pressão de seleção e fatores de estresse adicionados.....	38
Tabela 9 - Associação dos grupos genéticos aos morfotipos provenientes do mosto após 8 horas de fermentação em um reator após 24 ciclos fermentativos e pressão de seleção com fatores de estresse adicionados.....	39
Tabela 10 - Morfotipos com os seus respectivos valores de: $\mu_{\text{máx.}}$, coeficiente de correlação (R^2), taxa de duplicação (em 8 horas de avaliação), morfologia e porcentagem de predominância	42
Tabela 11 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-2}) após serem submetidas aos pH's 1 3 e 5.....	44

Tabela 12 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-2}) após serem submetidas a diferentes concentrações de etanol.....	46
Tabela 13 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-3}) após serem submetidas a diferentes temperaturas.....	47
Tabela 14 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-3}) após serem submetidas a diferentes concentrações de glicose.....	49
Tabela 15 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-3}) após serem submetidas a diferentes concentrações de sacarose.....	51
Tabela 16 - Resultados obtidos para a fermentação a 30°C.....	53
Tabela 17 - Resultados obtidos para a fermentação a 40°C.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Açúcares Redutores totais.
Brix	Porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos em uma solução açucarada.
CAT-1	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proveniente da Usina de Catanduva (São Paulo), utilizada industrialmente.
CTAB	Reagente (cetiltrimetilamonio brometo) com a função de detergente utilizado para liberação dos componentes celulares no tampão de extração de DNA.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (agente quelante).
G	Unidade padrão de Força centrífuga relativa (do inglês RCF - Força exercida durante a centrifugação) ou força gravitacional (Força G).
(GTG) ₅	Oligonucleotídeo utilizado como iniciador numa reação de PCR, amplificando a região ISSR.
ISSR	Sequências Simples entre Repetições de DNA.
MSP	PCR de metilação específica.
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia.
PE-2	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proveniente da Usina da Pedra (São Paulo), utilizada industrialmente.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.
R ²	Coefficiente de determinação.
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA.
WLN	Meio de cultura diferencial Wallerstein Laboratory Nutrient ágar.

$\mu_{\text{máx}}$

Velocidade específica máxima de crescimento celular.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Fermentação alcoólica, produtos e subprodutos.....	16
3.2 Matérias-primas utilizadas.....	17
3.3 Tipos de fermentação.....	17
3.4 Fatores que influenciam o rendimento fermentativo.....	17
3.5 Fatores determinantes para produção de etanol.....	18
3.5.1 Efeito do pH do substrato.....	18
3.5.2 Temperatura.....	19
3.5.3 Concentração das fontes de carbono fermentescíveis.....	19
3.5.4 Oxigênio.....	20
3.5.5 Etanol.....	20
3.5.6 Viabilidade celular.....	20
3.5.7 Floculação.....	21
3.5.8 Contaminação bacteriana.....	21
3.5.9 Agente fermentativo.....	22
3.6 Leveduras industriais.....	23
3.6.1 Linhagens selecionadas <i>versus</i> linhagens selvagens.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Amostragem e obtenção de linhagens de leveduras industriais e análise da diversidade macro morfológica.....	24
4.2 Obtenção dos morfotipos oriundos da diversidade	24
4.3 Contagem isolamento e purificação das colônias.....	24
4.4 Manutenção das linhagens.....	25
4.5 Fermentação com fatores de estresse para pressão de seleção.....	25
4.6 Extração de DNA.....	25
4.7 Amplificação dos fragmentos de DNA por meio de microssatélites (GTG)₅.....	26
4.8 Cinética de crescimento celular.....	26
4.9 Testes de resistência aos fatores de estresse individuais.....	27
4.9.1 Resistência aos pH's 1, 3 e 5.....	28
4.9.2 Resistência ao estresse etanólico.....	28
4.9.3 Temperatura.....	28
4.9.4 Altas concentrações de glicose.....	29
4.9.5 Altas concentrações de sacarose.....	29
4.9.6 Ensaio fermentativos combinando fatores estressantes.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
5.1 Diversidade macro morfológica das leveduras isoladas antes da pressão de seleção.....	31

5.1.1 Caracterização morfológica das colônias isoladas da diversidade antes da pressão de seleção.....	32
5.2 Diversidade morfológica das leveduras isoladas após pressão de seleção.....	33
5.2.1 Análise da diversidade morfológica após pressão de seleção.....	34
5.3 Diversidade genética antes da pressão de seleção.....	35
5.4 Diversidade genética após a pressão de seleção.....	38
5.5 Amplificação do DNA e averiguação dos padrões de amplificação por PCR (GTG)₅.....	40
5.6 Cinética de crescimento das leveduras selecionadas antes e após a pressão de seleção.....	41
5.7 Testes de resistência aos fatores de estresse individuais.....	44
5.7.1 Resistência ao pH	44
5.7.2 Resistência ao estresse etanólico.....	45
5.7.3 Temperatura.....	47
5.7.4 Altas concentrações de glicose.....	49
5.7.5 Altas concentrações de sacarose.....	50
5.8 Ensaio fermentativo combinando fatores estressantes.....	52
5.8.1 Ensaio fermentativo a 30°C	53
5.8.2 Ensaio fermentativo a 40°C	53
5.8.3 Análise dos ensaios fermentativos com fatores de estresse adicionados.....	54
7 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior país produtor de etanol do mundo, com cerca de 28% do volume total produzido, tendo apenas os Estados Unidos à sua frente, o qual tem a parcela de 58%, e em 2016, o volume total de etanol produzido no Brasil excedeu 28 bilhões de litros (CORDELLINI, 2018). Embora os Estados Unidos e o Brasil sejam os principais produtores de bioetanol e dividam 70% do mercado mundial, seus sistemas de produção são diferentes em muitos aspectos (GOLDEMBERG, 2007; SANDERSON, 2006). Na América do Norte, o bioetanol tem sua produção 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, e é convertida em etanol diretamente pela levedura *S. cerevisiae* sem pré-tratamento enzimático. Uma das vantagens, da cana-de-açúcar que se pode citar é sua utilização preferencialmente pela ação simbiótica e a fixação de nitrogênio por microrganismos, permitindo que este sistema produza oito vezes mais energia (ROBERTSON et al., 2008; GOLDEMBERG, 2007).

A produção brasileira de cana-de-açúcar destinada à indústria na safra 2018/2019 foi de 620,44 milhões de toneladas, apresentando uma redução de 2% em relação à safra anterior. (CONAB, 2019). O estudo mostra também que a área de colheita teve um decréscimo de 1,6%, em comparação à safra 2017/2018. A maior parte da cana-de-açúcar colhida destinou-se à fabricação de etanol, representando 64,7% da produção. Na safra 2018/2019 a produção de etanol total foi de 33,14 bilhões de litros, aumento de 21,7% em relação à safra 2017/2018. A produção de etanol anidro foi estimada em 9,56 bilhões de litros, uma redução de 13,1%, em comparação à safra 2017/2018. Para o etanol hidratado, a produção foi de 23,58 bilhões de litros, aumento de 45,2%. Este aumento foi considerável e ocorreu devido à demanda nas bombas do biocombustível. Segundo a CONAB (2019), mesmo com a redução na área destinada à produção de açúcar e etanol, houve incremento nas produtividades, e a média da região nordeste foi 9% maior do que a registrada na temporada passada. A produção final atingiu 44,4 milhões de toneladas, um aumento de 8% em comparação à safra anterior. Os dados positivos mencionados são um reflexo da boa distribuição das chuvas em importantes períodos da lavoura (CONAB, 2019). O estado de Alagoas já contou com 25 usinas, mas na safra 2018/2019 apenas 14 operaram efetivamente (SINDAÇÚCAR-AL).

Devido à importância biotecnológica da levedura *S. cerevisiae*, na produção de alimentos e bebidas alcoólicas em todo o mundo e na produção de combustíveis renováveis no Brasil, este microrganismo tornou-se o mais estudado e, portanto, seu metabolismo é o mais

conhecido, sendo o microrganismo mais amplamente utilizado no processo de fermentação alcoólica (SHULLER; KARGI, 2002).

Existem diversos fatores que afetam de maneira significativa a fermentação alcoólica. Dentre eles pode-se citar a levedura utilizada. Leveduras oriundas de culturas puras fornecidas por instituições do ramo se comportam de forma diferente que a levedura comercialmente utilizada para fabricação do pão (BORZANI et al., 2001).

As leveduras são microrganismos mesófilos (BORZANI et al., 2001), bastante utilizados na fermentação do caldo de cana e melação para a produção de etanol (FOLCH-MALLOL et al., 2004), sendo que a temperatura ótima está entre 26-32°C. Elas necessitam de uma fonte de carbono que forneça energia, sendo esta fonte a glicose ou outro açúcar. O meio deve ser fonte de algumas vitaminas, nitrogênio, ferro, cobre, enxofre, fósforo, entre outros. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* praticamente não possui capacidade de se beneficiar com as proteínas do meio, assim como não possui aptidão metabólica de aproveitar o nitrogênio em forma de nitrato, fazendo uso somente da forma amoniacal, amídica ou amínica. O controle de temperatura é primordial, pois caso a temperatura aumente, a velocidade da fermentação consequentemente aumenta, elevando o risco de contaminação e tornando a levedura mais sensível à toxicidade do etanol gerado (BORZANI et al., 2001).

Uma das mudanças que as leveduras enfrentam durante o processo de fermentação é a diminuição progressiva os nutrientes essenciais para o crescimento, o que exige permanente ajuste da genética e do metabolismo celular. A concentração de açúcar, acidez e etanol varia significativamente durante o processo de fermentação de células de leveduras que são submetidas a algum tipo de estresse. Os danos causados pelo tipo e grau de tensão são definidos por muitos fatores, incluindo o ciclo das leveduras e a divisão celular no momento em que ocorre o estresse (FOLCH-MALLOL et al., 2004). A fermentação alcoólica inclui também outras condições de estresse, tais como a pressão osmótica e o aumento da concentração de etanol (IVORRA; PÉREZ-ORTÍN, J; OLMO, 1999). O teor de etanol pode modificar o grau de polaridade da membrana celular. À altas concentrações, o teor de etanol também reduz a multiplicação e a viabilidade da levedura (LYND et al., 1991).

Embora, atualmente, muitas indústrias utilizem cepas selecionadas de *S. cerevisiae* como iniciadoras, a condição não estéril dos substratos torna este processo sujeito a constantes contaminações por bactérias e linhagens de leveduras nativas de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces*. As leveduras nativas de uma determinada região (também chamadas contaminantes, ou ainda, selvagens) podem dominar rapidamente a população iniciadora do

processo por serem cepas genética e fisiologicamente adaptadas às condições daquele ambiente. Tais leveduras podem prejudicar o processo fermentativo, porém, algumas entre elas, podem apresentar características positivas (PRETORIUS, 2001).

Ainda pouco se sabe a respeito da diversificação dos fenótipos e especialização que possibilitam as cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* sobreviverem a diferentes condições de estresse durante vários ciclos fermentativos.

Acredita-se que a grande biodiversidade de leveduras encontradas em ambientes de destilaria poderia ser uma importante fonte de tensões. Isto porque durante a reciclagem de células de levedura, a pressão seletiva (uma evolução adaptativa) é aplicada sobre as células, conduzindo a estirpes com maior tolerância para as condições de stress de fermentação industrial (BASSO et al., 2008).

Leveduras nativas que tenham uma melhor adaptabilidade aos fatores de estresse comumente encontrados em indústrias etanólicas proporcionam uma série de benefícios para o processo fermentativo, entre eles, a permanência e predominância da cepa durante todo o período de safra, elevando e mantendo a produção de etanol, assim como a possível redução no consumo de antibióticos e insumos.

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, por meio de Bioprospecção as leveduras presentes em uma fermentação industrial; submetê-las à múltiplos fatores de estresse, avaliando e selecionando a(s) cepa(s) que obtiver(em) melhor desempenho combinado.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar e quantificar os isolados morfológicamente por plaqueamento superficial com meio diferencial WL Nutrient medium.
- Promover uma pressão seletiva por meio de 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados.
- Realizar a cinética de crescimento celular para avaliar a velocidade específica máxima de crescimento dos morfotipos.
- Testar as estirpes quanto ao crescimento em condições estressantes individuais.
- Elaborar uma fermentação combinando fatores de tensão.

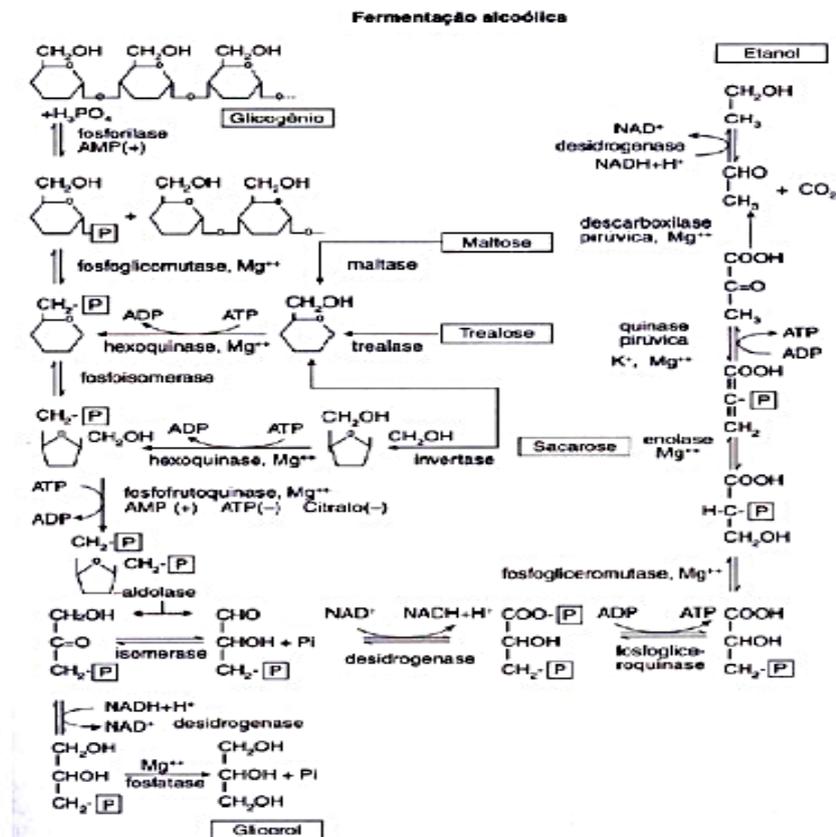
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fermentação alcoólica, produtos e subprodutos

A fermentação alcoólica é a ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico onde a energia formada por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para a multiplicação de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose para produção de álcool e gás carbônico (LIMA; MARCONDES, 2002). O processo de produção de álcool combustível no Brasil utiliza a sacarose na forma de caldo de cana ou melação diluído como substrato para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que resulta em alta produção de etanol.

