

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

**ADRIANA MENEZES OLIVO FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LEVEDURAS  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CAT-1 E BB9 E *PICHIA  
KUDRIAVZEVII* BB2 PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE  
PRIMEIRA GERAÇÃO**

**DOURADOS  
2017**

ADRIANA MENEZES OLIVO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LEVEDURAS  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CAT-1 E BB9 E *PICHIA  
KUDRIAVZEVII* BB2 PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE  
PRIMEIRA GERAÇÃO**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

DOURADOS  
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

F363a	<p>Fernandes, Adriana Menezes Olivo. Avaliação do desempenho de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e BB9 e <i>Pichia kudriavzevii</i> BB2 para a produção de etanol de primeira geração / Adriana Menezes Olivo Fernandes – Dourados, MS: UFGD, 2017. 54f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Sacarose. 2. pH. 3. Meio mineral. 4. Invertase. I. Título.</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



### Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Avaliação do desempenho de leveduras para a produção de etanol em diferentes meios”**, de autoria de **Adriana Menezes Olivo Fernandes**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz  
Presidente da banca examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wendel Batista da Silveira  
Membro Examinador (UFV)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 29 de junho de 2017.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pela força e sabedoria durante toda esta caminhada e por tudo que tem realizado em minha vida. Amém !!

Dedico este trabalho ao meu marido Fernando e minha linda filha Júlia, pelo apoio, paciência e compreensão durante todos esses anos de estudo.

A minha filha que fez o mestrado comigo durante nove meses de gestação, altas horas de companheirismo no laboratório e estudando. E ao meu marido obrigada pela cumplicidade e por estar sempre presente.

Agradeço toda a minha família, que sempre esteve ao meu lado incentivando e apoiando minhas decisões, principalmente, a minha mãe Cleide sempre rezando por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz, pelo apoio e orientação.

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pelo seu apoio, disponibilidade e conhecimentos transmitidos, que foi de fundamental importância para a conclusão deste trabalho.

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pelo acolhimento como meu primeiro orientador e seus ensinamentos sempre que necessário.

Nayara Fernanda Lisboa Garcia, pelos ensinamentos, apoio e companheirismo sempre muito solícita.

A todos os colegas do laboratório Nayara, Flávia, Gabriela Finoto, Vinicius, Isadora, Laís, Gabriela Ulian, Guilherme pelos ensinamentos trocados, pelas risadas e pelos momentos de descontração e alegria.

As técnicas do multidisciplinar Renata, Mara, Suelen e Faby por todo apoio e compreensão.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A UFGD pela formação profissional proporcionada.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

(Eleanor Roosevelt)

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor e um dos maiores exportadores de etanol no mundo. A busca por leveduras promissoras que superem o desempenho produtivo das linhagens comerciais, como a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, é de suma importância. Um dos fatores limitantes é a ausência de leveduras apropriadas para tolerar as condições severas impostas nas fermentações industriais. Foram avaliadas duas leveduras, *Pichia kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 isoladas na Região Centro-Oeste e que fazem parte do banco de linhagens da Rede Centro Oeste de Leveduras (RECOL), além da levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o perfil de desempenho das três linhagens estudadas, visando determinar se o comportamento das mesmas em bancada se reproduz em meio de cultivo similar ao utilizado pelas indústrias sucroenergética. *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 apresentaram perfis semelhantes ao da *S. cerevisiae* CAT-1 quanto ao consumo e produção de etanol em condições laboratoriais em meio YEPD. Entretanto, em condições de cultivo simulando o meio usado no processo industrial, o meio mosto, a 22° Brix em pH 3,0, a levedura industrial apresentou maior consumo de substrato e melhor produção de etanol em relação as outras duas leveduras. O cultivo com mosto a pH 3,0 apresentou baixa produção de etanol devido ao estresse causado nas células pelo meio ácido, ocasionando alterações fisiológicas como queda na viabilidade de *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9. Nesta condição a *S. cerevisiae* CAT-1 produziu  $9,39 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  de etanol em 24 h, valor três vezes menor do que o obtido no cultivo com mosto pH 5,0, que foi de  $28,30 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  de etanol, enquanto que em meio mineral à pH 3,0 e 5,0 verificaram-se no mesmo período produções de etanol de  $29,17 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  e  $30,70 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ , respectivamente. Concluiu-se que o desempenho da levedura não foi limitado pela variação de pH em meio mineral, pois este apresenta todos os nutrientes indispensáveis a levedura. Por outro lado, a levedura teve a produção de etanol limitada em meio mosto devido ao fator estressante pH 3,0, e possivelmente potencializada pela composição do mosto. A *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou expressão da enzima invertase, enzima capaz de hidrolisar dissacarídeos contidos no mosto. Os resultados mostraram que a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou como característica a produção de enzima invertase de natureza constitutiva, proporcionando uma rápida hidrólise da sacarose contida no mosto.

**Palavras-chave:** Sacarose; pH; Mosto; Meio mineral; Invertase.

## ABSTRACT

Brazil is the second largest producer and one of the largest exporters of ethanol in the world. The search for promising yeasts that outperform the productive performance of commercial strains, such as *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, is of paramount importance. One of the limiting factors is the absence of yeasts suitable to tolerate the severe conditions imposed on industrial fermentations. We assessed two yeasts *Pichia kudriavzevii* BB2 and *S. cerevisiae* BB9 isolated in Midwest and forming part of the bank lines of the network Midwest Yeast (Recol), and the yeast industrial *S. cerevisiae* CAT-1. The present work had the objective of evaluating and comparing the performance profile of the three studied strains, aiming to determine if the behavior of the same ones in the laboratory conditions is reproduced in a similar culture medium to that used by the sugarcane industries. *P. kudriavzevii* BB2 and *S. cerevisiae* BB9 presented profiles similar to that of *S. cerevisiae* CAT-1 regarding the consumption and production of ethanol under laboratory conditions in YEPD medium. However, under cultivation conditions simulating the medium used in the industrial process, medium wort, at 22° Brix at pH 3.0, industrial yeast showed higher substrate consumption and better ethanol production in relation to the other two yeasts. The culture with must at pH 3.0 presented low ethanol production due to the stress caused in the cells by the acid medium, causing physiological alterations such as drop in viability of *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 and *S. cerevisiae* BB9. In this condition *S. cerevisiae* CAT-1 produced  $9.39 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  ethanol in 24 h, three times lower than that obtained in the culture with pH 5.0, which was  $28.30 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  of ethanol, whereas in mineral medium at pH 3.0 and 5.0, ethanol yields of  $29.17 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  and  $30.70 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ , respectively, were observed in the same period. It was concluded that the yeast performance was not limited by the variation of pH in mineral medium, since it presents all the nutrients essential to yeast. On the other hand, the yeast had limited ethanol production in wort medium due to the stress factor pH 3.0, and possibly potentiated by the wort composition. *S. cerevisiae* CAT-1 presented expression of the enzyme invertase, an enzyme capable of hydrolyzing disaccharides contained in the must. The results showed that *S. cerevisiae* CAT-1 presented as characteristic the invertase enzyme production of constitutive nature, providing a rapid hydrolysis of the sucrose contained in the must.

**Keywords:** Sucrose; pH; Mosto; Mineral medium; Invertase

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT.....	7
SUMÁRIO.....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
3. REVISÃO .....	15
3.1. Etanol no Brasil .....	15
3.2. Modelo de Produção de Etanol (“ <i>MELLE-BOINOT</i> ”) .....	16
3.3. Leveduras em Processos Industriais .....	17
3.4. Interferentes no Processo de Fermentação .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Leveduras Seleccionadas.....	21
4.2. Manutenção das Leveduras .....	22
4.3. Ativação das Leveduras.....	22
4.4. Multiplicação Celular .....	22
4.5. Padronização do Inóculo .....	22
4.6. Fermentação em meio YEPD .....	23
4.7. Preparo do Mosto .....	23
4.7.1 Fermentação em Mosto .....	24
4.7.2. Parâmetros Estabelecidos .....	24

4.8. Fermentação em meio mineral .....	25
4.9. Teste de Hidrólise da Sacarose .....	25
5.0. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance para Análise de Etanol e Substrato Residual .....	26
5.1. Quantificação da Atividade de Invertase na Biomassa.....	26
5.1.2. Determinação das Atividades Enzimáticas.....	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
6.1. Fermentação em meio YEPD a pH 6,0 .....	27
6.2. Fermentação em meio Mosto a pH 3,0.....	29
6.3. Hidrólise da Sacarose Durante o Pré-Tratamento .....	35
6.4. Hidrólise da Sacarose Durante a Fermentação .....	36
6.5. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 com Mosto a pH 3,0.....	37
6.5.1 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 com Mosto a pH 5,0.....	38
6.5.2 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 com meio Mineral a pH 3,0.....	40
6.5.3 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 com meio Mineral a pH 5,0.....	41
6.6. Produção de Biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 a partir de meio Mineral a pH 3,0 - 5,0 e Mosto a pH 5,0 .....	42
6.7. Determinação da Atividade de Invertase nas Células .....	44
7. CONCLUSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS .....	48

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Produtividade volumétrica de etanol com *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio laboratorial YEPD ( $20 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ) e meio mosto ( $200 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ) em pH 3,0 durante 9 e 24 horas. ....34

**Tabela 2.** Avaliação da composição em termos de açúcares do mosto natural submetido a diferentes tratamentos .....36

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura1:** Aspecto do mosto preparado com o magma.....24

**Gráfico1.** Consumo de glicose das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio YEPD a pH 6,0 durante 9 h de cultivo .....28

**Gráfico 2.** Produção de etanol das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio YEPD a pH 6,0 durante 9 h de cultivo. ....29

**Gráfico 3.** Consumo de açúcar e produção de etanol da *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo .....30

**Gráfico 4.** Consumo de açúcar e produção de etanol da *P. kudriavzevii* BB2 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo .....31

**Gráfico 5.** Consumo de açúcar e produção de etanol da *S. cerevisiae* BB9 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo .....32

**Gráfico 6.** Perfil de consumo de sacarose da *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo.....34

**Gráfico 7.** Comparação entre meio YEPD e meio mosto quanto a produção de etanol em 24 horas.....35

**Gráfico 8.** Cinética de consumo dos substratos e produção de etanol com a *S. cerevisiae* CAT-1 em mosto a pH 5,0 durante 24 h de cultivo.....39

**Gráfico 9.** Cinética de consumo dos substratos e produção de etanol com a *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mineral a pH 3,0 .....40

**Gráfico 10.** Cinética de consumo dos substratos e produção de etanol com a *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mineral a pH 5,0 durante 24 h de cultivo .....42

**Gráfico 11.** Perfil de produção de biomassa da *S. cerevisiae* CAT-1 no período de 3 a 24 h de cultivo .....43

**Gráfico 12.** Produção de enzima invertase pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em meio

mineral a pH 5,0 em 48 horas de cultivo .....46

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é de grande interesse, tanto comercialmente quanto ambientalmente, devido sua matéria-prima proveniente da cana-de-açúcar ser renovável, apresentando menor degradação ao meio ambiente quando comparada com o uso de combustíveis derivados do petróleo (ZABED et al., 2014).