A conversão do açúcar em etanol e CO₂ envolve 12 reações em sequência ordenada, onde uma enzima específica catalisa cada reação, como mostra a Figura 1. Tal aparato enzimático encontra-se confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Figura 1 - Sequência de reações enzimáticas da fermentação alcoólica.



Fonte: LIMA; BASSO; AMORIM, (2001).

O processo de transformação, onde os açúcares solúveis são quebrados em moléculas menores tendo como agente a levedura, apresenta dois ciclos distintos, onde um deles é a glicólise, que tem a função de "romper" a molécula de glicose até ácido pirúvico, por meio de uma sequência de reações catalisadas por enzimas e situadas na parede celular e interior da célula (SALVATO, 2010). Quando a reação ocorre na ausência de oxigênio há uma tendência para a laboração das enzimas piruvato Descarboxilase e álcool-desidrogenase, fornecendo etanol e água partindo do ácido pirúvico. Na presença de oxigênio ocorre um deslocamento reacional, onde parte do ácido pirúvico é transposto para o Ciclo de Krebs, então haverá oxidação a dióxido de carbono e água (TOSETTO, 2008).

3.2 Matérias-primas utilizadas

Os carboidratos considerados substratos para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio e a trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). De acordo com Macedo (1993), as matérias-primas que podem ser utilizadas para produção de etanol são classificadas em 3 grandes grupos: açucaradas (direta ou indiretamente fermentescíveis), amiláceas e celulósicas (indiretamente fermentescíveis).

3.3 Tipos de fermentação

Os processos fermentativos classificam-se de acordo com a maneira pela qual o substrato é adicionado e o produto retirado. Existem três tipos básicos de processos fermentativos para a obtenção de etanol: batelada simples, contínuo e batelada alimentada com reciclo de inóculo, conhecido como Melle-Boinot (FERREIRA, 2005). Grande parte dos processos fermentativos industriais são conduzidos em batelada alimentada, sendo este o modelo de operação mais efetivo para lidar com problemas como inibição pelo substrato e repressão catabólica.

3.4 Fatores que influenciam o rendimento fermentativo

De acordo com Batista (2005), devido a um número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, vários fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais, orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem, concentração da levedura, contaminação bacteriana),

prejudicam o rendimento da fermentação, então a eficiência da conversão de açúcar em etanol diminui (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Basicamente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma mudança na estequiometria do processo, onde os produtos secundários são produzidos em maior quantidade (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Com a redução na produção de etanol, as reações secundárias diminuem o rendimento teórico da fermentação, conhecido como rendimento Pasteur, que cai para um máximo de 95% sobre 0,511 g/g de ART. Quando os nutrientes são deficientes, as leveduras entram em processo de meiose para formarem esporos haplóides, os quais germinam quando as condições se tornam favoráveis (BATISTA, 2005). A Tabela 1 mostra os nutrientes minerais do mosto e suas concentrações ideais para o perfeito desenvolvimento das leveduras.

Tabela 1 - Nutrientes necessários ao crescimento de leveduras e suas respectivas concentrações.

Nutriente mineral	Conc.(mg/L)	Nutriente mineral	Conc.(mg/L)
NH ₄ ⁺	50 a 150	Co ²⁺	3,5 a 10
P	62 a 560	Zn ²⁺	0,5 a 10
K ⁺	700 a 800	Cu ²⁺	7
Ca ²⁺	120	Mn ²⁺	10 a 80
Mg ²⁺	70 a 200	Fe ²⁺	0,2
SO ₄ ²⁻	7 a 280	Na ⁺	200

Fonte: Adaptada de LIMA; BASSO; AMORIM (2001).

3.5 Fatores determinantes para produção de etanol

A relevância da levedura *S. cerevisiae* no processo industrial, é decorrente de uma gama de aptidões que justificam seu uso na produção de etanol, e a alta capacidade fermentativa aliada à tolerância as elevadas concentrações de etanol e aos inibidores produzidos durante o processo, tolerância as altas temperaturas, osmolaridade e baixas medidas de pH (ANDRIETTA, M. G. S; STECKELBERG; ANDRIETTA, S.R., 2006; MUSSATTO et al.; 2010).

3.5.1 Efeito do pH do substrato

O pH é um fator relevante para as fermentações industriais devido à sua influência seja no controle da contaminação bacteriana seja quanto ao seu efeito sobre o crescimento celular, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009). As fermentações se

desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo a ideal entre 4 e 5 (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Elevando-se o pH até 7, observa-se, geralmente, uma redução do rendimento em álcool, com aumento da produção de ácido acético (SOUZA, 2009). Os valores de pH dos mostos industriais geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5. Industrialmente, a reutilização da levedura é feita através do tratamento com ácido sulfúrico com pH de 2,0 a 3,2 durante aproximadamente uma a duas horas, visando a redução da carga microbiana (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos de álcool, porque há restrição da multiplicação celular, e redução do risco de contaminação bacteriana (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

3.5.2 Temperatura

Uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de microrganismos é a temperatura, tendo influência no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular (BATISTA, 2001). As temperaturas ideais para a produção industrial de álcool situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas, esporadicamente, a temperatura nas destilarias atinge 38°C, dependendo das condições climáticas da região. Com o aumento da temperatura, eleva-se a velocidade da fermentação, mas propicia a contaminação bacteriana, e torna a levedura mais sensível a toxidez do álcool, acelerando a formação de metabólitos secundários como o glicerol. Outro efeito do aumento de temperatura é a perda de álcool por evaporação em dornas abertas. Tais aspectos justificam a necessidade de controle da temperatura no processo industrial (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

3.5.3 Concentração das fontes de carbono fermentescíveis

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares que compõem a cana-de-açúcar, que são basicamente glicose, frutose e sacarose (STECKELBERG, 2001). As linhagens de levedura que são comumente utilizadas nos processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada (SOUZA, 2009). Com o aumento da concentração de açúcares, a velocidade de fermentação se eleva, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, e menor produção de álcool. O estresse decorrente do aumento da osmolaridade externa leva a um menor crescimento e redução da população celular das leveduras, devido às variações no gradiente osmótico através da membrana plasmática, ou seja, ocorre uma redução

da concentração de células, que diminuem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

3.5.4 Oxigênio

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tem características facultativas no que diz respeito à utilização do oxigênio, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência como na presença de oxigênio. Porém, quando há altas concentrações de açúcares ocorre inibição da atividade respiratória das enzimas, levando a produção de álcool na presença de oxigênio, denominado Efeito Crabtree (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1986). Quando a fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, ocorre um fenômeno chamado “Efeito Pasteur”, que está diretamente ligado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento (fase estacionária) nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose. Quando ocorre o crescimento celular (fase exponencial) não há diferença significativa quanto a velocidade de consumo do substrato entre células aeróbias e anaeróbias (STECKELBERG, 2001).

3.5.5 Etanol

O efeito inibitório do álcool produzido por leveduras *Saccharomyces* durante a fermentação é complexo e pode ser considerado como o principal fator a desencadear fermentação incompleta. Portanto, estudar os efeitos de altas concentrações de álcool sobre a levedura pode ser um ponto positivo para melhorar a fermentação. Em excesso, o álcool reduz o crescimento da levedura, diminui viabilidade e habilidade fermentativa (FERREIRA, 2002). Os fatores que atuam na sensibilidade do álcool (aeração, composição do meio, temperatura) podem agir direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática. Entretanto, o excesso de álcool pode levar a uma série de modificações nas propriedades da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e agir sobre a enzima álcool-desidrogenase entre outras (STECKELBERG, 2001).

3.5.6 Viabilidade Celular

A viabilidade é certamente um aspecto a ser considerado no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior esse número melhor desempenho terá o processo. Como o ambiente das dornas de fermentação não é constante, dificilmente a viabilidade é mantida com valores

excelentes, por isso um controle cuidadoso deve ser feito nas unidades produtoras (STECKELBERG, 2001).

3.5.7 Floculação

Na floculação ocorrida na fermentação alcoólica por leveduras, as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada. Cessada a fase tumultuosa da fermentação, ou quando há agitação mecânica no fermentador e a mesma é interrompida, esses flocos sedimentam-se rapidamente ou flutam devido a formação das bolhas de gases. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em álcool e CO₂, pela diminuição da área de contato entre as células e o meio (MUTTON; SOUZA, 2004). Este fenômeno pode causar perda de células na centrífuga e o conseqüente consumo de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico (LUDWING; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001). A floculação ocorre devido a diversos fatores entre eles destacam-se o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias, ou o contato entre bactérias indutoras da floculação, ou ainda devido à contaminação por leveduras floculantes. No setor de fermentação e destilação as bactérias lácticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis, especialmente, o gênero *Lactobacillus* que apresenta baixa suscetibilidade ao álcool (LUDWING; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

3.5.8 Contaminação bacteriana

A fermentação industrial, pela dimensão do processo não é conduzida em condições ideais de assepsia, por isso a contaminação bacteriana, principalmente por *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e conforme a sua concentração, compromete o rendimento do processo fermentativo. Altas temperaturas de fermentação ocasionam uma elevação na população bacteriana, redução na produção de álcool, aumento do tempo de fermentação e conseqüente estresse da levedura. A contaminação bacteriana relaciona-se com o aumento da formação de ácido láctico e, embora não exista comprovação da causa da floculação da levedura, na indústria acredita-se que a contaminação é a protagonista dos problemas encontrados na fermentação alcoólica (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

As bactérias contaminantes produzem ácidos orgânicos e gomas (dextranas) a partir dos açúcares contidos no mosto, que afetam negativamente a viabilidade das células de leveduras, diminuindo o tempo de vida no processo e conseqüentemente trazendo prejuízo à

produção de etanol (ALQUATI, 1990). Assim entre os problemas encontrados na fermentação alcoólica podem-se mencionar as fermentações indesejáveis, entre as quais tem-se a acética, láctica, butírica, da dextrana e da levana.

A contaminação bacteriana é um fator de extrema relevância no processo de produção do álcool através de bioconversão dos açúcares em álcool, não só pelo fato de desviar a conversão das matérias-primas fermentescíveis em substâncias indesejáveis, como ácidos láctico e acético, e também por consumir parte do álcool, provocando assim, quedas no rendimento fermentativo (ALQUATI, 1990). Às vezes é vantajoso optar por fatores estressantes, entre eles do tratamento ácido, que pode ser estressante à levedura, mas acaba beneficiando o processo controlando a contaminação (STECKELBERG, 2001).

3.5.9 Agente fermentativo

As leveduras são fungos unicelulares que, geralmente, se reproduzem vegetativamente por brotamento. O número de brotos que uma célula de levedura é capaz de gerar ao longo da vida, é de 15 a 25. Quanto ao envelhecimento celular de leveduras, a literatura cita a idade replicativa e idade cronológica (REVERTER-BRANCHAT et al., 2004).

O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A microflora dos processos fermentativos industriais pode constituir uma boa fonte de micro-organismos com características relevantes do ponto de vista industrial, especialmente leveduras tolerantes ao stress (MUSSATTO et al., 2010; BASSO et al., 2008), pois é sabido que durante o processo de propagação da biomassa (HOHMANN, 2002; ESTRUCH, 2000) as células estão frequentemente sujeitas a inúmeros estímulos estressantes (MUSSATTO et al., 2010; BASSO et al., 2008) tais como: estresse osmótico, oxidativo e térmico; exposição a altas concentrações de etanol e/ou falta de nutrientes e ressecamento. Estas condições adversas podem afetar dramaticamente a dinâmica da população, a fermentação industrial e conseqüentemente a produção de etanol (HOHMANN, 2002; ESTRUCH, 2000).

3.6 Leveduras industriais

Leveduras selecionadas em laboratório e leveduras utilizadas em processos industriais, mesmo quando fazem parte da mesma espécie, apresentam grandes diferenças, tanto em termos genéticos, quanto em termos de sua fisiologia. Em condições industriais, seja na produção de levedura de panificação, de cerveja, de vinho, de bebidas destiladas, de etanol combustível ou de outros produtos, as leveduras acabam sofrendo um processo de adaptação às condições particulares do processo, o que envolve fenômenos como, por exemplo, a multiplicação do número de genes ou até mesmo de cromossomos inteiros (MARULLO et al., 2004; QUEROL et al., 2003; BENITEZ et al., 1996). Assim, ao longo dos séculos, cada processo industrial acaba selecionando as linhagens mais adaptadas às suas condições específicas.

A reutilização do inóculo introduzido inicialmente durante toda a safra pode estar associada à contínua entrada de microrganismos contaminantes no sistema e à exposição a vários tipos de estresses ambientais, gerando um ambiente altamente competitivo e seletivo no interior das dornas fermentativas, constituindo uma barreira importante para a injeção de leveduras melhoradas no processo. Por isso, apesar de alguns experimentos terem obtido êxito no desenvolvimento de linhagens mais produtivas por meio do melhoramento genético tradicional (TAVARES, 1992), a permanência dessas leveduras no processo é comprometida pela maior capacidade de adaptação de linhagens selvagens ou contaminantes, que podem se multiplicar nas dornas, e até substituir por completo o inóculo inicial. Essa substituição, por sua vez, pode ser acompanhada por uma redução no rendimento do processo devido às propriedades indesejáveis de muitos desses contaminantes (WHEALS et al., 1999).

3.6.1 Linhagens selecionadas *versus* linhagens selvagens

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. Quanto às leveduras do processo de álcool a estabilidade genética pode estar relacionada à utilização de uma levedura nativa (selvagem ou contaminante) como inóculo (STROPPIA, 2002).

Andrietta et al. (2007), Parazzi e Oliveira (1996) e Ferrari et al. (1980), obtiveram por isolamento e fizeram avaliação de algumas dessas leveduras selvagens quanto ao seu potencial fermentativo na produção de etanol constatando a hegemonia e rusticidade dessas linhagens aliados a um ótimo desempenho fermentativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem e obtenção de linhagens de leveduras industriais e análise da diversidade macro morfológica

Amostras foram coletadas na usina Santa Clotilde situada no município de Rio Largo - Alagoas, o inóculo utilizado no processo foi coletado no final da safra 2014/2015 e obtido na forma fluidizada denominados, mosto em fermentação ou ainda inicial (duas horas de fermentação), mosto fermentado final (oito horas de fermentação). O melaço utilizado no processo foi cedido pela usina para ser utilizado como substrato da fermentação seletiva, e nos testes fermentativos. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microscopia, Genética e Microbiologia situado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, onde foram refrigeradas e posteriormente submetidas à análise de diversidade macro morfológica pelo processo de engenharia evolutiva.

4.2 Obtenção dos morfotipos oriundos da diversidade

As amostras coletadas de mostos fermentados foram diluídas serialmente em solução salina 0,85% até 1:10⁶, e uma alíquota de 0,02 mL da diluição foi plaqueada em duplicata por espalhamento conforme descrito por Silva (2009) na superfície do meio WLN (glicose 2%, extrato de levedura 0,4%, caseína 0,5%, fosfato de potássio 0,005%, cloreto de potássio 0,043%, cloreto de cálcio 0,013%, sulfato de magnésio 0,013%, cloreto férrico 0,00025%, sulfato de manganês 0,00025%, verde de bromocresol 0,0022%, agar 2%, cloranfenicol 0,0050% e pH 5,5 ajustado com ácido clorídrico 1N). A diluição foi realizada para obter cultivos em meio sólido com aproximadamente 30 a 100 colônias de leveduras por placa. A incubação foi realizada a 30°C por sete dias, adaptado de Oliveira et al., 2004.

4.3 Contagem, isolamento e purificação das colônias

Os morfotipos foram caracterizados morfológicamente quanto à borda, superfície, consistência, tamanho e cor. Após definição dos morfotipos, as frequências foram calculadas pelas porcentagens com relação ao total de colônias daquela placa (duplicata). Foram determinados a morfologia das leveduras presentes nos mostos do início e final da fermentação da dorna na usina. No crescimento dos mostos fermentados em meio de cultivo WLN foi realizado um somatório das colônias apresentadas por diluição. O isolamento das leveduras foi

realizado através de amostragem dos representantes dos morfotipos distintos e todas as colônias distintas foram utilizadas para extração de DNA e tipagem genética.

4.4 Manutenção das linhagens

As colônias selecionadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio YPD-ágar (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose e 2% ágar bacteriológico) acrescido de cloranfenicol (50 μ g/ml) e Kamoran (50 μ g/ml). As placas foram incubadas a 30°C de 18 a 24 horas e mantidas a 4°C.

4.5 Fermentação com fatores de estresse para pressão de seleção

O processo de engenharia evolutiva foi realizado por meio de 24 ciclos em bateladas simples. Através de uma fermentação em batelada simples, tubos de ensaio contendo mosto de melação ajustado entre 17°Brix (ciclo inicial) e 22°Brix (ciclo final) (SILVA et al., 2005); foram inoculados com alíquotas centrifugadas (2%) da cultura mista (amostras), permanecendo o mesmo Brix por 4 ciclos de 24 horas, 3g.L⁻¹ de Ácido lático, 0,66g/l de Ácido acético, e 6,7% (v/v) de álcool etílico absoluto, 10mg.L⁻¹ de antibiótico Kamoran, e 10mg.L⁻¹ de antibiótico cloranfenicol e temperatura a 30°C. A cada ciclo, os tubos foram centrifugados e adicionado água acidificada com ácido sulfúrico pH 2,5 por 2 horas, após isso iniciou-se um novo ciclo. Ao final de 4 ciclos consecutivos houve o aumento em 1°Brix. As bateladas iniciaram com mosto de seleção contendo 17°Brix aumentando gradativamente para que nas bateladas finais a pressão de seleção seja para cultivos contendo 22°Brix. Após os 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse foi realizada a contagem, o isolamento, a purificação das colônias e extração de DNA das culturas purificadas.

4.6 Extração de DNA

As cepas isoladas foram inoculadas em meio YPD líquido e incubados a 30°C por 16 a 18 horas. Amostras de 1,0mL de cada cultura foi transferida para microtubos de 2,0mL e centrifugados por três minutos a 5.900G. O método utilizado foi o Doyle & Doyle (1990) modificado. O DNA foi extraído a partir de 100mg de massa celular que foi adicionado 750 μ L de tampão com CTAB (contendo 2% de CTAB, 200mM de Tris-HCl pH 8,0, 70mM de EDTA pH 8,0, 2M de NaCl, 2% de PVP, 0,2% de β -mercaptoethanol e 10 μ L de Proteinase- K (50 μ g.L⁻¹) e incubado a 65°C por 30 minutos. A solução foi resfriada e adicionada 0,750 μ L de fenol-

clorofórmio (1:1) até formar emulsão e centrifugado a 12000G por 10 minutos. A desproteinização foi realizada pela segunda vez, adicionado 650µL de fenol-clorofórmio (1:1) até formar emulsão e centrifugado a 12000G por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado, deixado por 30 minutos a - 20°C. a solução foi centrifugada a 12000G por 15 minutos e o líquido foi descartado. O precipitado formado foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 11000G por 15 minutos. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e o DNA solubilizado com 50µL de TE com RNAase. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% submetidos a 7,5 volts/cm por 120 minutos em tampão TAE 1x corados com *SybrGreen*, visualizados em transluminador ultravioleta e fotografados.

4.7 Amplificação dos fragmentos de DNA por meio de microssatélites (GTG)₅

A reação de amplificação de sequências simples entre repetições (ISSR) por PCR com o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅, permitiu a caracterização de padrões genéticos para as linhagens isoladas.

As reações de PCR foram realizadas com volume final de reação de 25µl conforme metodologia descrita por Silva-Filho (2005), contendo tampão de PCR 10X; BSA (soro albumina bovina) 0,25µg µL⁻¹, 100 µM de cada dATP, TTP, dCTP, dGTP, 1,0pmol.µL⁻¹ do iniciador (GTG)₅ (LIECKFELDT; MEYER; BÖRNER, 1993), 50,0 ng.µL⁻¹ de DNA e 5 U.µL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase. A amplificação para (GTG)₅ foi programada em Termociclador Rotor Gene-Q (QUIAGEN) para um ciclo de desnaturação de cinco minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos (SILVA-FILHO, 2005). Os fragmentos amplificados foram separados por gel de agarose 2,0% e submetidos a 7,5 volts/cm por 150 minutos em tampão TAE 1x corados com o fluoróforo *SyberGreen* e visualizados com auxílio do sistema de fotodocumentação L-PIX (LOCCUS Biotecnologia).

4.8 Cinética de crescimento celular

Com a construção da curva absorvância *versus* tempo para o crescimento celular medida por absorvância através de uma fermentação com temperatura e agitação constantes, determina-se a velocidade de multiplicação das células através de densidade ótica, proposta por Hiss, (2001), obtida com o auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda ajustado em 600nm, e leitura em absorvância (ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.;

RODRIGUES, 1995). Um comportamento característico do crescimento celular é o aumento da concentração observada quando ocorre a inoculação em meio de cultura favorável ao crescimento celular de leveduras (GRETSCHMANN, 2009; HISS, 2001).

O parâmetro cinético $\mu_{\text{máx}}$ foi determinado com o auxílio do Excel; identificando a fase log da curva de crescimento, foi plotado outro gráfico exponencial, utilizando a equação abaixo:

$$\ln(x_o/x_i) = \mu_{\text{máx}}$$

Onde: x_o = leitura inicial, e x_i = leitura atual.

Fez-se o plaqueamento dos isolados selecionados em placas de Petri e permaneceu por dois dias em crescimento, a massa celular foi transferida para 10 mL de YPD líquido, e após 24 horas transferiu-se os 10mL para 100mL do meio de cultivo.

Após a inoculação foi feita uma diluição 1:10 com água destilada e agitada em vórtex para ser realizada a primeira leitura (L_o), em espectrofotômetro a um comprimento de onda 600nm, e a leitura foi feita em absorbância. Os meios foram mantidos em estufa incubadora tipo Shaker com agitação constante a 150 rpm em 30°C por 8 horas, e as leituras foram feitas a cada 1 hora, totalizando 9 leituras. Após isso os dados foram plotados em uma curva de regressão linear, e a partir dos dados do coeficiente angular obtido cálculo da equação linear de primeiro grau encontrou-se a taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$).

A partir dos dados obtidos, foram selecionados os morfotipos que apresentaram maior velocidade de multiplicação, tendo como referência as leveduras industriais CAT-1 e PE-2 (NOVELLO, 2015; AMORIM et al., 2011; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, 2011).

4.9 Testes de resistência aos fatores de estresse individuais

Para a realização dos testes de resistência composto por fatores de estresse geralmente encontrados nas indústrias etanólicas, tornou-se necessário compor 2 grupos com os seis morfotipos selecionados da taxa de crescimento específica, onde o primeiro grupo, denominado T01, formado com três isolados da diversidade juntamente com a levedura de referência CAT-1, o segundo grupo, denominado T02, formado com três isolados da pressão de seleção tendo a levedura CAT-1 como referência. Para cada isolado, o crescimento celular em meio YPD líquido por 24 horas foi feito, após isso realizou-se a contagem em Câmara de Neubauer e

posterior calibração do meio para 10^7 células/mL. Este meio fermentado foi utilizado como inóculo em todos os testes de resistência. A resistência ao etanol, glicose, temperatura e pH foram determinadas por testes, conforme o protocolo modificado de Reis (2011).

4.9.1 Resistência aos pH's 1, 3 e 5

Em geral, as leveduras crescem melhor em meio ácido, com pH na faixa de 4 a 5 (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). O teste de tolerância ao pH é composto de duas etapas, onde inicia-se com meio YPD líquido, com pH 1, 3 e 5, sendo adicionado o inóculo, ficando a concentração final igual a 10% da concentração do inóculo. Os tubos de ensaio em duplicata foram incubados a 30°C por 7 dias. Na segunda etapa, fez-se um plaqueamento em gotas das culturas crescidas em pH's variados, utilizando meio YPD sólido, seguindo os grupos T01 e T02, com diluições que variaram de 10^0 até 10^{-4} , e então foram incubadas por 4 dias a 30°C.

4.9.2 Resistência ao estresse etanólico

As leveduras geralmente apresentam um limite de produção de álcool, e quando este é superado, o produto causa toxidez, podendo ser até letal para as leveduras. O teste de estresse etanólico é composto de duas etapas, onde inicia-se com meio YPD líquido, com 0, 11 e 22% de etanol (v/v), sendo adicionado o inóculo, ficando a concentração final do inóculo é igual a 10%. Os tubos de ensaio em duplicata foram incubados a 30°C por 4 dias. Na segunda etapa, fez-se um plaqueamento em gotas das culturas crescidas em 0, 11 e 22% de etanol (v/v), utilizando meio YPD sólido, seguindo os grupos T01 e T02, com diluições que variaram de 10^0 até 10^{-4} , e permaneceram incubadas por 4 dias a 30°C.

4.9.3 Temperatura

O controle da temperatura é um fator de grande valia durante o processo de fermentação, pois a levedura tem um bom desempenho entre temperaturas de 25°C e 30°C. Valores de temperatura acima destes citados geram declínio da levedura, favorece o aparecimento de outros microrganismos e ocasionam maiores perdas de etanol por evaporação, já temperaturas inferiores a 25°C tornam a levedura lenta (CARDOSO, 2006).

Cepas industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes a altas temperaturas (MONACO, 2007), mas este fator causa queda na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA-FILHO et al., 2005). Fez-se uma diluição

seriada e plaqueamento em gotas das culturas crescidas a 30, 35, e 40°C utilizando meio YPD sólido, seguindo os grupos T01 e T02, com diluições que variaram de 10^0 até 10^{-4} , e permaneceram incubadas por 4 dias a 30°C.

4.9.4 Altas concentrações de glicose

Altas concentrações de açúcares resultam em elevados teores alcoólicos, podendo comprometer a viabilidade das células ou ainda resultar em fermentações lentas e incompletas, com formação de subprodutos. Com isso, tem-se menores rendimentos alcoólicos e baixa viabilidade celular da levedura, favorecendo desenvolvimento de contaminantes (ANGELIS, 1992). Fez-se uma diluição seriada e plaqueamentos em gotas das culturas crescidas a 100 e 250g.L⁻¹ de glicose utilizando meio YP sólido com 100 e 250g.L⁻¹ de glicose, seguindo os grupos T01 e T02, com diluições que variaram de 10^0 até 10^{-4} , e permaneceram incubadas por 4 dias a 30°C.

4.9.5 Altas concentrações de sacarose

O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade leva a diminuição do crescimento da viabilidade celular, devido à interferência no gradiente osmótico da membrana plasmática (SOUZA, 2009). Segundo Pataro et al. (1998), quando leveduras são cultivadas em meios contendo altos teores de sacarose, a seleção de *Saccharomyces cerevisiae* é favorecida, pois estas possuem uma atividade invertásica bastante desenvolvida, o que pode significar uma maior capacidade fermentativa. As linhagens foram testadas quanto à capacidade de crescer em altas concentrações do dissacarídeo sacarose. Fez-se uma diluição seriada e plaqueamento em gotas das culturas crescidas, utilizando meio YP sólido com 100 e 250g.L⁻¹ de sacarose, seguindo os grupos T01 e T02, com diluições que variaram de 10^0 até 10^{-4} , e permaneceram incubadas por 4 dias a 30°C.

4.9.6 Ensaio fermentativos combinando fatores estressantes

Os ensaios fermentativos combinaram a temperatura, um dos maiores inconvenientes na região nordeste, ao uso de melaço diluído como substrato, com Brix de 17 e 22, sem adição de nutrientes, 10mg.L⁻¹ de antibiótico Kamoran, pH 5,45 e a concentração do inóculo foi de 0,2%. em uma fermentação em batelada simples com temperaturas de 30 e 40°C em estufa incubadora

tipo Shaker com agitação constante de 150rpm por 24 horas. Avaliou-se a viabilidade pela contagem em câmara de Neubauer, o consumo de substrato foi determinado pela redução de Brix, e pH final, e a massa seca produzida foi determinada por secagem em estufa a 105 °C até peso constante (TIBAYRENC et al., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade macro morfológica das leveduras isoladas antes da pressão de seleção

A análise macro morfológica do mosto no início da fermentação na dorna (2 horas de fermentação) possibilitou a observação de 549 colônias de levedura, sendo os morfotipos de aspecto liso e rugoso, com variações no tamanho e tipo de borda da colônia e com a coloração variando entre branco, creme até o verde escuro. Abaixo, a Tabela 2 mostra a porcentagem de cada morfotipo e suas características constatando a predominância de colônias rugosas e com coloração creme equivalendo a 65,57 %.

Tabela 2 - Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto em fermentação inicial utilizado no processo fermentativo

Código do isolado	Morfologia	Concentração celular	Média nas placas	Porcentagem
SC-1	Verde clara borda escura rugosa	1,63E+07	1	0,73%
SC-2	Creme rugosa	1,20E+09	90	65,57%
SC-3	Branca rugosa	3,86E+08	30	21,86%
SC-4	Branca com borda verde rugosa	3,38E+07	4,5	3,28%
SC-5	Verde rugosa	5,00E+07	10	7,29%
SC-6	Lisa branca	1,75E+07	1,25	0,91%
SC-7	Verde centro escuro lisa	1,25E+07	0,25	0,18%
SC-8	Verde escura rugosa	1,25E+07	0,25	0,18%

da usina Santa Clotilde correspondente a safra 2014/2015.

Fonte: Autora, 2018.

A análise morfológica do mosto após 8 horas de fermentação da dorna possibilitou a observação de 171 colônias de levedura sendo os morfotipos de aspecto liso e rugoso, com variações no tamanho e tipo de borda da colônia e com a coloração variando entre branco, creme até o verde escuro. A seguir, a Tabela 3 mostra a porcentagem de cada morfotipo e suas características, constatando ligeira predominância rugosa e com coloração branca de 39,73%, seguida das colônias creme rugosas com 39,29%.