O Brasil é reconhecido mundialmente como um dos líderes na produção de cana-de-açúcar, responsável por 1/3 de toda a produção mundial (DELLA-BIANCA et al., 2013). O processo de produção de etanol de primeira geração apresenta elevado rendimento de produção a custos baixos, que ocorre por causa da matéria prima rica em açúcares. O material de partida não precisa ser hidrolisado, assim, sem grandes gastos no processo (ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

No Brasil, o álcool combustível é obtido por meio da fermentação dos açúcares presentes na cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum*), que oferece grande quantidade de sacarose, esse dissacarídeo sofre hidrólise pela ação da enzima invertase sendo convertido em glicose e frutose, os quais são transportados para o interior da célula por meio dos transportadores de hexoses. Estima-se que 56% da produção da sacarose serão transformados em etanol durante o processo fermentativo (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009).

Segundo Wang et al. (2013) e Andrietta et al. (2007) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie dominante para produção de etanol. A facilidade na produção de etanol pela *S. cerevisiae* é tão evidente que ela executa fermentação alcoólica quando submetida a altas concentrações de açúcar, mesmo sob condições aeróbias. Além disso apresenta uma boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e a outros inibidores (aldeídos, ésteres, ácidos, álcoois superiores, compostos sulfurados, fenóis, biomassa, metanol, furfural) formados durante a fermentação e à capacidade de crescer rapidamente (DELLA- BIANCA et al., 2013).

Assim sendo, a melhora na eficiência da fermentação, etapa central desse processo, permite um grande aumento na produção de etanol. No entanto, poucos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento desta área. Sendo assim, busca-se com o presente trabalho avaliar novas linhagens como a *Pichia kudriavzevii* BB2 e *Saccharomyces cerevisiae* BB9 que são leveduras isoladas na Região Centro-Oeste e que fazem parte do banco de linhagens da Rede Centro Oeste de Leveduras (RECOL), e a levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1. Buscando simular condições estressantes do

processo industrial, como forma de testar o desempenho fermentativo das leveduras estudadas, para obter uma produtividade maior para a produção de etanol de primeira geração.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o perfil de desempenho da *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, *Pichia kudriavzevii* BB2 e *Saccharomyces cerevisiae* BB9, visando determinar se o comportamento das mesmas em bancada se reproduz em meio de cultivo similar ao utilizado pelas indústrias sucroenergéticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar e comparar o perfil de desempenho das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, *Pichia kudriavzevii* BB2 e *Saccharomyces cerevisiae* BB9, visando determinar se o comportamento das mesmas em bancada se reproduz em meio de cultivo similar ao utilizado pelas indústrias sucroenergética.

### 2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- (a) avaliar, em condições laboratoriais (YEPD) e em meio de cultivo industrial (mosto), o desempenho das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9.
- (b) avaliação da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em diferentes condições de cultivo envolvendo meio mineral e mosto, em pH 3,0 e 5,0.
- (c) avaliar a atividade da enzima invertase na levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em diferentes tipos e concentrações de açúcares.

### 3. REVISÃO

#### 3.1. ETANOL NO BRASIL

O etanol vem sendo utilizado como combustível no Brasil desde de 1920, mas foi a partir de 1970, devido à crise mundial do petróleo que os países foram estimulados a buscar fontes alternativas de energia. A crise do petróleo na década de 1970, levou o Brasil a desenvolver o programa Nacional do Álcool – Proálcool, devido aos altos preços pagos pelo barril de petróleo, que importava na época mais de 80% do petróleo que consumia (LEITE; LEAL, 2007). O programa passou a determinar a mistura de 20% de álcool anidro à gasolina, desencadeando um rápido crescimento na cadeia produtiva sucroenergética. O governo incentivou novas pesquisas e a busca pelo desenvolvimento tecnológico nas usinas como forma de reduzir o custo da produção do biocombustível.

O Brasil é o único país do mundo onde uma grande parte do combustível consumido pelos automóveis é renovável. A produção e o uso do etanol no Brasil hoje, são os melhores exemplos no mundo, quanto a introdução de energia renovável em grande escala de produção (MACEDO, 2007).

A intervenção estatal permitiu que o setor privado investisse maciçamente no aumento de produção, sendo fundamental para o avanço tecnológico, buscando por inovações e garantindo a competitividade do etanol produzido no Brasil.

Conforme Macedo (2007) destaca entre os principais avanços tecnológicos ocorrido no setor sucroenergético no período de 1975-2000, a introdução em larga escala de variedades de cana desenvolvidas no Brasil, o desenvolvimento do uso integral da vinhaça na fertirrigação, controle biológico das pragas e doenças da cana, desenvolvimento do sistema de moagem com quatro rolos, tecnologia para operação de fermentações "abertas" de grande porte, aumento na produção de energia elétrica na indústria, otimização do corte, carregamento e transporte da cana, mapeamento do genoma da cana e transformações genéticas, mecanização da colheita, obtenção de excedentes de energia elétrica e venda para a concessionária, avanços em automação industrial, avanços no gerenciamento técnico (agrícola e industrial) e a introdução dos motores veículo de combustível duplo (*flex-fuel*).

A necessidade por novas fontes de energia renováveis, a boa competitividade do álcool com outros combustíveis em relação ao preço, aquisição de novas tecnologias como os veículos movidos a álcool e a boa aceitação pela população, alavancaram a

produção de etanol no Brasil. Assim o Brasil, detentor de vasta área territorial vem investindo no setor sucroenergético como forma de aproveitamento de áreas de pastagens degradadas e, com isso, proporcionando o fortalecimento do agronegócio brasileiro e, conseqüentemente o crescimento da economia do país (GUIMARÃES; TURETTA; COUTINHO, 2010).

O primeiro levantamento de cana-de-açúcar da safra 2015/2016 indica que a produção no país pode chegar a 654,6 milhões de toneladas. Esse valor é 3,1% superior, quando comparado aos 634,8 milhões de toneladas da safra anterior. A produção de etanol total consolidou-se em 28,66 bilhões de litros na safra 2014/15 e está estimada em 29,21 bilhões de litros para safra 2015/16, um incremento de 554,75 milhões de litros, alta de 1,9%. Para o etanol hidratado, utilizado nos veículos *flex-fuel*, a expectativa é de aumento de 7,4% quando comparados com a produção da safra anterior, o que equivale a 1,25 bilhões de litros. O estudo foi divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015). Segundo as consultorias e associações de cana-de-açúcar apostam em números recordes de moagem para 2016/17, com direito a uma perspectiva de aumento na produção sucroalcooleira, devido à queda na produção internacional.

Neves, Trombim e Consoli (2010), observam que a cadeia sucroenergética já mostrou seu potencial de suprir produtos de maneira sustentável, o que contribui para que o Brasil tenha uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo. E novos produtos como o etanol celulósico ou etanol de segunda geração a partir da cana já estão em desenvolvimento. O uso de biocombustíveis para substituir o petróleo é a maneira mais viável para garantir um futuro sustentável (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2008).

### **3.2. MODELO DE PRODUÇÃO DE ETANOL (“MELLE-BOINOT”)**

O processo *Melle-Boinot* é utilizado no Brasil desde a década de 1960 para produção de etanol por via fermentativa utilizando leveduras. A levedura mais utilizada para a produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*.

O processo de batelada alimentada ou *Melle-Boinot* é um processo de alimentação contínuo sob condições controladas até atingir o volume da dorna de abastecimento, nos quais as leveduras são recicladas para fermentações consecutivas, permitindo altas densidades de células. Estas passam por tratamento ácido para diminuir a contaminação

bacteriana (BROWN et al., 2013). Este tratamento dura de 1 a 3 h, consiste em diluição com água e adição de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) até atingir valores de pH entre 1,8 e 2,5 (dependendo do nível de contaminação), após o processo as células são reutilizadas (BASSO et al., 2008; DELLA-BIANCA et al., 2013). Esse processo apesar de antigo apresenta resultados convenientes e satisfatórios quanto à eficiência de conversão de açúcares em álcool (PACHECO, 2010).

Basso et al. (2008) afirmaram que o estudo da reciclagem torna-se de vital importância quanto a análise dos teores de compostos tóxicos à fermentação, visto que são produzidos durante o processo, podendo acumular-se no inóculo promovendo perdas de viabilidade, abaixando a eficiência e prejudicando a produtividade industrial. Durante o processo fermentativo altas concentrações de açúcares, etanol, temperaturas elevadas, variações de pH, presença de bactérias e leveduras selvagens são fatores de estresse que precisam ser ajustados para que ocorra uma boa produção fermentativa. Segundo Ferreira, Amorim e Basso (1999) em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* as reservas de carboidratos são degradadas e transformadas em álcool por processo fermentativo durante a ausência de nutrientes, sob aerobiose ou anaerobiose em condições de pH baixo (2,5 - 3,5) ou de temperatura alta (35 - 45°C).

O processo *Melle-Boinot* apresenta bons resultados, principalmente em fermentações alcoólicas, devido sua alta densidade celular e alta produtividade resultante do grande número de células viáveis no meio fermentativo (BABRZADEH et al., 2012). A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, apresentando menor consumo de substrato devido à reprodução celular ser menor, com maior pureza na fermentação, devido ao tratamento ácido.

A batelada alimentada apresenta vantagens em relação aos processos contínuos devido ao fato de ser menos susceptível à contaminação bacteriana. Também é mais fácil de monitorar e controlar seus parâmetros de processo. Com isso reduzem-se os custos e trabalhos excessivos em processos industriais (GODOY et al., 2008).

### **3.3. LEVEDURAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo com diversas aplicações para o ser humano, usado na panificação, fabricação de cerveja, vinho e produção de etanol.

Basso et al. (2008) após anos estudando e isolando leveduras nos processos industriais, relatam que poucas linhagens apresentaram a capacidade de serem reintroduzidas no processo industrial. As linhagens industriais *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2, comumente utilizadas na produção de etanol (ROMANI et al., 2015) foram selecionadas à partir de processos onde ficou constatada a sua predominância e persistência por toda a safra, confirmada através de cariotipagem. Assim essas linhagens isoladas nas usinas Catanduva (CAT-1) e Usina da Pedra (PE-2) passaram a ser utilizadas em processos fermentativos industriais de produção de etanol (BASSO et al., 2008). Essas linhagens apresentaram uma elevada capacidade de implantação industrial, maior competitividade em relação às leveduras contaminantes do processo e apresentam maior rendimento de etanol (DELLA-BIANCA et al., 2013).