Tabela 3 - Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto fermentado (após 8 horas de fermentação) utilizado no processo fermentativo da usina Santa Clotilde correspondente a safra 2014/2015.

Código do isolado	Morfologia	Concentração celular	Média nas placas	Porcentagem
SC-9	Creme borda cinza rugosa	1,39E+08	7,5	13,39%
SC-10	Verde rugosa	2,50E+06	0,5	0,89%
SC-11	Branca rugosa	8,38E+07	22,25	39,73%
SC-12	Creme centro umbonado rugosa	2,50E+06	0,75	1,34%
SC-13	Mesclada verde/branca rugosa	2,50E+06	0,5	0,89%
SC-14	Creme centro verde rugosa	1,25E+06	0,5	0,89%
SC-15	Creme rugosa	3,80E+08	22	39,29%
SC-16	Branca lisa	2,50E+07	0,5	0,89%
SC-17	Amarela rugosa	3,75E+07	0,75	1,34%
SC-18	Amarela lisa	1,25E+07	0,25	0,45%
SC-19	Branca pequena lisa	1,25E+07	0,25	0,45%
SC-20	Branca centro elevado rugosa	1,25E+07	0,25	0,45%

Fonte: Autora, 2018.

5.1.1 Caracterização morfológica das colônias isoladas da diversidade antes da pressão de seleção

Nos plaqueamentos foram observados variados morfotipos com colônias de leveduras sendo lisa ou rugosa, e tamanhos e tipos de bordas variados, com a coloração variando do branco, passando pelo creme e amarelo até o verde escuro. A seleção morfológica por meios de cultura seletivos e diferenciais têm sido amplamente utilizados com o objetivo de quantificar, selecionar e diferenciar leveduras de processos fermentativos. Entre eles, o meio diferencial Wallerstein Laboratory Nutrient Medium (GREEN; GRAY, 1951), onde o verde de bromocresol atua como indicador de pH, colorindo diferencialmente colônias como resultado dos diferentes níveis de afinidade entre os microrganismos e o corante, (REIS, 2011; STROPPA; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S, 2003). A determinação da diversidade de *S. cerevisiae* em usinas de açúcar e álcool brasileiras com o meio WLN foi validado pela análise genética de cariotipagem e por testes de eficiência fermentativas, as leveduras com mesma morfologia apresentaram o mesmo perfil cromossômico e mesmo desempenho fermentativo (STROPPA; ANDRIETTA, S. R. ; ANDRIETTA, M. G. S 2003).

Os morfotipos obtidos do plaqueamento do mosto após 8 horas de fermentação em uma dorna da usina Santa Clotilde no final da safra 2014/2015 foram os que apresentaram maior diversidade, podendo ser observados 12 morfotipos enquanto que o início da fermentação apenas 8 morfotipos, após 8 horas de fermentação surgiram outros morfotipos, a predominância inicial era da colônia de aspecto rugoso com coloração creme em torno de 65,5%, e as colônias de aspecto liso representavam 1,09%; após as 8 horas de fermentação a predominância é da colônia de aspecto rugoso com coloração branca em torno de 39,7% , ficando o morfotipo de aspecto rugoso com coloração em torno de 39,2%, e as colônias de aspecto liso representavam 1,79%.

5.2 Diversidade morfológica das leveduras isoladas após pressão de seleção

A morfologia das leveduras presentes no mosto no início da fermentação em um reator após pressão de seleção por meio de 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados possibilitou a observação de 744 colônias de leveduras, sendo os morfotipos de aspecto liso e rugoso, com variações no tamanho e tipo de borda da colônia e com a coloração variando entre branco, creme até o verde. Abaixo, a Tabela 4 mostra a porcentagem de cada morfotipo e suas características constatando a predominância de colônias rugosas e com coloração creme equivalendo a 76,04%.

Tabela 4 - Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto em fermentação (após 2 horas de fermentação) após pressão de seleção por meio de 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados.

Código do isolado	Morfologia	Concentração celular	Média nas placas	Porcentagem
SC-32	Creme lisa	3,75E+06	0,75	0,40%
SC-33	Branca pequena rugosa	7,50E+06	1,50	0,81%
SC-34	Creme pequena rugosa	6,04E+08	35,25	18,98%
SC-35	Amarela lisa	1,25E+06	0,25	0,13%
SC-36	Verde rugosa	2,50E+06	0,50	0,27%
SC-37	Creme centro esverdeado rugosa	1,25E+07	0,25	0,13%
SC-38	Verde lisa	1,25E+07	0,25	0,13%
SC-39	Branca rugosa	7,75E+07	4,25	2,29%
SC-40	Creme pequena lisa	2,88E+07	1,25	0,67%
SC-41	Creme centro verde rugosa	1,25E+06	0,25	0,13%
SC-42	Creme rugosa	9,20E+08	141,25	76,04%

Fonte: Autora, 2018.

A morfologia das leveduras presentes no mosto após 8 horas de fermentação depois da pressão de seleção por meio de fermentação com fatores de estresse possibilitou a observação de 729 colônias de leveduras sendo os morfotipos de aspecto liso e rugoso, com variações no tamanho e tipo de bordo da colônia e com a coloração variando entre branco, creme, amarelo até o verde escuro. A Tabela 5 mostra a porcentagem de cada morfotipo e suas características constatando a predominância rugosa e com coloração creme equivalendo a 54,64%.

Tabela 5 - Morfologia, concentração celular, média e porcentagem de colônias observadas por morfotipo dos plaqueamentos do mosto fermentado (8 horas de fermentação) após pressão de seleção por meio de vinte ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados.

Código do isolado	Morfologia	Concentração celular	Média nas placas	Porcentagem
SC-44	Creme lisa	1,04E+08	2,75	1,59%
SC-45	Creme rugosa	2,16E+09	94,25	54,64%
SC-46	Creme puntiforme pequena lisa	4,75E+08	2,00	1,16%
SC-47	Branca lisa	4,25E+07	0,50	0,29%
SC-48	Branca rugosa	1,25E+06	5,00	2,90%
SC-49	Verde escura lisa	9,25E+07	3,00	1,74%
SC-50	Creme centro esverdeado rugosa	5,00E+07	0,50	0,29%
SC-51	Branca pequena rugosa	2,29E+08	12,00	6,96%
SC-52	Creme pequena rugosa	4,75E+08	47,75	27,68%
SC-53	Creme puntiforme lisa	4,25E+07	1,75	1,01%
SC-54	Branca pequena lisa	1,25E+06	0,25	0,14%
SC-55	Creme centro verde rugosa	9,25E+07	2,75	1,59%

Fonte: Autora, 2018.

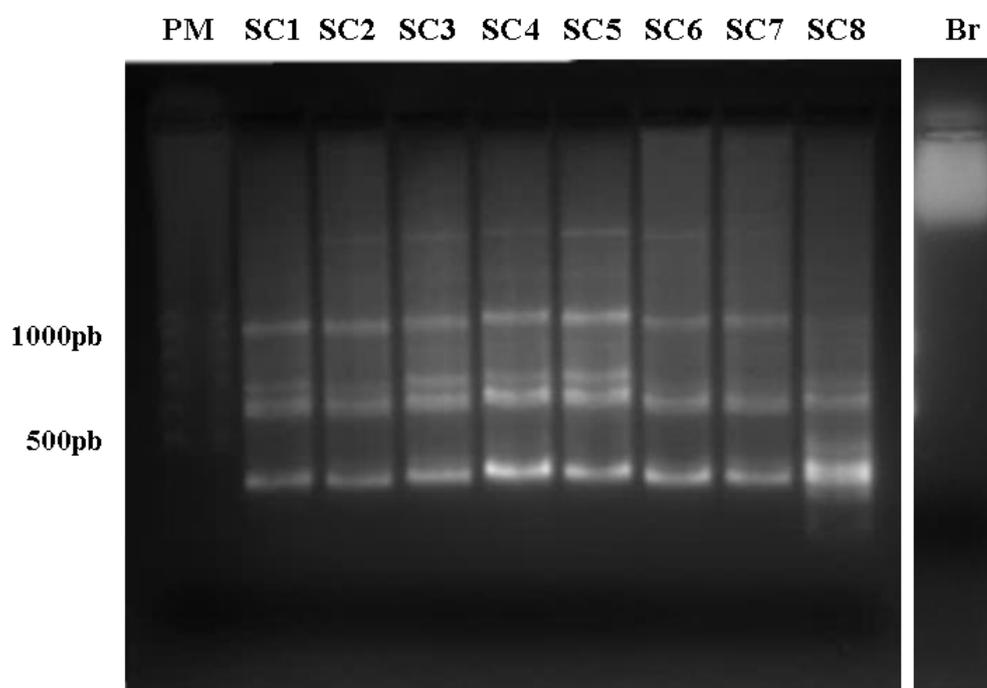
5.2.1 Análise da diversidade morfológica após a pressão de seleção

No processo de pressão de seleção do mosto no início da fermentação de uma dorna por meio de fermentação com fatores de estresse foi possível observar a predominância da colônia de aspecto rugoso com coloração creme com 76,04%, e as colônias de aspecto liso representavam 1,33%. Enquanto o mosto após 8 horas de fermentação de uma dorna depois de pressão de seleção por meio de fermentação com fatores de estresse observou-se a predominância da levedura rugosa creme em 54,64%, e as colônias de aspecto liso representavam 5,93%.

5.3 Análise da diversidade genética antes da pressão de seleção

A análise da diversidade genética das leveduras presentes no início do mosto da fermentação foi realizada com os representantes de cada morfotipo. Na Figura 2 após averiguação, é possível observar uma amplificação polimórfica nos tamanhos de fragmento, variando de 300 a 1500 pares de base. Acerca dos padrões de amplificação, é possível classificar em 5 grupos, designados de G1, G2, G3, G4, G5.

Figura 2 - Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras presentes no início da fermentação industrial com o primer (GTG)₅. Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 100pb.



Fonte: Autora, 2018.

No grupo G1 estão os isolados SC-1, SC-2, SC-3, SC-4, SC-5, SC-6 e SC-7 do início da fermentação, e no grupo G2 está o isolado SC-8 demonstrando pouca variabilidade genética nesta etapa da fermentação. Na Tabela 6, a seguir, após análise, foi observado que o grupo genético G1 apresenta diferentes morfotipos.

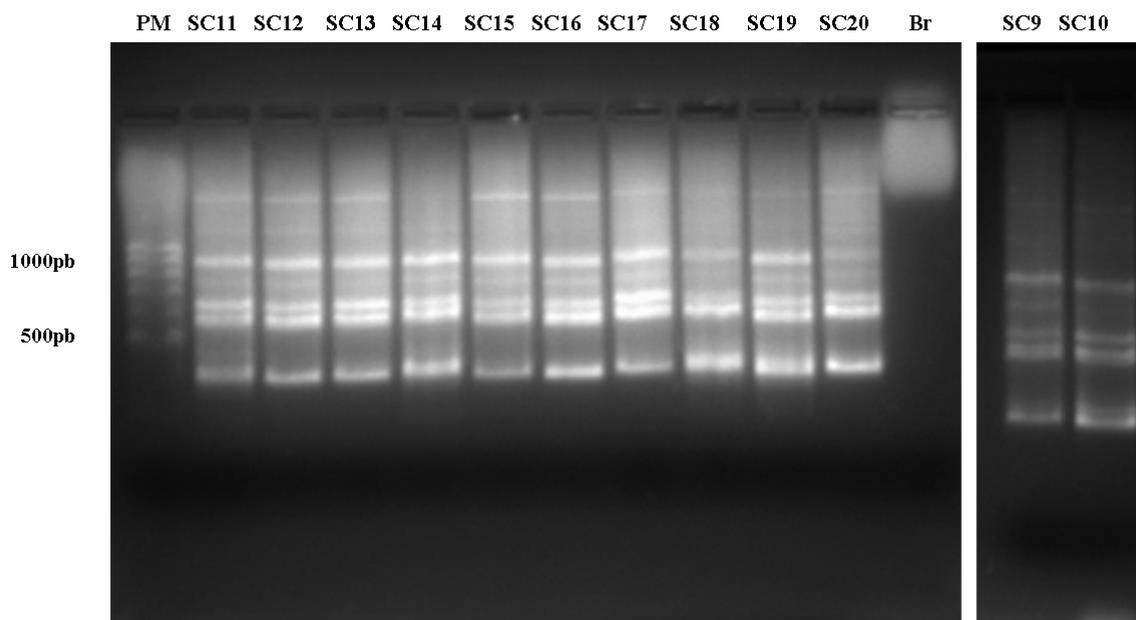
Tabela 6 - Código dos isolados, morfologia das colônias em meio WLN e grupo genético determinado pelo padrão de amplificação obtido com o iniciador (GTG)₅ do mosto em fermentação inicial (2 horas de fermentação)

Isolado	Morfologia	Porcentagem	Grupo genético
SC-1	Verde clara borda escura rugosa	0,73%	G1
SC-2	Creme rugosa	65,57%	G1
SC-3	Branca rugosa	21,86%	G1
SC-4	Branca com borda verde rugosa	3,28%	G1
SC-5	Verde rugosa	7,29%	G1
SC-6	Lisa branca	0,91%	G1
SC-7	Verde centro escuro lisa	0,18%	G1
SC-8	Verde escura rugosa	0,18%	G2

Fonte: Autora, 2018.

O estudo da diversidade genética antes da pressão de seleção das leveduras presentes no mosto após 8 horas de fermentação foi realizado com os representantes de cada isolado. Na próxima página, a Figura 3 mostra uma amplificação polimórfica nos tamanhos de fragmento que variam de 300 a 1500 pares de base.

Figura 3 - Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras presentes após 8 horas de fermentação com o primer (GTG)₅. Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 100pb.



Fonte: Autora, 2018.

Observa-se os que padrões de amplificação não demonstram variabilidade genética e que no grupo G1 estão os isolados SC-9, SC-10, SC-11, SC-12, SC-13, SC-14, SC-15, SC-16, SC-17, SC-18, SC-19 e SC-20. Todos os morfotipos apresentam diferenças macro morfológicas entre si, no entanto não houve distinção nos padrões de amplificação. A Tabela 7 a seguir mostra a variabilidade morfológica ao passo que geneticamente pertencem ao mesmo grupo.

Tabela 7 - Código do isolado, morfotipo, coloração da colônia em meio WLN e grupo genético determinado pelo padrão de amplificação obtido com o iniciador (GTG)₅ do mosto fermentado final (8 horas de fermentação).

Isolado	Morfologia	Porcentagem	Grupo genético
SC-9	Creme borda cinza rugosa	13,39%	G1
SC-10	Verde rugosa	0,89%	G1
SC-11	Branca rugosa	39,73%	G1
SC-12	Creme centro elevado rugosa	1,34%	G1
SC-13	Mesclada verde/branca rugosa	0,89%	G1
SC-14	Creme centro verde rugosa	0,89%	G1
SC-15	Creme rugosa	39,29%	G1
SC-16	Branca lisa	0,89%	G1
SC-17	Amarela rugosa	1,34%	G1
SC-18	Amarela lisa	0,45%	G1
SC-19	Branca pequena lisa	0,45%	G1
SC-20	Branca centro elevado rugosa	0,45%	G1

Fonte: Autora, 2018.

5.4 Diversidade genética após pressão de seleção

Os padrões de amplificação foram classificados em 5 grupos nomeados de G1, G2, G3, G4 e G5. Os tamanhos dos fragmentos variaram de 300 a 1500 pares de base. O estudo da diversidade genética foi realizado com todos os morfotipos distintos. O estudo da diversidade genética do mosto no início da fermentação de uma dorna após pressão de seleção por meio de fermentação com a adição de fatores de estresse foi realizado com os representantes de cada morfotipo. Na Tabela 8 a seguir, tem-se a associação dos 2 grupos genéticos ao morfotipos.

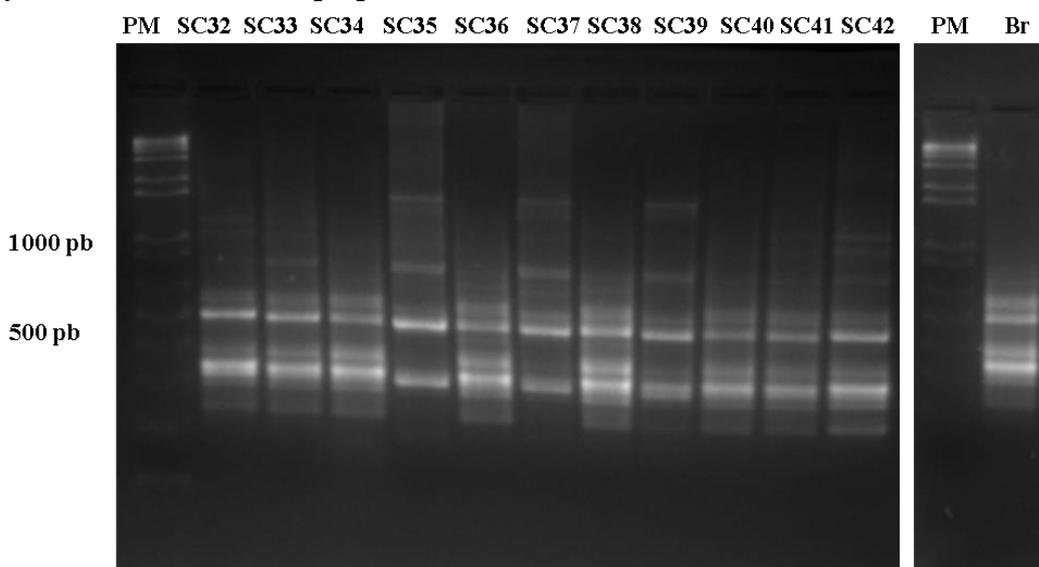
Tabela 8 - Associação dos grupos genéticos aos morfotipos provenientes do mosto no início da fermentação (2 horas de fermentação) de um reator após 24 ciclos fermentativos com pressão de seleção e fatores de estresse adicionados.

Isolado	Morfologia	Porcentagem	Grupo genético
SC-32	Creme lisa	0,40%	G2
SC-33	Branca pequena rugosa	0,81%	G2
SC-34	Creme pequena rugosa	18,98%	G2
SC-35	Amarela lisa	0,13%	G3
SC-36	Verde rugosa	0,27%	G2
SC-37	Creme centro esverdeado rugosa	0,13%	G3
SC-38	Verde lisa	0,13%	G2
SC-39	Branca rugosa	2,29%	G3
SC-40	Creme pequena lisa	0,67%	G2
SC-41	Creme centro verde rugosa	0,13%	G2
SC-42	Creme rugosa	76,04%	G2

Fonte: Autora, 2018.

Observa-se padrões de amplificação podem ser classificados em 2 grupos denominados de G2 e G3. No grupo G2 estão os isolados SC-32, SC-33, SC-34, SC-36, SC-38, SC-40, SC-41, SC-42, no grupo G3 estão os isolados SC-35, SC-37, SC-39. Na Figura 4 que segue, após análise observa-se uma amplificação polimórfica nos tamanhos de fragmento que variam de 300 a 1500 pares de base.

Figura 4 - Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras obtidas após 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados da amostra do mosto no início da fermentação com o primer (GTG)₅. Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com SybrGreen adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kb.



Fonte: Autora, 2018.

Observa-se que padrões de amplificação podem diferenciar em 5 grupos denominados de G1, G2, G3, G4, G5. No grupo G4 estão os isolados SC-45, SC-48, SC-50, SC-52, SC-53, SC-55, no grupo G5 se enquadram os isolados SC-44, SC-46, SC-47, SC-49, SC-51, SC-54. Na Tabela 9 abaixo, verifica-se a associação dos grupos genéticos ao morfotipos do mosto inicial após a pressão de seleção.

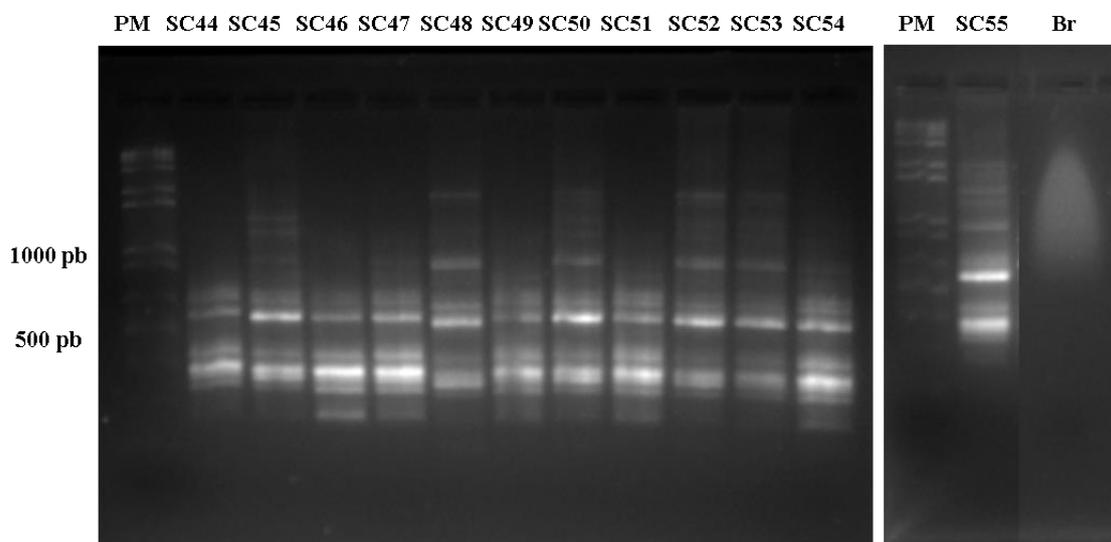
Tabela 9 - Associação dos grupos genéticos aos morfotipos provenientes do mosto após 8 horas de fermentação em um reator após 24 ciclos fermentativos e pressão de seleção com fatores de estresse adicionados.

Isolado	Morfologia	Porcentagem	Grupo genético
SC-44	Creme lisa	1,59%	G5
SC-45	Creme rugosa	54,64%	G4
SC-46	Creme puntiforme pequena lisa	1,16%	G5
SC-47	Branca lisa	0,29%	G5
SC-48	Branca rugosa	2,90%	G4
SC-49	Verde escura lisa	1,74%	G5
SC-50	Creme centro esverdeado rugosa	0,29%	G4
SC-51	Branca pequena rugosa	6,96%	G5
SC-52	Creme pequena rugosa	27,68%	G4
SC-53	Creme puntiforme lisa	1,01%	G4
SC-54	Branca pequena lisa	0,14%	G5
SC-55	Creme centro verde rugosa	1,59%	G4

Fonte: Autora, 2018.

O estudo da diversidade genética do mosto após 8 horas de fermentação e após pressão de seleção por meio de 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados foi realizado com os representantes de cada morfotipo. Na Figura 5 que segue, após análise observa-se uma amplificação polimórfica nos tamanhos de fragmento que variam de 300 a 1500 pares de base.

Figura 5 – Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras obtidas após 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados da amostra de mosto após 8 horas de fermentação com o primer $(GTG)_5$. Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kb.



Fonte: Autora, 2018.

5.5 Amplificação do DNA e averiguação dos padrões de amplificação por PCR $(GTG)_5$

Os grupos genéticos apresentam morfologias distintas e em alguns casos similares, o grupo G1 apresenta morfologia em que se enquadram verde clara borda escura rugosa rugosas creme, branca com borda verde rugosa, rugosa branca, lisa branca, rugosa verde, e verde centro escuro rugosa, o grupo G2 estão as verde escura, e os onze morfotipos do final da fermentação, que vai de rugosas brancas, rugosas creme, passando pelo amarelo até o verde mesclado.

Os morfotipos que apresentaram menor polimorfismo foram os isolados da diversidade no final da fermentação, que foram descritos estando presentes no grupo G2 onze isolados. As leveduras isoladas do mosto no início da fermentação estão distribuídas: sete no grupo G1, e uma no grupo G2.

No mosto no início da fermentação de uma dorna após pressão de seleção por meio de ensaios fermentativos com fatores de estresse os grupos se enquadraram da seguinte forma: oito isolados no grupo G2, três isolados no grupo G3. Enquanto no mosto após 8 horas de fermentação de uma dorna após pressão de seleção por meio de fermentação com fatores de estresse observou-se 6 isolados no grupo G4, e seis isolados no grupo G5.

Após a análise dos géis de $(GTG)_5$ foram selecionados dez isolados (cinco da diversidade e cinco da pressão de seleção) para ser realizado a cinética de crescimento celular,

e assim confrontarmos o polimorfismo e a origem de cada morfotipo apresentado com a cinética de crescimento celular em comparação com as leveduras de referência CAT-1 e PE-2. Com os resultados obtidos da cinética de crescimento celular, seis morfotipos foram selecionados, sendo três da diversidade e três da pressão de seleção, para proceder aos testes de resistência individual. A combinação destes testes de resistência forneceu o melhor resultado para a estirpe SC-32, sendo originária do inóculo do início da fermentação, mas que passou pela pressão de seleção. Um ponto favorável desta cepa se deve ao fato do aspecto liso, pois não traz prejuízos decorrentes de floculação numa fermentação industrial.

Ao confrontar a cepa SC-32 com a levedura de referência, concluímos que ela manteve viabilidades acima da CAT-1, a produção de massa celular foi superior à cepa padrão CAT-1, e apresentou bom desempenho combinando a temperatura de 40 °C, e com 22 °Brix. Seria necessário saber a produção de etanol, já que este é o principal objetivo, além dos subprodutos formados.

5.6 Cinética de crescimento das leveduras selecionadas antes e após a pressão de seleção

Ao comparar o crescimento das colônias que foram selecionadas do processo antes e após a pressão de seleção com dois morfotipos industriais, estas se tornam referência do comparativo, sabendo que a taxa de crescimento específica está relacionada à conversão de substrato em produto. As leveduras de referência apresentaram taxa de crescimento de 0,5373 para CAT-1 e 0,4060 para PEDRA-2 (PE-2). Os morfotipos selecionados apresentaram variação de 0,5913 a 0,3922. Na tabela 10 é possível constatar o comportamento dos isolados frente às leveduras de referência, em que 90% das leveduras tiveram desempenho acima da PE-2, e 70% apresentou desempenho inferior à CAT-1, e 40% demonstrou desempenho acima de 0,5000, 10% está abaixo de 0,4000 e 50% ficou acima de 0,400 e abaixo de 0,5000. As leveduras que obtiveram melhor desempenho são provenientes da pressão de seleção e da diversidade, são elas com seus respectivos valores de $\mu_{\text{máx}}$: SC-5 (diversidade fermento) com 0,5913, SC-14 (diversidade mosto) com 0,5862, SC-15 (diversidade mosto) com 0,5388, SC-32 (fermento após pressão) com 0,5249, SC-48 (mosto após pressão) com 0,5008, e SC-45 (mosto após pressão) com 0,4736. A Tabela 10 a seguir apresenta os morfotipos selecionados para o crescimento celular e seus respectivos valores.

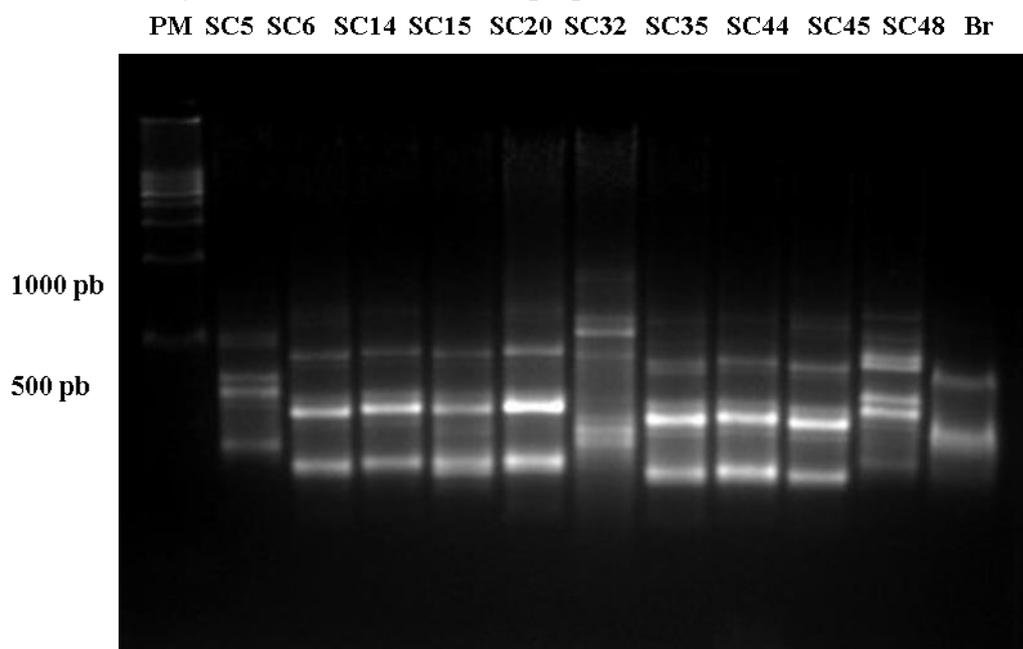
Tabela 10 - Morfotipos com os seus respectivos valores de: $\mu_{\text{máx}}$, coeficiente de correlação (R^2), taxa de duplicação (em 8 horas de avaliação), morfologia e porcentagem de predominância.