A *S. cerevisiae* CAT-1 é umas das linhagens mais utilizadas pelas usinas brasileiras de etanol combustível, destaca-se pela sua eficiente capacidade de fermentação, especialmente em altas concentrações de açúcar e, também, pelo menor tempo de fermentação quando comparada a outras leveduras (BASSO et al., 2008; ANDRIETTA et al., 2007). O sequenciamento da *S. cerevisiae* CAT-1 mostrou a presença de genes que facilitam a metabolização da sacarose proporcionando, uma fermentação mais rápida diante de outras leveduras (BABRZADEH et al., 2012).

A produção de etanol no Brasil ocorre pela ação das leveduras que utilizam como substrato a glicose, frutose e a sacarose proveniente do caldo de cana-de-açúcar. Durante o processo de fermentação ocorre ciclos de células, causando uma sucessão intensiva de linhagens de leveduras no mosto de fermentação (BATISTOTE et al., 2010), a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, apresenta um ótimo desempenho fermentativo diante de caldos ricos em sacarose, sobressaindo outras leveduras, conseguindo terminar o ciclo dominando o processo sobre outras leveduras interferentes.

As  $\beta$ -frutofuranosidases (E.C 3.2.1.26) conhecidas popularmente como sacarases ou invertases são sintetizadas pela levedura *S. cerevisiae*. As *S. cerevisiae* sintetizam enzimas invertases que ao quebrarem a sacarose geram uma mistura equimolar de glicose e frutose, aplicada em vários processos na indústria alimentícia, cosméticos, farmacêutica, papel e produção de etanol (QURESHI et al., 2012). Estas são, portanto de fundamental importância no processo de produção de álcool combustível à partir da cana-de-açúcar.

A levedura *S. cerevisiae* sintetiza a invertase de duas maneiras: no mecanismo predominante, a sacarose é hidrolisada por uma invertase que fica localizada na parte

externa da célula. Esta é definida por alguns autores como “extracelular”, mas apesar dessa denominação, a mesma não é excretada pela levedura, mas aderida à célula entre a membrana plasmática e a parede celular (MORENO; SANCHEZ; RODRIGUEZ, 1990). A glicose e frutose hidrolisadas pela invertase entram na célula por difusão facilitada através de transportadores. No outro mecanismo a sacarose pode ser transportada ativamente para as células e hidrolisada intracelularmente no citoplasma (DÁRIO et al., 2008).

O mosto fermentativo a base de caldo de cana-de-açúcar apresenta diferentes açúcares como a sacarose, glicose e frutose em sua estrutura, possibilitando variadas rotas metabólicas para utilização dos substratos pelas leveduras, se faz necessário o estudo da interação entre essas fontes de carbono para um melhor entendimento de seu metabolismo (SANTOS et al., 2013).

É intensa a busca por linhagens promissoras que superem o desempenho produtivo das linhagens industriais já testadas, como as *S. cerevisiae* CAT-1, PE-2, BG-1, SA-1 e Y904 (BASSO et al., 2008), que consigam se manter no processo produtivo mesmo diante de fatores de estresse como: altas concentrações de etanol, choques de temperatura e estresse osmótico. Busca-se com essa pesquisa estudar leveduras isoladas na região que apresentem familiaridade com alguns aspectos encontrado nas usinas como (pH, temperatura, concentração de substrato entre outros) que superem em produção a levedura *S. cerevisiae* CAT-1.

### **3.4. INTERFERENTES NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO**

No processo industrial de fabricação de álcool, é fundamental o conhecimento das condições do processo fermentativo, para que se alcance a produção desejada e, para que isso ocorra, as destilarias buscam formas de melhoria constantemente (GOMBERT; VAN MARIS, 2015). Um dos fatores críticos do processo fermentativo é a contaminação microbiana que causa danos relevantes na produtividade final, pois a presença de microrganismos indesejáveis resulta em prejuízos ao processo devido ao consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras. Esta última se deve ao acúmulo de toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio durante a fermentação alcoólica, principalmente: ácidos lático e acético (FREITAS; ROMANOS, 2013; PRADO, 2014). Contaminantes produtores de goma provocam

diversos problemas no processo de produção de etanol, pois elevam a viscosidade do caldo, provocando o entupimento de tubulações, centrifugas e peneiras (NOBRE, 2005).

A seleção de linhagens resistentes às variações ocorridas no processo fermentativo é uma importante ferramenta na busca de alta produtividade, garantindo manutenção da qualidade do produto. As linhagens iniciadoras são adicionadas em alta quantidade para iniciarem mais rapidamente o processo e prevalecer sobre a microbiota selvagem, evitando a competição de nutrientes essenciais e produção de metabólitos que sejam interferentes para uma boa produção (STROPPA et al., 2009).

Grande parte das linhagens de leveduras utilizadas nas destilarias apresentam características indesejadas durante o processo de fermentação, mesmo sendo nativas do processo. A produção de espuma e a alta taxa de sedimentação aumenta o tempo de fermentação. As linhagens produtoras de espuma inviabilizam a completa utilização da capacidade dos fermentadores e apresentam perdas durante a centrifugação proporcionando maiores custos devido ao consumo de mais agentes anti-espuma e perda no processo de centrifugação. A maioria das linhagens que produzem espuma também têm alta floculação reduzindo o contato entre a levedura e o substrato, aumentando o tempo de fermentação, resultando em altas concentrações residuais de açúcar (ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

Segundo Figueiredo (2008), o maior problema encontrado na produção de álcool atualmente é a floculação, se dá devido à interação entre os lactobacilos e a levedura, possivelmente, devido às altas concentrações de cálcio no mosto e sobre condições de estresse. As bactérias se aderem por ligações entre moléculas nas paredes das leveduras, fazendo com que a biomassa se precipite formando aglomerados. Esses aglomerados causam a sedimentação das leveduras no fundo das dornas, reduzindo a conversão de açúcar em etanol, ocasionando perda de células na centrifugação, com o consequente gasto de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico (LUDWIG et al., 2001).

O controle da contaminação tem sido conduzido pelo emprego de agentes químicos e físicos com a finalidade de controlar ou inibir a contaminação no processo fermentativo, sem afetar a viabilidade das células (FREITAS; ROMANOS, 2013). Entretanto, muitas vezes os métodos adotados, como o tratamento com ácido sulfúrico, uso de antibióticos e aumento de temperatura no processo, têm causado danos ao e provocado o aparecimento de microrganismos resistentes (NOBRE, 2005).

A criação de novas linhagens em laboratório, resistentes ao stress do processo,

muitas vezes não são transferíveis para aplicações industriais devido ao sistema operacional adotado, cujos pontos críticos adotados são divergentes dos sistemas laboratoriais. As destilarias brasileiras possuem diversas linhagens de leveduras que são testadas em laboratório mas que, em escala industrial, não sobreviveriam mais que um mês devido à reciclagem, ao tratamento ácido e à competição com leveduras selvagens (ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

Caetano e Madaleno (2011), em extenso levantamento da microbiota predominante de amostras de todo o ambiente fermentativo, obtiveram resultados que revelaram que 98,52% das bactérias isoladas eram pertencentes ao grupo gram-positivo com com 59,75% do gênero *Lactobacillus* sendo as bactérias lácticas as principais promotoras de fermentação indesejadas devido sua resistência ao etanol (LUDWING; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001). Durante o processo fermentativo a cana-de-açúcar traz consigo contaminantes de sua microbiota, do solo, da matéria orgânica em decomposição e microrganismos associados às pragas e moléstias da planta que concorrem com as leveduras selecionadas inicialmente (STECKELBERG, 2001; STROPPA et al., 2009).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. LEVEDURAS SELECIONADAS**

Foram estudadas as leveduras *Pichia kudriavzevii* (BB2) e *Saccharomyces cerevisiae* (BB9) previamente isoladas da usina de açúcar e álcool Barralcool, Barra do Bugres, MT por Silva et al. (2011). Estas linhagens fazem parte da coleção de leveduras da Rede Centro Oeste de Leveduras (RECOL). Como padrão foi utilizada a linhagem industrial *S. cerevisiae* CAT-1, gentilmente cedida pela usina São Fernando Açúcar e Álcool (USFAA), Dourados, MS.

As leveduras *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9, foram identificadas por (SILVA et al., 2011) e foram selecionadas para o presente trabalho por terem apresentado melhor desempenho fermentativo e maior produtividade em etanol nas condições estudadas anteriormente por Camargo (2013).

#### **4.2. MANUTENÇÃO DAS LEVEDURAS**

As linhagens foram preservadas em tubos de ensaio com 5 mL de cultivo YEPD (*Yeast Extract, Pepton and Dextrose*) ágar inclinado (extrato de levedura, 10 g x L<sup>-1</sup>; peptona, 20 g x L<sup>-1</sup>; glicose, 20 g x L<sup>-1</sup>; ágar, 15 g x L<sup>-1</sup>) autoclavado 121°C, 15 min, e adicionado de glicerol a 20%. Os tubos foram vedados e armazenados em ultrafreezer à -80°C, sendo repicadas quando necessário.

#### **4.3. ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS**

As leveduras foram reativadas em ágar YEPD estéril (1%, 2%, 2%, 1,5%) por 24 horas e depois repassado para um novo ágar sendo incubado em estufa de 30°C por mais 24 horas, para sua completa reativação.

#### **4.4. MULTIPLICAÇÃO CELULAR**

Para multiplicação celular foi transferida uma alçada de cada linhagem selecionada para frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 200 mL de caldo YEPD estéril (extrato de levedura, 10 g x L<sup>-1</sup>; peptona, 20 g x L<sup>-1</sup>; glicose, 20 g x L<sup>-1</sup>, sendo incubados por um período de 16-18 horas em agitador orbital rotativo em 200 rpm a 30°C em aerobiose. Após o tempo de crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação em centrifuga de tubos (Quimis) a 1500 x g por 5 minutos e transferidas para o meio de cultivo.

#### **4.5. PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO**

Os ensaios iniciaram-se com a concentração inicial de células de 2x10<sup>6</sup> UFC x mL<sup>-1</sup> (ARAQUE et al., 2008) equivalente a 9 g x L<sup>-1</sup> de levedura inoculada no meio de fermentação, concentração próxima a usada pelas usinas sucroenergética, que iniciam com 10 a 20 g x L<sup>-1</sup> de leveduras (LIMA et al., 2001).

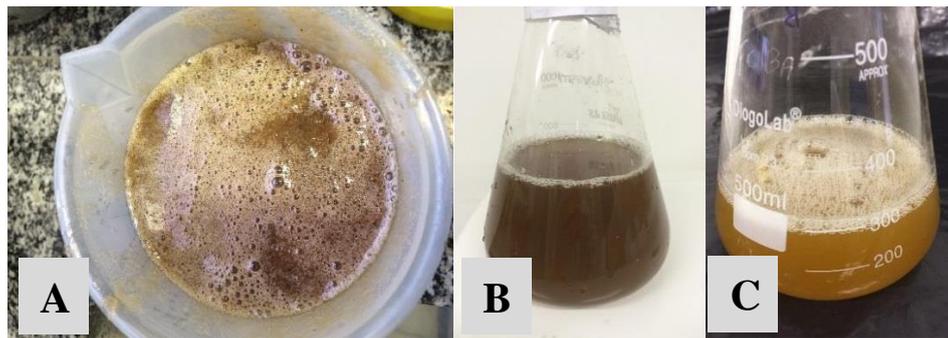
#### **4.6. FERMENTAÇÃO EM MEIO YEPD**

O ensaio com meio YEPD Foi adotado como controle (CUNHA et al., 2015). A fermentação foi realizada em frasco Erlenmeyer de 500 mL, tampados com rolhas de silicone (evitando a entrada de ar constantemente), entretanto a cada 1 h esse frasco era aberto para coleta das amostras, ocorrendo aeração parcial do frasco e saída de CO<sub>2</sub>. As leveduras selecionadas foram inoculadas em 300 mL de meio YEPD, incubadas em estufa a 30°C, sendo os ensaios realizados em duplicata. Nas primeiras 10 h foram retiradas amostras com volume de 5 mL a cada hora e após 24 h de cultivo (STROPPA et al., 2009). Logo após a coleta das amostras em tubo plástico tipo falcon de 50 mL, foram centrifugadas 1500 x g por 5 minutos e os sobrenadantes foram guardados em freezer a -18°C até a realização das análises por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP) do inglês “*Ultra-performance liquid chromatography*” (UPLC).

#### **4.7. PREPARO DO MOSTO**

O mosto foi preparado com o concentrado de caldo de cana que sai dos concentradores, fase pré-cristalização. Esse caldo de aspecto cremoso chamado magma é composto por duas frações distintas: açúcares cristalizados (sacarose e glicose) e o melaço que é composto basicamente pela fração não cristalizada dos açúcares sacarose, glicose e frutose. O mosto a base de caldo de cana foi preparado através da dissolução do magma adicionando água destilada até chegar em 22° Brix medido por refratômetro (Figura 1). O pH do mosto foi corrigido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PA) para pH 3,0. Os valores de Brix e pH escolhidos foram com intuito de se obter condições mais severas utilizadas nas usinas.

**Figura1:** Aspecto do mosto preparado com o magma



**Legenda:** Figura A - Becker com o magma em processo de dissolução. Figura B - mosto dissolvido a 22° Brix. Figura C - Mosto esterilizado.

**Fonte:** O autor.

#### 4.7.1. FERMENTAÇÃO EM MOSTO

Os ensaios fermentativos para produção de álcool simulando o meio de cultivo utilizado nas usinas sucroenergética. Foram realizados com mosto a 22° Brix e pH 3,0. O objetivo foi traçar os perfis de desempenho das três linhagens de leveduras estudadas, visando determinar se o comportamento das linhagens em bancada se reproduz em meio de cultivo similar aos utilizados nas usinas sucroenergética. O cultivo com o meio mosto ocorreu nas mesmas condições da fermentação com meio YEPD.

#### 4.7.2. PARÂMETROS ESTABELECIDOS

Alguns parâmetros estabelecidos no cultivo com mosto, tem como intuito simular as condições usadas nas usinas sucroenergética, como a acidificação do meio abaixando com  $H_2SO_4$  até o pH 3,0, concentração de 22° Brix (porcentagem de sólidos solúveis em uma solução) e aeração do meio durante a fermentação devido as dornas serem abertas (LIMA et al., 2001; BASSO, BASSO, ROCHA, 2011).

A intenção de utilizar a concentração de 22° Brix foi determinar até qual concentração alcoólica as leveduras testadas resistem. Segundo Lima et al. (2001), a concentrações dos mostos nas destilarias brasileiras ficam de 15 a 25° Brix os melaços diluídos com médias de 18 a 20° Brix. Já Basso, Basso e Rocha (2011) afirmam que o processo fermentativo é iniciado pela adição do mosto na concentração de 18 a 22% de ART. As leveduras apresentam pH ideal de crescimento entre os valotes de 4,5 e 5,0 pH,

Lima et al. (2001), mesmo sabendo disso as usinas sucroenergéticas baixam o pH do fermento para 2,0-2,5 por 1-2 h como alternativa de reduzir as bactérias contaminantes e causar a desfloculação (BASSO et al., 2008). Determinou-se como parâmetro o valor de 22° Brix e o pH 3,0 como estressante e 5,0 comparativo com intuito de descobrir leveduras com alto desempenho fermentativo.

#### **4.8. FERMENTAÇÃO EM MEIO MINERAL**

O meio mineral apresenta por litro de água destilada:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g; 1 mL de elementos-traço (EDTA, 15 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,5 mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 mg;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 mg;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4,5 mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 mg;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1,0 mg; KI, 0,1 mg), autoclavado (121°C, 20 min), posteriormente adicionou-se ao meio 1 mL de solução filtro-esterilizada de vitaminas (preparada em água desmineralizada, a uma concentração final por litro de: D-biotina, 0,05mg; pantotenato de cálcio, 1,0mg; ácido nicotínico, 1,0 mg; mio-inositol, 25 mg; cloreto de tiamina, 1,0 mg; piridoxina, 1,0 mg; e ácido para-aminobenzóico, 0,20 mg) (VERDUYN et al., 1992).

A solução foi preparada simulando as concentrações presentes no mosto, (sacarose  $122 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ , glicose  $51 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  e frutose  $38 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ), tais concentrações obtidas a partir dos ensaios realizados com o mosto. Foram autoclavadas separadamente e a tiamina esterilizada por filtração, sendo todos os componentes misturados após atingida a temperatura ambiente. Essa concentração de carbono foi adotada seguindo os valores do mosto do caldo de cana-de-açúcar a 22° Brix.

#### **4.9. TESTE DE HIDRÓLISE DA SACAROSE**

Foram coletadas 5 amostras do mosto a 22° Brix analisadas em HPLC. Os ensaios foram realizados como forma de demonstrar a causa da hidrólise da sacarose antes de iniciar o cultivo. Testou-se o mosto em condições naturais (MN), o mosto esterilizado (ME), mosto com pH 3,0 (MA), mosto esterilizado compH 3,0 (MEA 3,0) e mosto esterilizado com pH 3,2 (MEA 3,2), em todos os casos utilizou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para corrigir o

pH.

## **5.0. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (UPLC) PARA ANÁLISE DE ETANOL E SUBSTRATO RESIDUAL**

O sobrenadante foi utilizado para determinar etanol e substrato residual por UPLC Agilent 1290, equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) (Phenomenex). A fase móvel utilizada foi ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M, a uma vazão de 0,6 mL x min.<sup>-1</sup>, a 55°C (valores para a determinação de etanol), vazão de 0,3 mL x min.<sup>-1</sup>, a 25°C (valores para a determinação de substrato residual) e o volume injetado foi de 20µL ambas análises. Estes compostos foram detectados por um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (FONSECA et al., 2013).

## **5.1. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE INVERTASE NA BIOMASSA**

Os ensaios enzimáticos foram realizados para quantificar a produção de enzima invertase produzida pela *S. cerevisiae* CAT-1. Foram realizados com diferentes concentrações de açúcares e com fontes de carbono diferenciadas, de modo a verificar a natureza da invertase, ou seja, se sua produção é induzida ou constitutiva.

Utilizou-se o meio mineral em pH 5,0, por ser considerada faixa ótima entre pH 3,5-5,0 por Andjelkovic, Pićurić e Vujčić (2010) para a produção de invertase de *S. cerevisiae*. Foram realizados com 3 fontes de carbono: sacarose (122 g×L<sup>-1</sup>), glicose (51 g×L<sup>-1</sup>) e outro com mistura das 3 fontes de carbono sacarose, glicose e frutose (211 g×L<sup>-1</sup>).

As coletas foram feitas nos tempos: 0, 2, 4, 8, 10, 24 e 48 horas. Os meios cultivados foram centrifugados a 1500 x g por 5 minutos a fim de separar a massa celular do sobrenadante. A massa celular foi ressuspensa com 5 mL de tampão acetato centrifugada a fim de eliminar as impurezas, o procedimento foi repetido e após a última centrifugação, a massa celular foi ressuspensa em 5 mL de tampão acetato, sendo denominada biomassa celular. Os ensaios enzimáticos foram utilizando a suspensão da biomassa para a quantificação da invertase aderida a célula (BARBOSA, 2015).

### 5.1.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A mistura de reação foi composta por 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5, contendo 1% de sacarose e 0,1 de suspensão celular, mantido por 10 min. a 50°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), descrito por Miller (1959). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto de reação (U).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

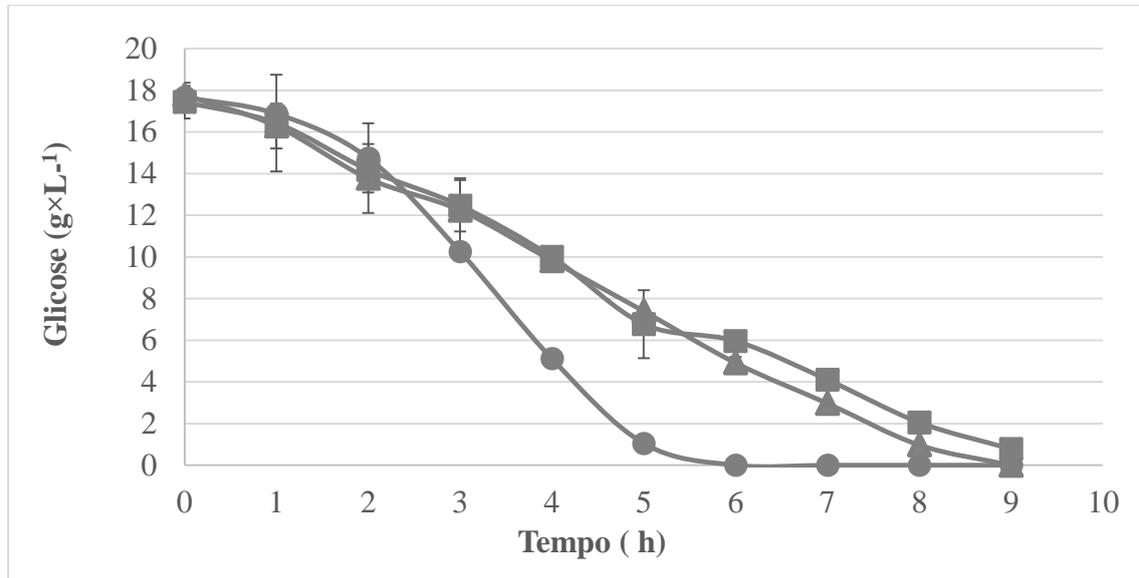
### 6.1. FERMENTAÇÃO EM MEIO YEPD A pH 6,0

Os parâmetros cinéticos no meio de cultura YEPD mostram as taxas de consumo de glicose pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 (Gráfico1). A *S.cerevisiae* CAT- 1 consumiu toda a glicose em 6 h enquanto que *S. cerevisiae* BB9 consumiu 9 h e *P. kudriavzevii* BB2 consumiu após as 9 h de cultivo. Os resultados dos cultivos em escala laboratorial demonstram que a *S.cerevisiae* CAT- 1 consumiu a fonte de carbono em menor tempo em relação às outras leveduras. Assim como Basso et al. (2008) e Moreira et al. (2013) relatam que a *S. cerevisiae* CAT-1 apresenta notável capacidade de competir com outras leveduras, sobrevivendo e dominando as fermentações, sendo atualmente a levedura mais utilizada nas usinas de etanol no Brasil.