Morfotipo e origem	$U_{\text{máx}}$	R^2	Taxa de duplicação	% Predominância	Morfologia
SC-44 – MOSTO APÓS PRESSÃO	0,3922	0,9938	1,7784	2	Creme pequena lisa
PE-2	0,4060	0,9871	1,7296	Referência	Referência
SC-35 – FERMENTO APÓS PRESSÃO	0,4317	0,9911	1,6200	0,13	Amarela lisa
SC-20 – DIVERSIDADE MOSTO	0,4419	0,9973	1,5728	0,45	Branca centro elevado rugosa
SC-6 – DIVERSIDADE FERMENTO	0,4435	0,9933	1,5734	0,91	Branca lisa
SC-45- MOSTO APÓS PRESSÃO	0,4736	0,9946	1,4715	55	Creme rugosa
SC-48 – MOSTO APÓS PRESSÃO	0,5008	0,9964	1,3891	3	Branca rugosa
SC-32 – FERMENTO APÓS PRESSÃO	0,5249	0,9955	1,3265	0,4	Creme lisa
CAT-1	0,5373	0,9930	1,2992	Referência	Referência
SC-15 – DIVERSIDADE MOSTO	0,5388	0,9954	1,2924	39,29	Creme rugosa
SC-14 – DIVERSIDADE MOSTO	0,5862	0,9915	1,1926	0,89	Creme centro verde rugosa
SC-5 – DIVERSIDADE FERMENTO	0,5913	0,9971	1,1757	7,29	Verde rugosa

Fonte: O autor, 2018.

A combinação das taxas de crescimento específica com os padrões genéticos distintos fez com que cepas diferentes tanto cineticamente quanto geneticamente fossem confrontadas em testes posteriores. A Figura 6 a seguir ilustra os padrões genéticos das 10 cepas que foram selecionadas para a curva de crescimento celular.

Figura 6 - Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras selecionadas para a cinética de crescimento com o primer (GTG)₅. Eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kb.



Fonte: Autora, 2018.

5.6.1 Avaliação da cinética de crescimento dos isolados selecionados

Na construção da curva de crescimento foram utilizadas duas estirpes de leveduras industriais para efeito de comparação, PE-2 e CAT-1. As leveduras que obtiveram melhor desempenho são provenientes da pressão de seleção e da diversidade, são elas com seus respectivos valores de $\mu_{\text{máx}}$: SC-5 (diversidade fermento) com 0,5913, SC-14 (diversidade mosto) com 0,5862, SC-15 (diversidade mosto) com 0,5388, SC-32 (fermento após pressão) com 0,5249, SC-48 (mosto após pressão) com 0,5008, e SC-45 (mosto após pressão) com 0,4736, enquanto a CAT-1 apresentou 0,5373 e a PE-2 com 0,4060. Segundo Carvalho, Alves e Maugeri Filho (1996), linhagens isoladas de destilarias obtiveram taxas de crescimento variando entre 0,3 e 0,4 h⁻¹ para temperatura entre 28 e 38°C, em processo de fermentação contínua, utilizando meio com melação de cana-de-açúcar (0,4% de ART) e 0,25% de extrato de levedura.

Colônias isoladas apresentaram velocidades específicas máximas de crescimento, variando entre 0,27 e 0,57 h⁻¹, utilizando meio sintético como substrato (STROPPA, 2002). As características fermentativas de várias cepas dominantes de leveduras isoladas de alambiques e destilarias apresentaram valores de $\mu_{\text{máx}}$ entre 0,38 a 0,67 h⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2004). Os resultados obtidos acerca dos morfotipos analisados se encontram nos intervalos de valores comuns para *S. cerevisiae*.

5.7 Testes de resistência aos fatores de estresse individuais

Na realização dos testes de resistência composto por fatores de estresse geralmente encontrados nas indústrias etanólicas, tornou-se necessário compor 2 grupos com os seis morfotipos que apresentaram melhor taxa de crescimento específica, onde o primeiro grupo, denominado T01, formado com três isolados da diversidade juntamente com a levedura de referência CAT-1, o segundo grupo, denominado T02, formado com três isolados da pressão de seleção tendo a levedura CAT-1 como referência. Para cada isolado, o crescimento celular em meio YPD líquido por 24h foi feito, após isso realizou-se a contagem em câmara de Neubauer e posterior calibração do meio para 10^7 células/mL. Este meio fermentado foi utilizado como inóculo em todos os testes de resistência.

5.7.1 Resistência ao pH

Ao analisar a primeira etapa do teste, verificou-se que no pH 1,0 houve crescimento reduzido, foi possível observar o escurecimento da massa celular adicionada. Na segunda etapa constatou-se nas placas que as cepas pouco cresceram, devido ao ambiente hostil causado pelo baixo pH. A Tabela 11 a seguir mostra os resultados do crescimento celular em placas para o teste com variados valores de pH.

Tabela 11 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-2}) após serem submetidas aos pH's 1 3 e 5.

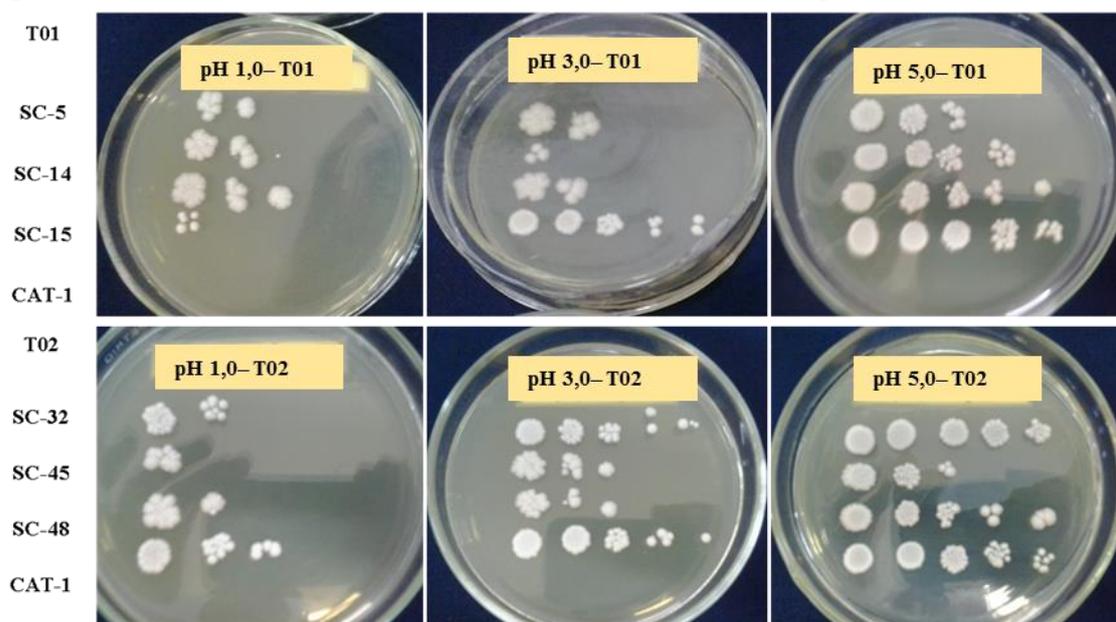
Grupo	Isolado	pH 1,0	pH 3,0	pH 5,0
T01	SC-5	0,0	0,8	7,5
	SC-14	0,8	0,0	18,5
	SC-15	1,0	0,8	17,0
	CAT-1	0,3	20,0	197,0
	SC-32	0,5	8,5	160,0
T02	SC-45	0,25	1,5	8,0
	SC-48	0,3	4,3	15,0
	CAT-1	3,3	17,5	232,0

Fonte: Autora, 2018.

Analisando o crescimento das colônias nas placas, constatou-se no grupo T01 (diversidade): pH 1,0, o morfotipo SC-15 teve um crescimento ligeiramente maior que a SC-14, e que a cepa SC-5 não cresceu nesta diluição, no pH 3,0 o morfotipo SC-15 e o SC-5 tiveram crescimento semelhante, enquanto que o SC-14 não cresceu nesta diluição, no pH 5,0 o isolado

SC-14 teve um maior crescimento que a SC-15, e o morfotipo SC-5 teve o menor crescimento entre os isolados deste grupo; no grupo T02 (pressão de seleção): no pH 1,0 o morfotipo SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido pelo morfotipo SC-48, o isolado SC-45 teve o menor crescimento dentre os isolados do grupo T02; no pH 3,0 o isolado SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados deste grupo, seguido do morfotipo SC-48, o isolado SC-45 apresentou o menor crescimento do grupo T02; no pH 5,0 o morfotipo SC-32 apresentou um número maior de colônias dentre os morfotipos da pressão de seleção, seguido da cepa SC-48, o morfotipo SC-45 apresentou o menor crescimento dentre os isolados da pressão de seleção. A levedura referência teve um bom crescimento em todos os valores de pH. A Figura 7 ilustra o teste de resistência a pH's variados.

Figura 7 - Ilustração do teste de resistência a diferentes valores de pH.



Fonte: Autora, 2018.

5.7.2 Resistência ao estresse etanólico

As leveduras produzem etanol, mas ao mesmo tempo este produto pode causar toxidez e ser até mesmo letal, se as concentrações forem elevadas. Os grupos de leveduras foram expostos a 0%, 11%, e 22% de etanol (v/v). A seguir a Tabela 12 enquadra a contagem do número de colônias na diluição 10^{-2} .

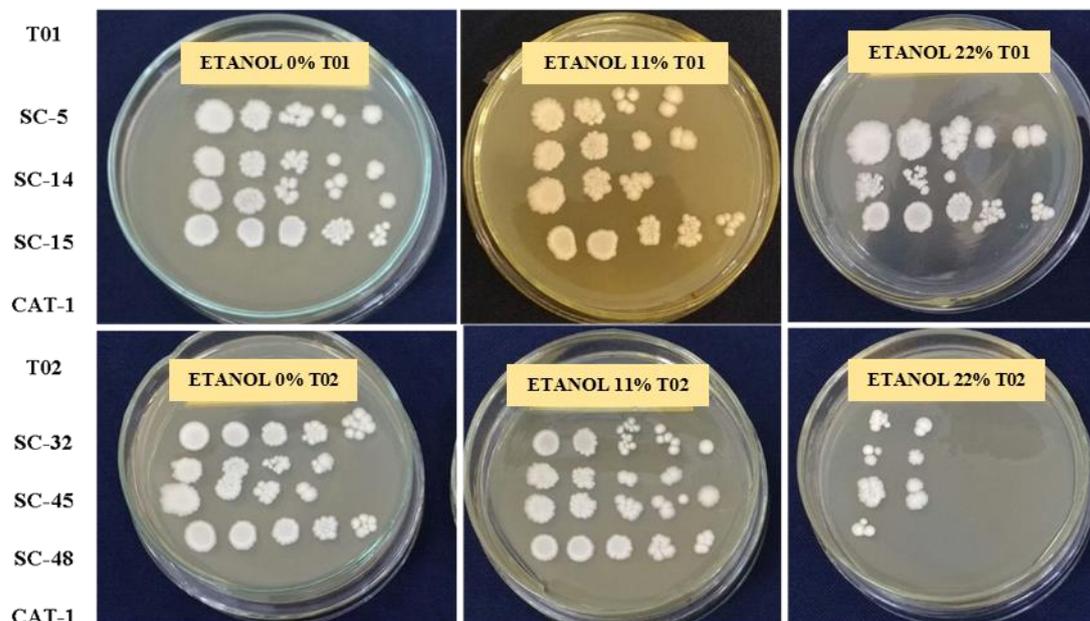
Tabela 12 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-2}) após serem submetidas a diferentes concentrações de etanol.

Grupo	Isolado	Etanol 0%	Etanol 11%	Etanol 22%
T01	SC-5	13,3	4,3	1,5
	SC-14	20,3	11,5	1,3
	SC-15	21,8	7,5	0,3
	CAT-1	127,5	103,0	10,7
	SC-32	160,0	21,5	0,0
	SC-45	14,0	4,5	0,0
	SC-48	24,0	10,0	0,8
T02	CAT-1	116,0	66,0	1,0

Fonte: Autora, 2018.

Averiguando as placas, constatou-se no grupo T01 (diversidade): etanol 0%, o morfotipo SC-15 teve um crescimento maior que a SC-14, e a cepa SC-5 teve o menor crescimento entre os isolados da diversidade, para o etanol 11%, o morfotipo SC-14 apresentou o maior crescimento da diversidade, seguido do isolado SC-15, o morfotipo SC-5 teve o menor crescimento do grupo T01, para o etanol 22% o isolado SC-5 teve um crescimento ligeiramente maior que o isolado SC-14, e o morfotipo SC-15 teve o menor crescimento entre os isolados deste grupo; no grupo T02 (pressão de seleção): para o etanol 0% o morfotipo SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido pelo morfotipo SC-48, o isolado SC-45 teve o menor crescimento dentre os isolados do grupo T02; para o etanol 11% o isolado SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados deste grupo, seguido do morfotipo SC-48, o isolado SC-45 apresentou o menor crescimento do grupo T02; para o etanol 22%, o morfotipo SC-48 apresentou um número maior de colônias dentre os morfotipos da pressão de seleção, o morfotipos SC-45 e SC-32 não apresentaram crescimento nesta diluição. A levedura referência teve um bom crescimento em todas as concentrações de etanol testadas. Ao analisar o tamanho das colônias, também é possível considerar que uma colônia menor sofreu um maior estresse do que a colônia de maior tamanho. A Figura 8 que segue mostra as placas com os resultados obtidos para as concentrações de 0%, 11% e 22% de etanol

Figura 8 - Fotos do teste de resistência a concentrações de 0%, 11% e 22% de etanol (v/v)



Fonte: Autora, 2018.

5.7.3 Temperatura

As condições ideais de fermentação para produção etanólica segundo Lima, Basso e Amorim (2001), se situam na faixa de 26 a 35°C, mas nas destilarias, a temperatura pode alcançar 38°C. Com isso, aumenta a velocidade da fermentação, favorecendo a contaminação bacteriana, e tornando a levedura mais sensível à toxidez do etanol. Os grupos de isolados foram submetidos a 30, 35 e 40°C. Na Tabela 13, a seguir, está o resultado para a contagem das placas na diluição 10^{-3} .