Quanto à produção de etanol no meio YEPD com  $20 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de glicose, observa-se no Gráfico 2 que as três leveduras iniciaram a produção após 2 h de cultivo, sendo que a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou maior valor inicial, mas após 9 h de cultivo as três leveduras testadas produziram valores semelhantes. O Gráfico 2 mostra as produções de etanol das leveduras *P. kudriavzevii* BB2 ( $7,99 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ), *S. cerevisiae* BB9 ( $7,55 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e *S. cerevisiae* CAT-1 ( $7,15 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) em 9 h de cultivo. Observou-se produção semelhante de etanol entre as duas leveduras testadas e a levedura industrial em condições laboratoriais. Acredita-se que a semelhança nos resultados, se deve ao meio YEPD utilizado, por ser um meio natural que oferece nutrientes como peptona, extrato de levedura e carboidrato como a glicose, proporcionado condições ótimas de cultivo para

ambas leveduras (BORTOLI et al., 2013).

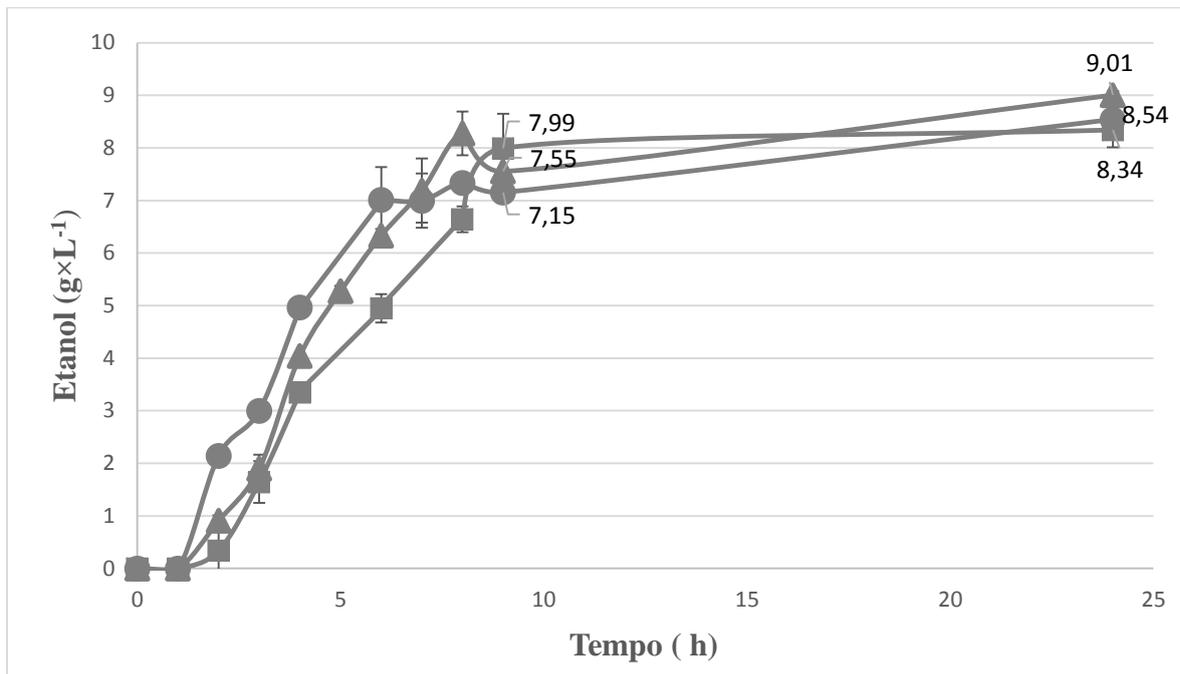
**Gráfico 1.** Consumo de glicose das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio YEPD a pH 6,0 durante 9 h de cultivo.



**Legenda:** *S. cerevisiae* CAT-1 (●), *P. kudriavzevii* BB2 (■) e *S. cerevisiae* BB9 (▲).

**Fonte:** O autor.

**Gráfico 2.** Produção de etanol das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *P.kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio YEPD a pH 6,0 durante 9 h de cultivo.



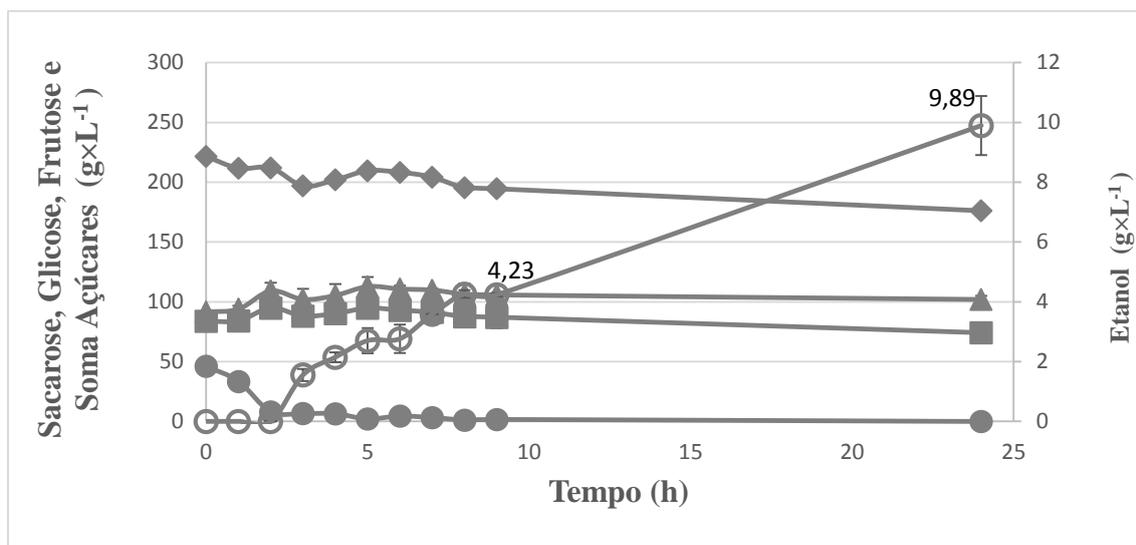
**Legenda:** *S. cerevisiae* CAT-1 (●), *P.kudriavzevii* BB2 (■) e *S. cerevisiae* BB9 (▲).

**Fonte:** O autor.

## 6.2. FERMENTAÇÃO EM MEIO MOSTO A pH 3,0

O cultivo com a *S. cerevisiae* CAT-1 em mosto com 22° Brix e pH 3,0, apresentou inicialmente 46,18 g x L<sup>-1</sup> de sacarose (Gráfico 3). Após 2h de cultivo metabolizou 38 g x L<sup>-1</sup> de sacarose, liberando 19 g x L<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup> de substrato. Possivelmente essa alta metabolização da sacarose tenha sido expressa pela invertase, assim como observaram Muller (2013) e Espirito-santo (2012) relataram alta hidrólise da sacarose devido ação da enzima invertase. Avaliando o perfil de crescimento fermentativo da linhagem *S.cerevisiae* CAT-1 frente a diferentes substratos demonstrou que a sacarose é rapidamente hidrolisada no exterior das células devido a altas taxas de expressão da invertase (MULLER, 2013).

**Gráfico 3.** Consumo de açúcar e produção de etanol da *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo.



**Legenda:** Sacarose (●), glicose (■) frutose (▲) soma açúcares (◆), etanol (◊)

**Fonte:** O autor.

Acredita-se que a *S. cerevisiae* CAT-1 por ser uma levedura industrial apresenta aspectos fisiológicos dominantes e resistentes, que garantam sua permanência em cultivos estressantes, devido sua superioridade e adaptação comparada com outras leveduras. O sequenciamento total de seu genoma Stambuk et al. (2009) mostraram um número maior de genes relacionados ao metabolismo das vitaminas B1 e B6, que aumentam a competitividade e garantem sua predominância em relação às leveduras selvagens e de laboratório. Com isso, a fermentação com a *S. cerevisiae* CAT-1 produz pouca espuma, flocula menos e reduz o consumo de insumos. Análises realizadas por Stambuk et al. (2009) mostraram também que as *S. cerevisiae* possuem um loci do gene *SUC2* em seu genoma, sendo postulada como uma adaptação para caldos ricos em sacarose.

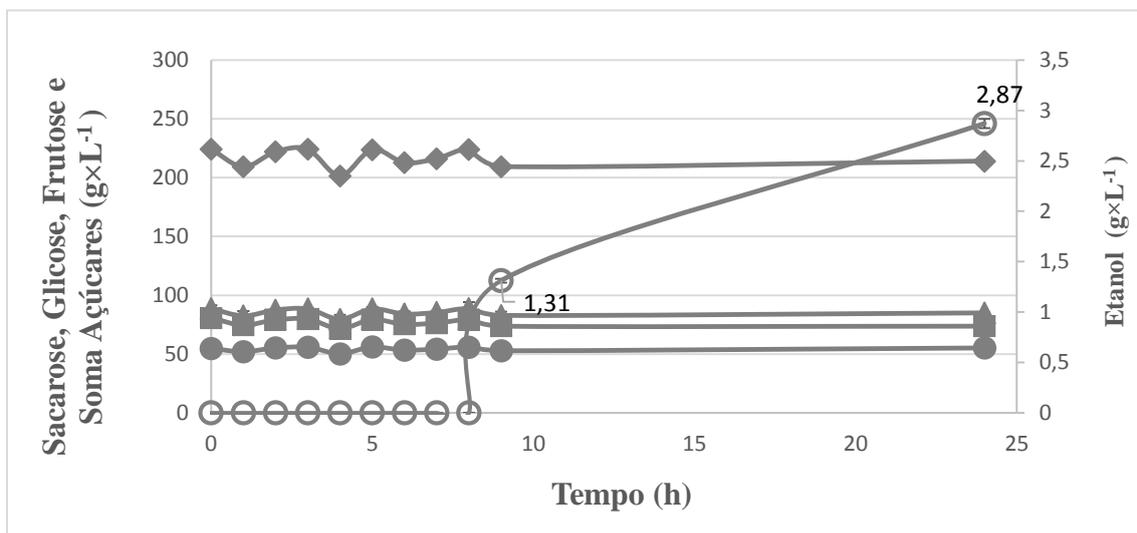
O perfil de hidrólise da sacarose no Gráfico 3 confirma a superioridade da *S. cerevisiae* CAT-1 em cultivos em mosto, em relação às outras duas leveduras testadas. Também há evidências de que a enzima apresenta característica de ser constitutiva pelo perfil decrescente da curva de sacarose mesmo com altas concentrações de glicose no meio o que poderia inibir a sua produção, bem como sua atividade.

Acredita-se que a linhagem CAT-1 tenha maior produção da enzima invertase, mesmo em condições de estresse como em pH 3,0 e sob alta pressão osmótica causada pela concentração de substrato do mosto a 22° Brix. De acordo com Basso et al. (2008)

*S. cerevisiae* CAT-1 por ser uma linhagem selecionada à partir da pressão seletiva do processo industrial, apresenta predominância nas dornas de fermentação, apresentando características essenciais para sua sobrevivência em condições de estresse celular. Entretanto *P. kudriavzevii* BB2 (Gráfico 4) e *S. cerevisiae* BB9 (Gráfico 5) não apresentaram hidrólise da sacarose perceptível nos resultados apresentados. Os perfis de sacarose das leveduras testadas se mantiveram constantes, provavelmente não apresentaram a mesma expressão da invertase como a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, não ocorrendo a hidrólise da sacarose disponível.

Verifica-se que no cultivo da *S. cerevisiae* CAT-1, (Gráfico 3) a metabolização da sacarose é maior que o consumo da levedura, gerando um acúmulo de substrato nos perfis da glicose e frutose. A hidrólise da sacarose em 2 h liberou surpreendentemente 38 g×L<sup>-1</sup> de substrato, sendo acumulado na forma de glicose (11g×L<sup>-1</sup>) e na forma de frutose (17,56 g×L<sup>-1</sup>). Um total de 9,5 g×L<sup>-1</sup> de substrato foi consumido pela levedura nesse período de 2 h de cultivo.

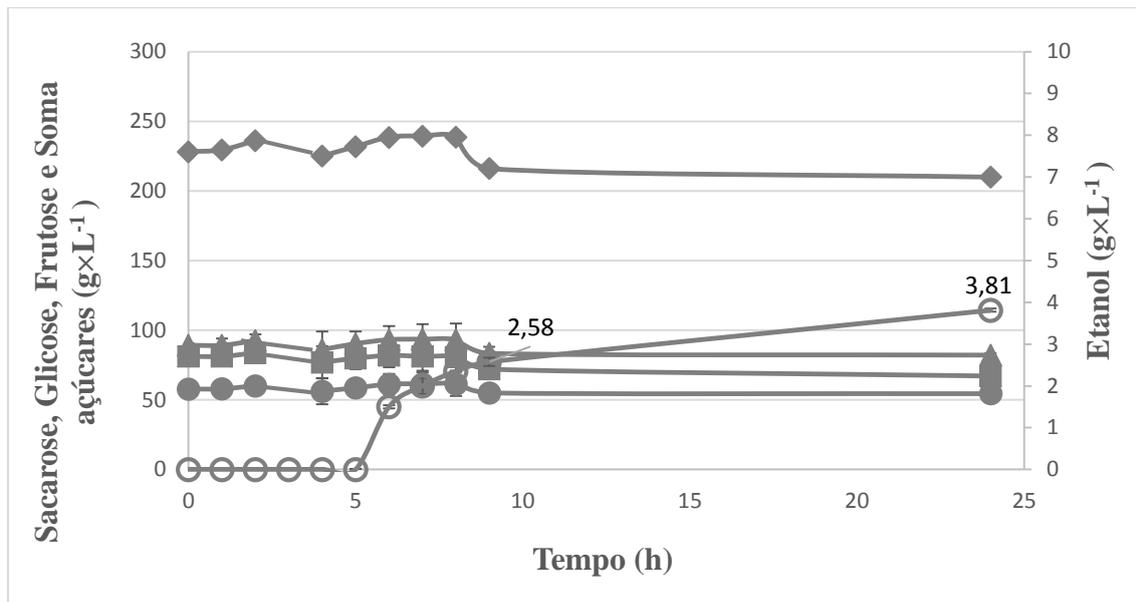
**Gráfico 4.** Consumo de açúcar e produção de etanol da *P. kudriavzevii* BB2 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo.



**Legenda:** Sacarose (●), glicose (■) frutose (▲) soma açúcares (◆), etanol (◊)

**Fonte:** O autor.

**Gráfico 5.** Consumo de açúcar e produção de etanol da *S. cerevisiae* BB9 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo.



**Legenda:** Sacarose (●), glicose (■) frutose (▲) soma açúcares (◆), etanol (◊).

**Fonte:** O autor.

A alta concentração de substrato no mosto à 22° Brix, acredita-se que esteja proporcionando um meio estressante as células, acarretando a queda da viabilidade e consequentemente baixo consumo. A *S. Cerevisiae* CAT-1 consumiu em 24 h de cultivo 45 g x L<sup>-1</sup> de substrato, ou seja 20% do total de substrato.

A *S. cerevisiae* CAT-1 iniciou a produção de etanol com 3 h de cultivo, produzindo 1,55 g x L<sup>-1</sup>, ao termino do cultivo com 24 h atingiu uma produção de 9,38 g x L<sup>-1</sup> de etanol (Gráfico 3). Quanto a formação de etanol a linhagem *S. cerevisiae* CAT-1 em mosto se destacou em relação às outras duas leveduras testadas, devido a maior taxa de conversão de substrato a etanol ( $Y_{Eth/S}$ ) (0,41 g Eth.g<sup>-1</sup> na Tabela 1).

O perfil cinético da *P.kudriavzevii* BB2 é um perfil praticamente constante das 3 fontes de carbono presente no mosto (Gráfico 6), com consumo de apenas 10,2 g x L<sup>-1</sup> de substrato durante as 24 h de cultivo. A produção de etanol iniciou após 9 h com 1,31 g x L<sup>-1</sup> e com 24 h produziu 2,87 g x L<sup>-1</sup> (Gráfico 4). Assim como observado no Gráfico 5 e 6 não foi possível verificar nenhuma alteração no perfil da sacarose pela levedura *S. cerevisiae* BB9, após o tempo de 24 h consumiu um total de 18,2 g x L<sup>-1</sup> de substrato. A *S. cerevisiae* BB9 produziu etanol a partir de 6 h de cultivo (1,50 g x L<sup>-1</sup>) e 3,81 g x L<sup>-1</sup> de etanol após 24 horas. Quando comparadas diferentes leveduras em mosto a base de caldo

de cana-de-açúcar, percebeu-se que *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou melhor eficiência na produção de etanol, com rápido e alto consumo de açúcar e uma produção superior de etanol relacionada a outras leveduras testadas (BATISTOTE et al., 2010).

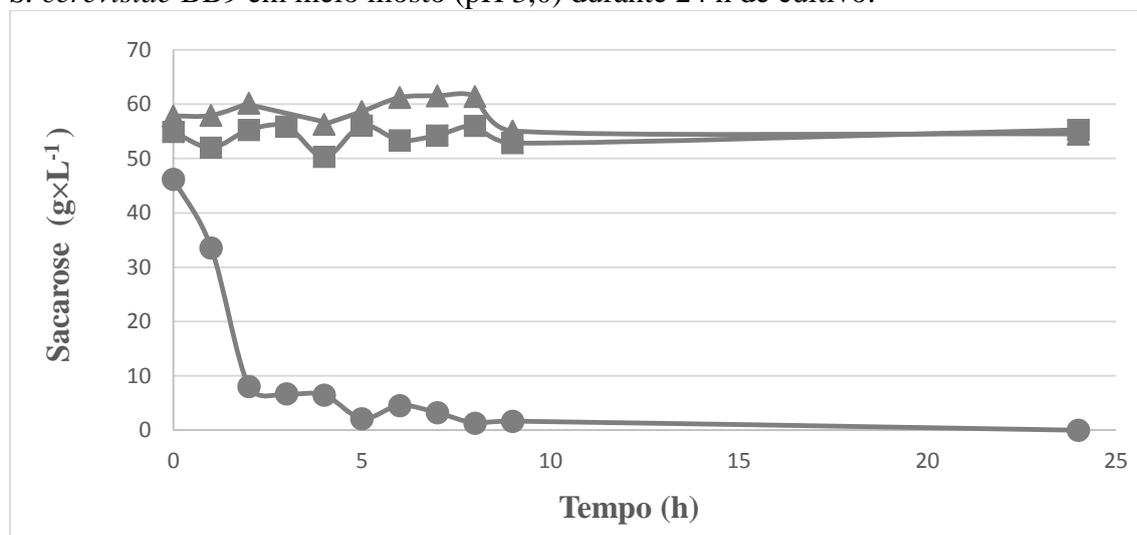
Os resultados obtidos permitiram concluir que as leveduras se comportam de maneiras diferentes em processos com meio laboratorial YEPD e processos que simulam o meio utilizado nas indústrias. Verificou-se que as três leveduras testadas apresentaram resultados semelhantes quanto a produção de etanol no meio YEPD (Gráfico 2), já em condições de estresse em meio mosto (pH 3,0 a 22° Brix) a levedura comercial *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou relevante diferencial devido à capacidade de hidrolisar a sacarose disponível no meio (Gráfico 3 e 6). Além disso apresentou maior consumo de açúcar e melhor produção de etanol em relação a *P. kudriavzevii* BB2 (Gráfico 4) e *S. cerevisiae* BB9 (Gráfico 5).

Takehige e Ouchi (1995) observaram em seu estudo que a produção de etanol por uma linhagem de levedura de laboratório foi menor que a levedura industrial, em um meio de melaço com alta concentração de açúcares. Entretanto, as duas leveduras produziram aproximadamente a mesma quantidade de etanol em meio YEPS com alta concentração de sacarose. A produtividade baixa da levedura de laboratório no melaço foi atribuída à limitação da hidrólise da sacarose devido a não ativação da enzima invertase.