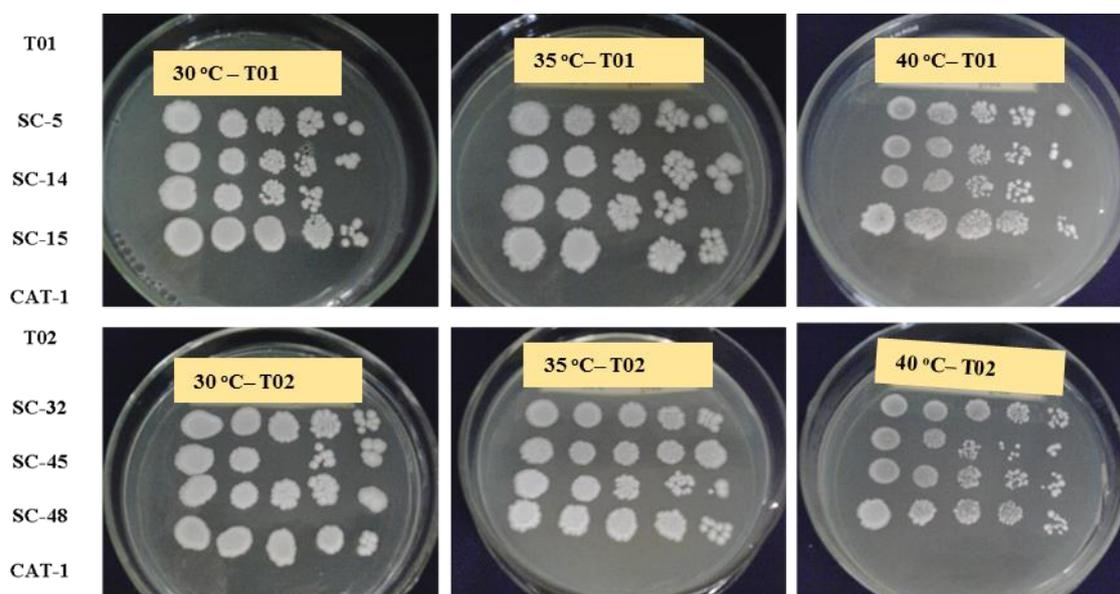
Tabela 13 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-3}) após serem submetidas a diferentes temperaturas.

Grupo	Isolado	30°C	35°C	40°C
T01	SC-5	24,5	15,0	21,0
	SC-14	13,5	16,0	22,5
	SC-15	10,5	8,0	15,5
	CAT-1	150,0	110,0	105,0
T02	SC-32	37,0	100,0	135,0
	SC-45	5,0	99,0	6,0
	SC-48	34,5	18,0	22,5
	CAT-1	90,0	>100,0	125,0

Fonte: Autora, 2018.

Constatou-se com a investigação das placas que, no grupo T01 (diversidade): a 30°C o isolado SC-5 apresentou um crescimento maior que a SC-14, e a cepa SC-15 teve o menor crescimento entre os isolados da diversidade, a 35°C o morfotipo SC-14 apresentou o maior crescimento da diversidade, seguido do isolado SC-5, a colônia SC-15 teve o menor crescimento do grupo T01, a 40°C o isolado SC-14 teve um crescimento ligeiramente maior que a cepa SC-5, e o morfotipo SC-15 teve o menor crescimento entre os isolados deste grupo; no grupo T02 (pressão de seleção): a 30°C o morfotipo SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido pela estirpe SC-48, o isolado SC-45 teve o menor crescimento dentre os isolados do grupo T02; a 35°C o isolado SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido do morfotipo SC-45, o isolado SC-48 apresentou o menor crescimento do grupo T02; a 40°C o morfotipo SC-32 apresentou um número maior de colônias dentre os morfotipos da pressão de seleção, seguido pelo isolado SC-48, o morfotipo SC-45 apresentou o menor crescimento dentre os isolados da pressão de seleção. A levedura referência teve um bom crescimento em todas as temperaturas testadas. A temperatura pode ser considerada um importante fator que pode causar estresse no meio fermentativo industrial. A Figura 9 a seguir mostra as placas com os resultados obtidos para as temperaturas de 30, 35 e 40°C.

Figura 9 - Fotos do teste de resistência para as temperaturas de 30, 35 e 40°C.



Fonte: Autora, 2018.

5.7.4 Altas concentrações de glicose

A fonte de carbono presente no substrato proveniente da cana-de-açúcar é a sacarose, que após processo de hidrólise extracelular, resulta em glicose e frutose, sendo a glicose consumida pela levedura. Ao elevar a concentração de glicose, reduzimos a multiplicação celular, aumentando a produção de etanol, por outro lado, se a concentração for muito elevada, Lopes, (2006), afirma que isso resulta em alto teor alcoólico, podendo causar toxidez à levedura por desestruturar a membrana plasmática. A Tabela 14 a seguir mostra os resultados para as concentrações de 100 e 250 g.L⁻¹.

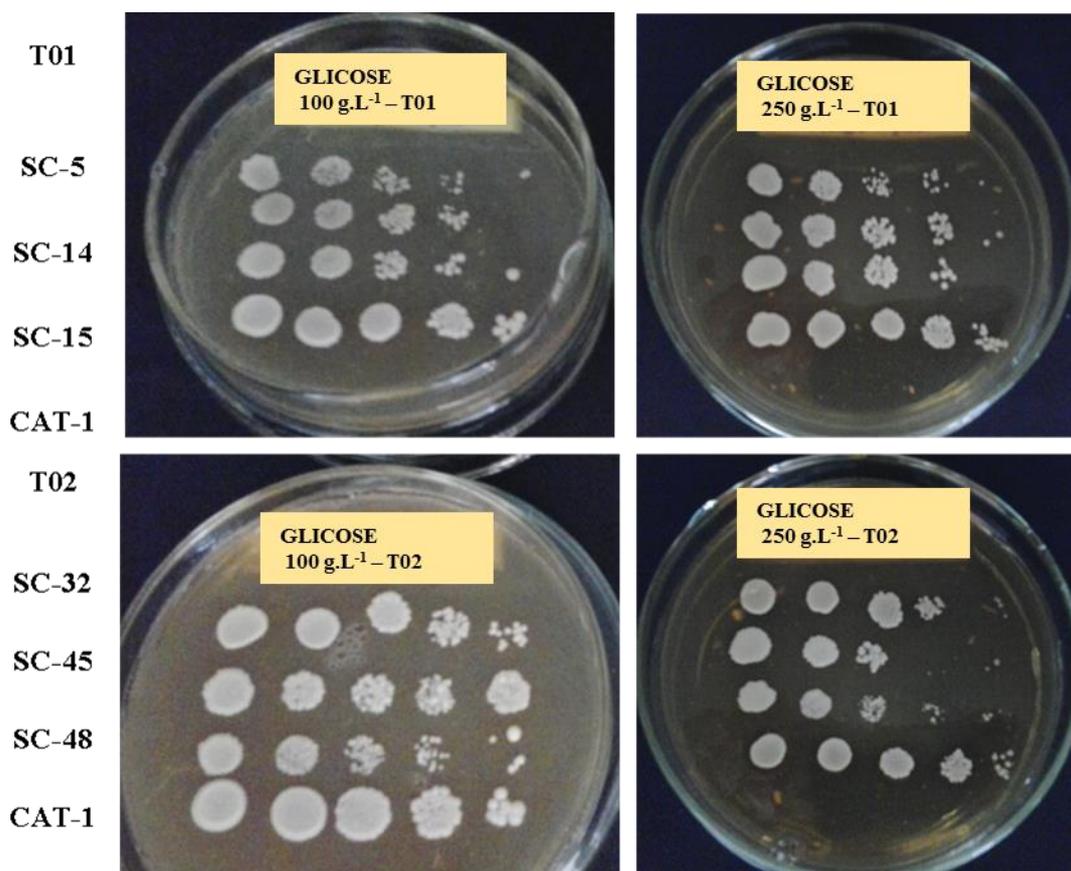
Tabela 14 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10⁻³) após serem submetidas a diferentes concentrações de glicose.

Grupo	Isolado	Glicose 100g.L ⁻¹	Glicose 250 g.L ⁻¹
T01	SC-5	9,5	10,5
	SC-14	10,5	19,0
	SC-15	6,5	8,5
	CAT-1	125,0	108,0
	SC-32	73,5	43,0
	SC-45	90,0	4,5
	SC-48	26,0	14,0
T02	CAT-1	125,0	100,0

Fonte: Autora, 2018.

Com a observação e contagem das placas vemos que no grupo T01 (diversidade): com a glicose a 100 g.L⁻¹ o morfotipo SC-14 teve um crescimento maior que a SC-5, e a cepa SC-15 teve o menor crescimento entre os isolados da diversidade; com a glicose a 250 g.L⁻¹ o morfotipo SC-14 apresentou o maior crescimento da diversidade, seguido do isolado SC-5, o morfotipo SC-15 teve o menor crescimento do grupo T01. No grupo T02 (pressão de seleção): com a glicose a 100 g.L⁻¹ o morfotipo SC-45 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido pelo morfotipo SC-32, o isolado SC-48 teve o menor crescimento dentre os isolados do grupo T02; com a glicose a 250 g.L⁻¹ o isolado SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido do morfotipo SC-48, o isolado SC-45 apresentou o menor crescimento do grupo T02. A levedura referência teve um crescimento satisfatório em todas as concentrações testadas. A Figura 10 a seguir mostra as placas com os resultados obtidos para as concentrações de 100 e 250 g.L⁻¹ de glicose.

Figura 10 - Fotos do teste de resistência para as concentrações de 100 e 250 g.L⁻¹ de glicose.



Fonte: Autora, 2018.

5.7.5 Altas concentrações de sacarose

Segundo Naves et al. (2010) linhagens industriais de levedura normalmente utilizadas apresentam uma osmotolerância limitada. Concentrações elevadas de açúcares podem resultar em elevadas concentrações de etanol no meio fermentado (vinho) ou ainda fermentações incompletas com formação de subprodutos indesejáveis, podendo diminuir consideravelmente a eficiência da fermentação. A Tabela 15 a seguir mostra os resultados relativos aos testes de placas onde foram aplicadas as concentrações de 100 e 250 g.L⁻¹ de sacarose.

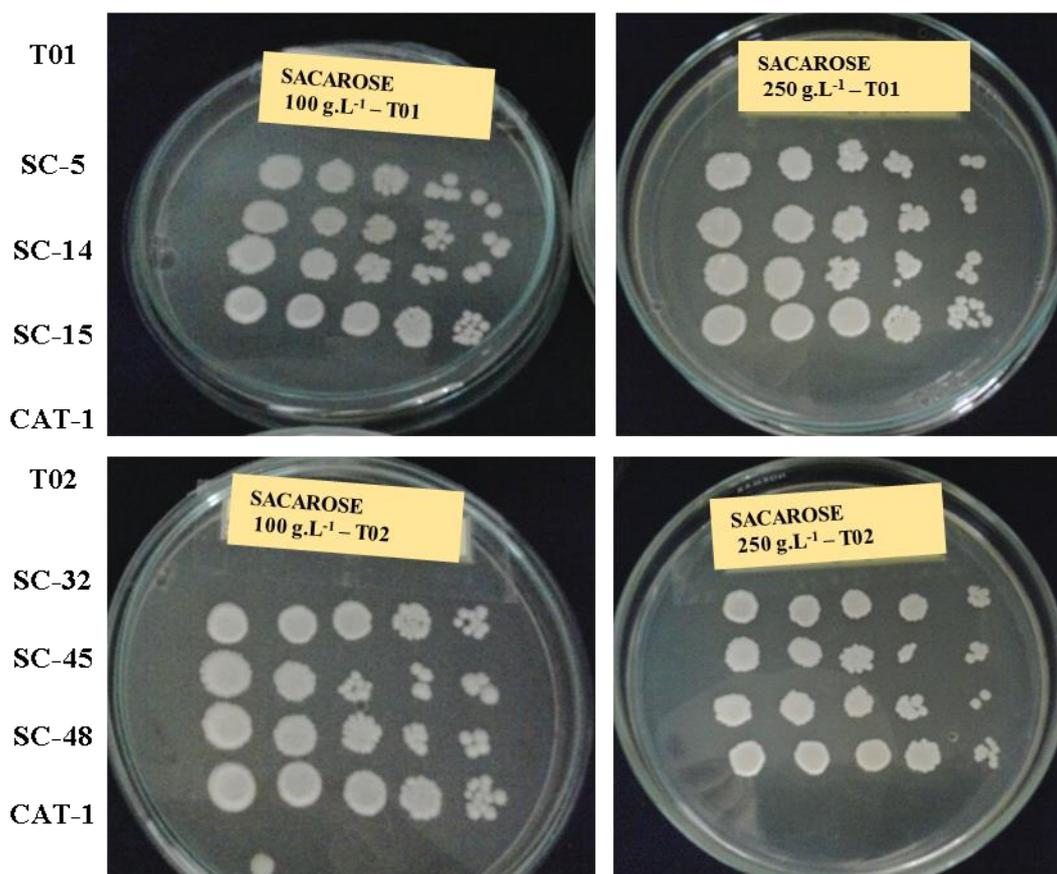
Tabela 15 - Contagem de colônias crescidas em placas de Petri (diluição: 10^{-3}) após serem submetidas a diferentes concentrações de sacarose.

Grupo	Isolado	Sacarose 100 g.L⁻¹	Sacarose 250 g.L⁻¹
T01	5	9,5	13,0
	14	19,5	15,0
	15	9,0	11,0
	CAT-1	150,0	100,0
T02	32	81,5	100,0
	45	5,0	7,5
	48	23,5	29,0
	CAT-1	100,0	100,0

Fonte: Autora, 2018.

Ao analisar as placas observou-se que no grupo T01 (diversidade): com a sacarose a 100 g.L⁻¹ o morfotipo SC-14 teve um crescimento maior que a SC-5, e a cepa SC-15 teve o menor crescimento entre os isolados da diversidade; com a sacarose a 250 g.L⁻¹ o morfotipo SC-14 apresentou o maior crescimento da diversidade, seguido do isolado SC-5, o morfotipo SC-15 teve o menor crescimento do grupo T01. No grupo T02 (pressão de seleção): com a sacarose a 100 g.L⁻¹ o morfotipo SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido pelo morfotipo SC-48, o isolado SC-45 teve o menor crescimento dentre os isolados do grupo T02; com a sacarose a 250 g.L⁻¹ o isolado SC-32 apresentou o maior crescimento dentre os isolados da pressão de seleção, seguido do morfotipo SC-48, o isolado SC-45 apresentou o menor crescimento do grupo T02; A levedura referência CAT-1 teve um crescimento satisfatório em todas as concentrações testadas. A Figura 11 a seguir mostra as placas com os resultados obtidos para as concentrações de 100 e 250 g.L⁻¹ de sacarose.

Figura 11 - Fotos do teste de resistência para as concentrações de 100 e 250 g.L⁻¹ de sacarose.



Fonte: Autora, 2018.

5.8 Ensaios fermentativos combinando fatores estressantes

Após os resultados obtidos nas análises cinéticas, moleculares e os testes de resistência, constatou-se que a levedura SC-32 obteve o melhor desempenho nos testes de resistência e foi selecionada para ser confrontada com a levedura referência CAT-1 em uma fermentação em batelada simples com temperaturas de 30 e 40°C em estufa incubadora tipo shaker com agitação constante de 150 rpm por 24 horas. O substrato utilizado foi o mosto de melaço estéril, ajustado para 17 e 22°Brix, sem a adição de nutrientes, 10mg.L⁻¹ de antibiótico Kamoran (princípio ativo: monensina sódica cristalina), e a concentração do inóculo foi de 0,2% e pH 5,45. Avaliou-se a viabilidade pela contagem em câmara de Neubauer, o consumo de substrato foi determinado pela redução de Brix, e pH, e a massa seca foi determinada por gravimetria.

5.8.1 Ensaio fermentativo a 30°C

O fator de estresse avaliado a 30°C foi a pressão osmótica para o Brix de 22, o pH do substrato foi de 5,45. A levedura referência utilizada foi a CAT-1, e os resultados foram comparados para os diferentes Brix e o mesmo morfotipo, e com a levedura referência CAT-1. A cepa SC-32 apresentou viabilidade de 87,5%, 0,58% de massa produzida, Brix final de 9,0 e pH 4,58 a 17 °Brix; a 22 °Brix: 80,7% de viabilidade, 0,45% de massa produzida, Brix final de 10 e pH de 4,65. A levedura referência CAT-1 apresentou viabilidade de 85,5%, 0,44% de massa produzida, Brix final de 10,0 e pH 4,65 a 17 °Brix; a 22 °Brix: 76,2% de viabilidade celular, 0,36% de massa produzida, Brix final de 14 e pH de 4,71. A Tabela 16 abaixo mostra os resultados obtidos para a fermentação a 30°C.

Tabela 16 - Resultados obtidos para a fermentação a 30°C.

Isolado	Brix do mosto	Viabilidade (%)	pH ao final da fermentação	Brix ao final da fermentação	Massa produzida (%)
SC-32	17	87,5	4,58	9	0,58
	22	80,7	4,62	12	0,45
CAT-1	17	85,5	4,65	10	0,44
	22	76,2	4,71	14	0,36

Fonte: O autor, 2018.

5.8.2 Ensaio fermentativo a 40°C

Foram avaliados os fatores interferentes combinando a pressão osmótica e temperatura elevada, sem a adição de nutrientes adicionais, considerando a complexidade do mosto de melão. Na fermentação a 40°C, a cepa SC-32 a 17°Brix apresentou viabilidade de 71,7%, 0,34% de massa produzida, Brix final de 9 e pH de 4,70; a 22°Brix; 65,6% de viabilidade, 0,19% de massa produzida, Brix final de 10,0 e pH 4,65 a levedura referência CAT-1 apresentou a 17 °Brix viabilidade de 64,7%, 0,20% de massa produzida, Brix final de 9 e pH de 4,70; a 22 °Brix e 61,6% de viabilidade, 0,08% de massa produzida, Brix final de 13 e pH de 4,76. A Tabela 17 a seguir ilustra os resultados obtidos para uma fermentação a 40°C.

Tabela 17 - Resultados obtidos para a fermentação a 40°C.

Isolado	Brix do mosto	Viabilidade (%)	pH ao final da fermentação	Brix ao final da fermentação	Massa produzida (%)
SC-32	17	71,7	4,7	9	0,34
	22	65,6	4,72	13	0,19
CAT-1	17	64,7	4,6	10	0,20
	22	61,6	4,76	13	0,08

Fonte: O autor, 2018.

5.8.3 Análise dos ensaios fermentativos com fatores de estresse adicionados

Ao confrontar um morfotipo utilizado industrialmente como referência em uma fermentação em batelada simples com mosto de melaço bruto e estéril, adicionando como fatores interferentes altas temperaturas e osmotolerância, observamos que a cepa SC-32 oriunda da pressão de seleção apresentou resultados bastante positivos, chegando a superar a cepa padrão nos dados avaliados. Os resultados de viabilidade da cepa SC-32 para todas as condições avaliadas foram superiores a cepa padrão CAT-1.

Avaliando os ensaios fermentativos quanto à variação de temperatura tem-se que a 17 °Brix a cepa SC-32 apresentou redução em 18,06% da viabilidade com o aumento da temperatura de 30 para 40 °C, enquanto que na CAT-1 a redução foi de 24,33%, a massa produzida pela SC-32 reduziu em 41,38%, e na CAT-1 a redução foi de 54,54% com o aumento da temperatura. A 22 °Brix a cepa SC-32 apresentou redução em 18,71% da viabilidade com o aumento da temperatura de 30 para 40 °C, enquanto na CAT-1 a redução foi de 19,16%, a massa produzida pela SC-32 reduziu em 57,8%, e na CAT-1 a redução foi de 77,8% com o aumento do Brix.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo a tolerância das estirpes foi avaliada através da resistência a múltiplos fatores de estresse aos quais as leveduras isoladas da diversidade do processo fermentativo industrial denominadas mosto em fermentação inicial (2 horas de fermentação) e mosto fermentado final (8 horas de fermentação) foram submetidas. Alíquotas do mosto em fermentação inicial e mosto fermentado final foram submetidas a 24 ciclos fermentativos com fatores de estresse adicionados, denominada pressão de seleção. Antes da pressão de seleção a população apresenta diversidade para o processo convencional. Após pressão de seleção ocorre aumento da porcentagem de lisas e permanece a predominância do morfotipo rugoso com coloração creme.

Antes da pressão de seleção no início da fermentação os grupos genéticos predominantes são G1 e G2, e no final da fermentação fica G2. Após a pressão de seleção no início da fermentação os grupos genéticos predominantes são G2 e G3 no final da fermentação ficam os grupos G4 e G5.

O processo de seleção não foi decisivo quanto à pressão de seleção para leveduras com maiores taxas de divisão tendo isolados com melhor desempenho tanto da fase anterior e posterior a pressão de seleção, ainda que o mosto fermentado industrial seja fonte de variabilidade genética para seleção de linhagens multirresistentes.

Os testes de resistência demonstraram que a cepa referência CAT-1 apresenta sempre os melhores resultados para o crescimento, apresentando o melhor desempenho para os isolados anteriores e posteriores à pressão seletiva. A cepa SC-32 é oriunda da condição extrema forçada em laboratório, seu inóculo foi o mosto fermentado inicial com 2 horas de fermentação e apresentou resultados positivos para o crescimento em meios com fatores estressantes, sendo, portanto, a estirpe com melhor desempenho combinado dentre todos os isolados.

Os ensaios fermentativos demonstraram que a temperatura foi o fator de estresse que trouxe uma maior redução tanto em viabilidade quanto em massa produzida. A estirpe SC-32 apresentou resultados superiores de viabilidade e massa produzida em todas as condições do ensaio quando comparada a CAT-1, além de ter morfologia lisa, levando a um desempenho superior as colônias rugosas, que por formarem pseudomicélios trazem prejuízo ao processo fermentativo.

O trabalho descrito, apesar de não fornecer leveduras com as maiores taxas específicas de crescimento apenas após os ciclos com os fatores de estresse adicionados, cumpriu seu objetivo, selecionando uma estirpe multirresistente após os ciclos fermentativos com condições

extremas e limitantes, originada do inóculo da fermentação inicial de duas horas na dorna da usina.

Torna-se necessário realizar estudos com outros parâmetros para que seja possível recomendar cepas nativas multirresistentes ao setor sucroalcooleiro, dentre os outros parâmetros estão, produção de etanol e conversão em etanol, presença de ácidos, e formação de subprodutos como o glicerol e custos com a manutenção desta e de outras linhagens devem ser avaliados, para a escolha adequada de uma levedura eficiente para produção de etanol.

A seleção de linhagens resistentes por meio de testes individuais e combinados é válido, mas requer etapas que impeçam o surgimento de leveduras com baixa capacidade fermentativa, podendo assim as leveduras selecionadas serem utilizadas adequadamente como inóculo de partida em substituição ao fermento comercial para a produção de etanol, com estabilidade genética, tolerância a fatores de estresse e alta capacidade fermentativa.

REFERÊNCIAS

ALQUATI, P. H. Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em micro destilaria de álcool. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. de C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN G. H.. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Appl Microbiol Biotechnol. 2011.. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Appl Microbiol Biotechnol. 2011.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I.. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 13, 1995.

ANDRIETTA, M. G. S; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. **MultiCiências**. 2006.

ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol 30 years of Proalcool. **Internacional Sugar journal**. V.109 n.1299. 2007

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? Biofuel production-recent developments and prospects (Bernardes MAS, ed), pp.67-84. **InTech, ISBN: 978-953-307-478-8**. 2011.

ANGELIS, D.F. de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. Aguardente de cana – produção e qualidade. Jaboticabal, FUNEP, p.49-66, 1992.

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, 2008.

BATISTA, A.S.. *Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil, 2001.

BATISTA, L.A. R. Representatividade taxonômica e caracterização morfológica e agrônômica dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Paspalum. (Palestra e Workshop sobre plantas forrageiras). CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 3., 2005, Gramado. **Anais. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas**, 2005.

BENITEZ, T.; GASSENT-RAMIREZ, J.M.; CASTREJON, F.; CODON, A.C. Development of new strains for the food industry. **Biotechnol. Prog.**, 1996.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. **Biociência Industrial**. São Paulo: E. Blücher, v. 3, 2001.

CARDOSO, M.G. Produção de aguardente de cana. 2ª ed. UFLA, Lavras, 2006. 445p.

CARVALHO, B. S.; ALVES, J. G. L. F.; MAUGERI FILHO, F. Modelagem matemática de fermentação alcoólica em função da temperatura. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES. São Carlos: UFSCar, 1996.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. – v.5 safra 2018/2019 N 4– Brasília abril/2019 Disponível em: <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/25631_78a68ec25e726ef2c565b0991a1e4a0d> Acesso em: 19 de setembro de 2019.

CORDELLINI, Daniela F.: **O etanol na estrutura dos biocombustíveis no Brasil**. Rev. FAE, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 19 - 35, jun. 2018.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Arlington v.12 p. 13-15, 1990.

FERRARI, S. E; LOPES, J. J. C; LEME, J. R. A; OLIVEIRA, E. R. Industrial efficiency of alcohol fermentation: a comparative study. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ALCOHOL FUELS TECHNOLOGY, 4., 1980, Guarujá. Proceedings... São Paulo: IPT, 1980.

FERREIRA, L. V. Estudo da fermentação em frascos agitados. Dissertação (Doutorado); Universidade Estadual de Campinas, 2002.

FERREIRA, E. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2005.

FOLCH-MALLOL, J. L.; ARROYO, A.G.; LEDIAS, F.; ROBLES A.A.C. La respuesta um estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev Lat Am Microbiol**. 2004.

GOLDEMBERG, J.. Ethanol for a sustainable energy future. Science, 2007.

GREEN, S. R.; GRAY, P. P.. Industryt Fermentation; A Differential Procedure for. Wallerstein Laboratories Communications, v. 14, n. 47, p. 289, 1951.

GRETSCHMANN, A.S. **Ajuste de curvas na produção de etanol num processo em batelada**. In: X ENCONTRO GAÚCHO DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 10., 2009, Ijuí: Anais... Ijuí: Trabalhos X EGEM. 2009. Disponível em: <http://www.projetos.unijui.edu.br/matematica/cd_egem/fscommand/CC/CC_61.pdf> Acesso em: 18 de agosto de 2019.

GURA, T. Driving biofuels from field to fuel tank. Cell, v.138, p.9-12, 2009.

HOHMANN, S.; Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts **Microbiology and molecular biology reviews**, 2002.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani, W. Biotecnologia Industrial. Ed. 1, São Paulo: Egard Blucher, v. 2. cap.6, p. 93-122, 2001.

IVORRA, C.; PÉREZ-ORTÍN, J. E.; DEL OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖRNER, T.. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*. v.33, p. 413-426. 1993.

LIMA, L. R; MARCONDES, A. A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, 2002.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 1986.

LUDWING, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, 2001.

LYND, L. R.; AHN, H. J; ANDERSON, G.; HILL, P; KERSEY, D.S.; KLAPATCH, T. Thermophilic ethanol production –Investigation of ethanol yield and tolerance in continuous culture. **Appl Biochem. Biotechnol.** 1991.

MACEDO, LCH de. **Álcool etílico: da cachaça ao cereal. São Paulo: Ícone**, 1993.

MARULLO, P.; MASNEUF-POMAREDE, B.; DUBOURDIEU, I.; AIGLE, M., D. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. **FEMS yeast research**, 2004.

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**, v. 28, p. 817-830, 2010.

MUTTON, M. J. R.; SOUZA, M. A. C.. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada através de técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, 2004.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. *Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira*. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11; 2010.

NOVELLO, A. P.. **Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando processo de fermentação extrativa**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2015.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E.. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, p. 19-24, 2004.

PARAZZI, C; OLIVEIRA, M. C. F. L. Comparação de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* floculantes em processo descontínuo de produção de álcool e aguardente. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6., 1996, Maceió. Anais... Maceió: STAB, 1996.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Rev. Microbiol.* 29: 104-108, 1998.

PRETORIUS I. S. Gene technology in winemaking: new approaches to an ancient art. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 2001.

QUEROL, A.; FERNANDEZ-ESPINAR, M. T.; OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International journal of food microbiology**, v. 86, 2003.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processo fermentativo para a produção de etanol**. 80f. 2011. [Dissertação] Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP. São Paulo, 2011.

REVERTER-BRANCHAT, G.; CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J.. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae* common targets and prevention by calorie restriction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, 2004.

ROBERTSON, G. P., DALE, V. H., DOERING, O. C., HAMBURG, S. P., MELILLO, J. M., WANDER, M. M.; DUKE, C. S. Sustainable biofuels redux. *Science*, 322(5898), 49-50,2008.

SALVATO, F.. Fermentação de mosto industrial por linhagens *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2010

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

SHULLER M. L.; KARGI F.. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Prentice Hall PTR. 2 ed., 2002.

SILVA, A.F. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* soladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambiques da Bahia**. [Dissertação] – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2009.

SILVA-FILHO, E.A.; MEOL, H.F.; ANTUNES, D.F.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JR, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of

fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.32, p. 481-486, 2005.

SINDAÇÚCAR-AL. Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool no Estado de Alagoas – Boletim comparativo de safras. Disponível em: < <http://www.sindacucar-al.com.br/wp-content/uploads/2018/10/N03Boletimcomparativodesafra20182019.pdf> > Acesso em 19 de setembro de 2019.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, Brasil, 2001.

STROPPA, C. T.; ANDRIETTA, S. R. ; ANDRIETTA, M. G. S. Caracterização de leveduras floculantes selecionadas em reator tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis/SC. Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

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.

TAVARES, F.C.A.. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. *STAB: Açúcar, Alcool e Subprodutos*, v.4, n.17, p.44-49, 1992.

TIBAYRENC, P.; GHOMMIDH, C.; PREZIOSI-BELLOU, L. Determination of yeast viability during a stress-model alcoholic fermentation using reagent-free microscopy image analysis. *Biotechnology Progress*, Malden, v. 27, n. 2, p. 539-46, 2011

TOSETTO, G. T.. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2008. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266224>>. Acesso em: 11 ago. 2018

WHEALS, A.E.; BASSO, L. C.; DENISE M. G. ALVES, M. G.; AMORIM, H. V.. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.