O Gráfico 7 apresenta uma comparação entre os perfis das três leveduras testadas. Observa-se que os perfis não seguem o mesmo padrão de produção, as linhagens no mosto apresentaram produção de etanol inferior ao meio YEPD. As três leveduras no meio YEPD tiveram produções semelhantes, provavelmente devido as condições favoráveis oferecidas pelo meio para o desenvolvimento das leveduras. Verificou-se que a BB9 apresentou maior produção de etanol, cuja a linhagem é uma *Saccharomyces cerevisiae*. Já em condições de estresse em pH 3,0 e alta concentração de açúcar do mosto a *P. kudriavzevii* BB2 teve um desempenho inferior. Verifica-se que a BB9 embora seja uma *S. cerevisiae*, a mesma apresentou menor produção em relação a CAT-1 também *Saccharomyces cerevisiae* demonstrando grande diferença dessa espécie em condições diferentes de cultivo. Essa comparação é de suma importância pois demonstra que experimentos de comparação de linhagens conduzidos em bancada não reproduzem os mesmos perfis nas condições de processo industrial, uma linhagem que apresenta um desempenho superior em um experimento de bancada pode ser desastrosa quando inserida no processo.

Assim muitos artigos podem não condizer com a realidade quando as leveduras tidas como ótimas são transferidas para o processo. Takeshige e Ouchi (1995), relatam que linhagens laboratoriais de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas boas fermentadoras em meio nutritivos comerciais, no entanto, apresentaram baixa capacidade fermentativa em melação pobre. Possivelmente devido as linhagens laboratoriais serem mais sensíveis a certos fatores inibidores existentes no melação.

**Gráfico 6.** Perfil de consumo de sacarose da *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio mosto (pH 3,0) durante 24 h de cultivo.



**Legenda:** *S. cerevisiae* CAT-1 (●), *P. kudriavzevii* BB2 (■) e *S. cerevisiae* BB9 (▲)

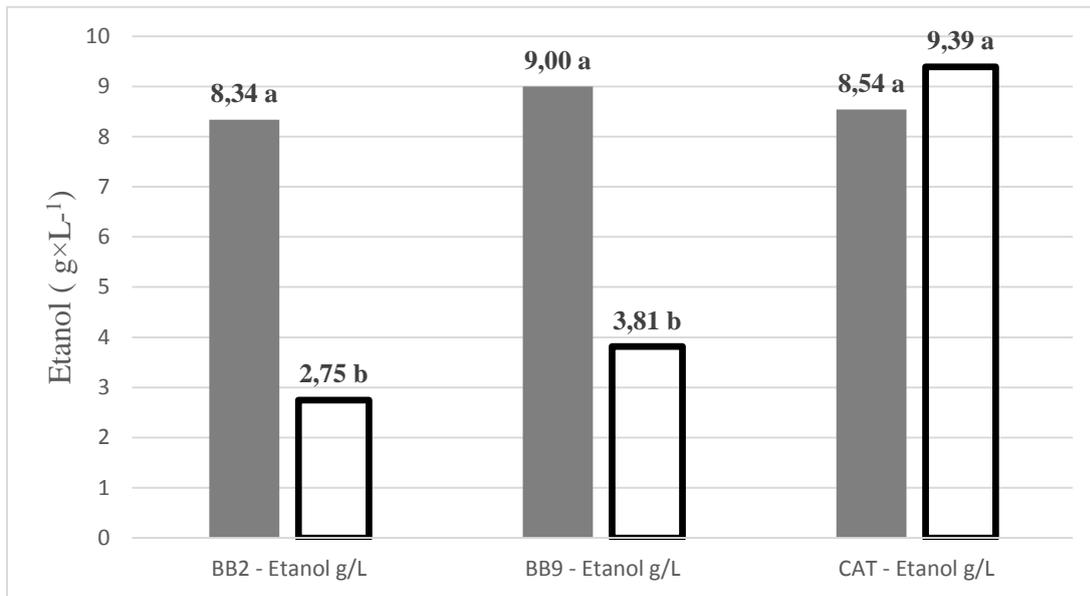
**Fonte:** O autor.

**Tabela 1.** Produtividade volumétrica de etanol com *S. cerevisiae* CAT-1, *P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 em meio laboratorial YEPD ( $20 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ) e meio mosto ( $200 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ) em pH 3,0 durante 9 e 24 horas.

Peth (gEth×L <sup>-1</sup> ×h <sup>-1</sup> )	Cultivos	Temp. (h)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
			CAT-1	BB2	BB9
	YEPD	9h	0,79	0,89	0,84
		24h	0,35	0,35	0,38
	Mosto	9h	0,47	0,14	0,26
		24h	0,41	0,11	0,16

**Fonte:** O autor.

**Gráfico 7.** Comparação entre meio YEPD e meio mosto quanto a produção de etanol em 24 horas.



**Legenda:** YEPD (■) ( $20 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  substrato); mosto (□) ( $200 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  substrato). Letras iguais na barra significa que não há diferença significativas entre as linhagens.

**Fonte:** O autor.

### 6.3. HIDRÓLISE DA SACAROSE DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO

A partir dos resultados obtidos com o meio mosto (Gráfico 3), verificou-se que no início dos cultivos a concentração de sacarose no mosto ( $22^\circ$  Brix, pH 3,0) apresentou-se menor do que as concentrações de glicose e frutose. Contudo era esperado uma maior concentração de sacarose em relação aos demais açúcares. Della-Bianca et al. (2013), por exemplo, reportaram que sacarose corresponde a 60% dos açúcares totais, enquanto glicose e frutose representam apenas 20% no melaço, sendo a mesma proporção encontrada no magma. Isto motivou uma investigação das concentrações do mosto em diferentes condições de pré-tratamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Avaliação da composição em termos de açúcares do mosto natural submetido a diferentes tratamentos.

Meios testados	Sacarose g×L <sup>-1</sup>	Glicose g×L <sup>-1</sup>	Frutose g×L <sup>-1</sup>
MN	126,52 (59,8%)	46,04 (21,7%)	39,10 (18,5%)
ME	130,76 (61,5%)	44,60 (21,0%)	37,09 (17,5%)
MA	124,99 (58,6%)	48,33 (22,7%)	39,90 (18,7%)
MEA 3,0	<b>34,50</b> (16,1%)	<b>87,09</b> (40,7%)	<b>92,44</b> (43,2%)
MEA 3,2	51,98 (24,2%)	79,54 (37,0%)	83,25 (38,8%)

**Legenda:** MN-Mosto natural, ME -Mosto esterilizado, MA-Mosto acidificado pH 3,0, MEA 3,0 -Mosto esterilizado e acidificado pH 3,0, MEA 3,2 - Mosto esterilizado e acidificado pH 3,2.

**Fonte:** O autor.

De acordo com os resultados da Tabela 2, verificou-se que conforme a concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> usado para ajustar o pH do meio, em conjunto com o calor e pressão da autoclave durante a esterilização, ocasionaram a quebra da sacarose gerando um aumento nas concentrações de glicose e frutose do meio. Isto desencadeou a quebra da sacarose, liberando glicose e frutose que por sua vez tiveram suas concentrações aumentadas. Percebe-se que este efeito foi maior com pH 3 (Tabela 2).

A esterilização e a acidificação sozinhos não foram suficientes para alterar a composição dos açúcares. É por isso que nos processos industriais esta mudança no perfil de açúcares não ocorre, pois não sofrem processo de esterilização.

#### 6.4. HIDRÓLISE DA SACAROSE DURANTE A FERMENTAÇÃO

Diante as linhagens estudadas, a *S. cerevisiae* CAT-1 foi a linhagem que apresentou expressiva hidrólise da sacarose presente no mosto. Buscou-se então entender o mecanismo adotado por esta linhagem para explicar este comportamento fisiológico. A levedura apresentou uma intensa quebra da sacarose antes de consumir a glicose livre no meio. Para entender essa opção metabólica adotada pela *S. cerevisiae* CAT-1 realizou se novos ensaios utilizando o meio mineral com as mesmas concentrações de açúcares do mosto em pH 3,0 e pH 5,0. O meio mineral foi preparado de maneira a reproduzir as concentrações de açúcares do mosto. Foi adotado um meio com composição conhecida para avaliar se a alta concentração de açúcar do meio mosto poderia influenciar na preferência da sacarose ou se outro composto presente no mosto estaria inibindo a *S. cerevisiae* CAT-1.

### 6.5. CULTIVO DE *S. cerevisiae* CAT-1 COM MOSTO A pH 3,0

O mosto natural apresentou pH 5,2-5,6. Para se obter o meio mosto em pH 3,0, utilizou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PA) para corrigir o pH. Verificou-se a hidrólise da sacarose, contudo com uma concentração de sacarose (46,19 g×L<sup>-1</sup>; Gráfico 3) um pouco acima daquela obtida na Tabela 2. Observou-se que a ação em conjunto do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com o calor e pressão exercidos no processo de esterilização ocasionaram a quebra da sacarose.

Embora a produção de etanol seja um processo bem conhecido, existem lacunas que ainda demandam de maior conhecimento do metabolismo dos microorganismos. Sendo assim, do ponto de vista industrial, entender o consumo simultâneo de açúcares por leveduras é altamente desejado, uma vez que diminui o tempo de processo e, conseqüentemente, aumenta a produtividade. Utilizou-se o meio mosto a base de caldo de cana cuja composição são misturas de carboidratos monossacarídeos (glicose e frutose) e dissacarídeo (sacarose), sendo de extrema importância a elucidação de seu metabolismo pela *S. cerevisiae* CAT-1 frente a diferentes condições de pH.

Observou-se que em apenas 2 h a concentração de sacarose foi reduzida de 46,19 g×L<sup>-1</sup> para 8,10 g×L<sup>-1</sup>. Esta expressiva metabolização de sacarose deu-se numa surpreendente taxa de 19 g×L<sup>-1</sup>×h<sup>-1</sup> (Gráfico 3) presumidamente devida à ação da enzima invertase expressa por *S. cerevisiae* CAT-1. Verificou-se a quebra da sacarose antes do consumo total da glicose livre no meio, indicando provavelmente a presença de genes responsáveis pela hidrólise da sacarose. Estudos mostram que o gene *SUC2* tem grande influência na metabolização da sacarose em leveduras, assim como observado por Fonseca et al.(2013).

*S. cerevisiae* apresentam duas vias de utilização de sacarose: a hidrólise extracelular predominantemente pela ação da invertase periplasmática extracelular, codificada pelo gene *SUC2*, liberando glicose e frutose que são captadas por difusão facilitada através de transportadores codificados por membros da família de genes HXT e outra envolvendo o transporte ativo da sacarose com a posterior hidrólise intracelular do açúcar (BASSO et al.,2011).

O gene *SUC* proporciona uma boa adaptação da célula à caldos ricos em sacarose assim como ao mosto a base de caldo de cana, pois codifica invertases funcionais para a hidrólise do dissacarídeo. *S. cerevisiae* CAT-1 contém apenas uma cópia de *SUC2* (MARQUES et al., 2015). Devido à regulação do gene *SUC2*, *S. cerevisiae* CAT-1 apresenta bom desempenho quanto à atividade de invertase, proporcionando eficiente

consumo de substratos mistos contendo sacarose, glicose e frutose (STAMBUK et al., 2009).

A possível ação da enzima invertase sobre a sacarose gerou um aumento na concentração da glicose de  $5,52 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{h}^{-1}$  e na frutose de  $8,76 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{h}^{-1}$  nestas 2 h de cultivo (Gráfico 3). O perfil cinético revela que a taxa de inversão da sacarose é maior que a taxa de consumo por *S.cerevisiae* CAT-1 devido ao acúmulo de substrato. Após o esgotamento da sacarose (9 h de cultivo), verificou-seo consumo um pouco mais acentuado de glicose e frutose (Gráfico 3). O transporte de glicose proveniente da quebra da sacarose ocorre utilizando o sistema de baixa afinidade, enquanto que a concentração de glicose livre é alta, provocando a repressão do consumo dos outros açúcares. Uma vez que a concentração de glicose atinge taxas menores, o sistema de alta afinidade provavelmente alivia a repressão sobre o transporte dos outros açúcares, permitindo o consumo de ambos os açúcares parcialmente reprimidos (FONSECA et al., 2013).

O pH ácido é importante para controlar a contaminação bacteriana no processo industrial. Embora o reciclo de células nas usinas reduza o pH de 2,0 a 3,0 pelo uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  por algumas horas, isso pode provocar distúrbios fisiológicos nas células, *e.g.* redução nos níveis de trealose, ocasionando a queda de viabilidade celular (Ferreira, Amorim e Basso, 1999), a exposição contínua do ácido às células em cultivos de até 48 h em pH 3,0 provocou danos a célula de *S. cerevisiae* CAT-1.

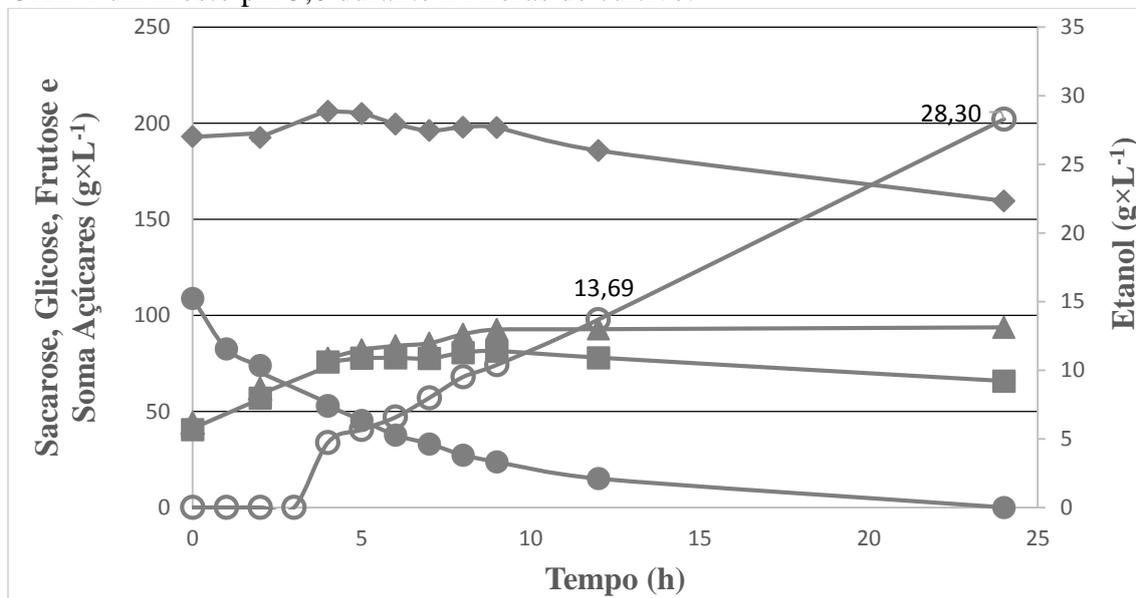
A produção de etanol deu-se após 3 h, alcançando  $9,39 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de etanol após 24 h de cultivo (Gráfico 3). Acredita-se que a situação estressante causada durante todo o cultivo tenha provocado alterações fisiológicas como queda na viabilidade, baixo consumo e reduzida taxa de produção de etanol. É possível que a junção de algum fator ainda desconhecido em sinergismo com o pH ácido tenha afetado significativamente a produção de etanol.

#### **6.5.1. CULTIVO DE *S. cerevisiae* CAT-1 COM MOSTO A pH 5,0**

Para se obter o meio mosto em pH 5,0, utilizou-se HCl (1M) para corrigir o pH. Verificou-se que a hidrólise da sacarose ocorreu a uma taxa mais baixa durante o pré-tratamento, tendo este açúcar iniciado o cultivo com  $108,70 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de sacarose devido o uso de um ácido de composição e concentração mais fraco (Gráfico 8). Essa quebra inferior se deve à menor redução de pH em relação ao pH do mosto natural, requerendo uma menor quantidade e concentração de um reagente mais fraco como o HCl (1M),

ocasionando menor reação de hidrólise durante a esterilização.

**Gráfico 8.** Cinética de consumo dos substratos e produção de etanol com a *S. cerevisiae* CAT-1 em mosto pH 5,0 durante 24 horas de cultivo.



**Legenda:** Sacarose (●), glicose (■) frutose (▲) soma dos açúcares (◆) etanol (○)

**Fonte:** O autor.

Neste estudo também se observou uma queda abrupta na concentração de sacarose do meio. Após apenas 1 h de cultivo a concentração deste açúcar foi reduzida em  $26 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ . Após 4 h de cultivo a queda da concentração de sacarose foi de  $56 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ , *i.e.*, 51% do conteúdo total foi metabolizado. Acredita-se que essa expressiva quebra da sacarose tenha ocorrido devido à presença de enzimas invertases. Por outro lado, observou-se um aumento de  $41 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  no conteúdo da glicose e  $48 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  de frutose em 9 h devido à quebra da sacarose, indicando que a taxa de consumo dos demais açúcares pela levedura é menor do que a metabolização da sacarose. Após 9 h de cultivo, com a redução da hidrólise da sacarose a valores de  $20 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ , glicose passou a ter um consumo preferencial em relação à frutose, que praticamente manteve sua concentração até o fim do cultivo (Gráfico 8).

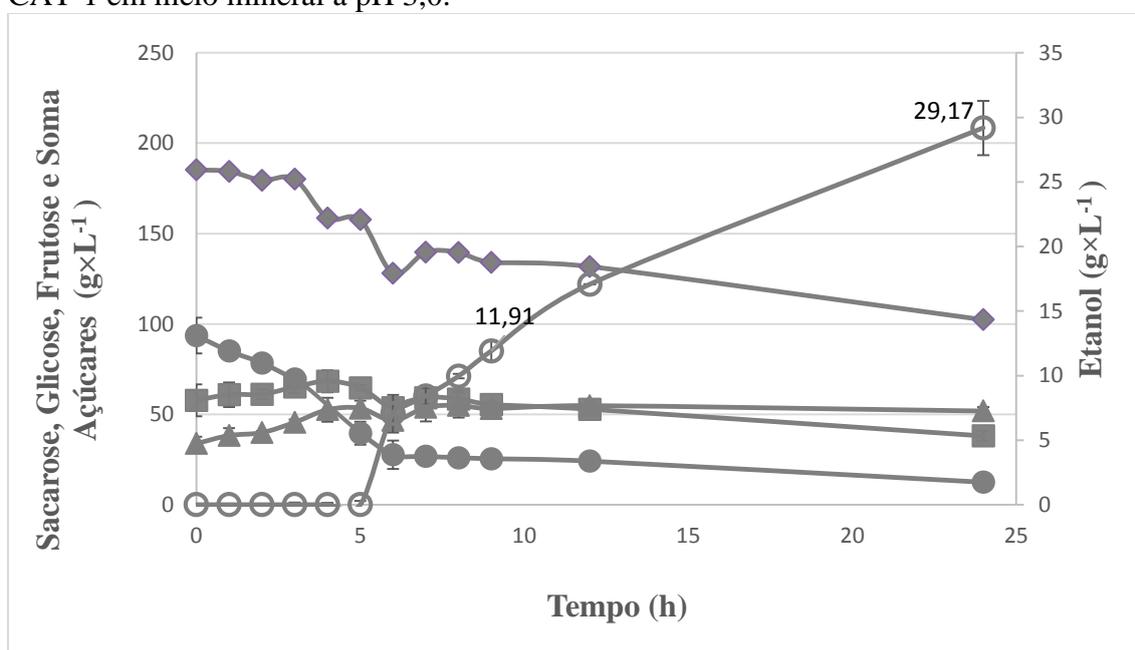
A produção de etanol teve início após 4 h, alcançando  $28,30 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  de etanol após as 24 h de cultivo. A levedura precisou de 1 h a mais em relação ao cultivo com mosto a pH 3,0 para se adaptar ao meio e iniciar a produção de etanol. Entretanto sua produção final de etanol foi 3 vezes maior do que a produção de etanol em mosto a pH 3,0. A melhor taxa de produção de etanol foi no período de 12 a 24 h, produzindo  $1,2 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$

de etanol (Gráfico 8).

### 6.5.2. CULTIVO DE *S. cerevisiae* CAT-1 COM MEIO MINERAL A pH 3,0

O meio mineral natural apresentou pH 4,0- 4,5. A correção do meio foi realizada com  $H_2SO_4$  (PA) para se obter o pH 3,0. Verificou-se uma menor hidrólise da sacarose no início do cultivo ( $93,57 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ; Gráfico 9) em relação a correção do mosto a pH 3,0 ( $46,19 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ; Gráfico 3). Essa menor quebra se deve a menor quantidade de ácido usada para se obter o pH 3,0 no meio mineral natural. Confirma-se novamente a ação exercida pelo  $H_2SO_4$  com o calor e pressão no processo de esterilização ocasionaram a quebra da sacarose durante o pré-tratamento. Assim como demonstrou o teste MEA 3,2 na Tabela 2, o uso de uma concentração menor de ácido provocou menor reação de hidrólise da sacarose durante a esterilização.

**Gráfico 9.** Cinética de consumo dos substratos e produção de etanol com a *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mineral a pH 3,0.



**Legenda:** Sacarose (●), glicose (■) frutose (▲) soma dos açúcares (◆) e produção de etanol (◊) durante 24 horas de cultivo.

**Fonte:** O autor.

Observou-se em 5 h a hidrólise de  $54 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de sacarose, *i.e.*, 57% do conteúdo total foi metabolizado. Liberando  $10,8 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{h}^{-1}$  de açúcar para consumo. No mesmo período, ocorreu um aumento de  $7 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de glicose e  $19,5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de frutose. Confirmando o dado que a quebra da sacarose ocorre em uma velocidade maior que o consumo da levedura. No presente cultivo verificou-se maior consumo do substrato em relação ao meio mosto em pH 3,0 e 5,0, devido os menores valores de glicose e frutose acumulados durante o cultivo. O aumento da frutose até 12 h de cultivo provém da quebra da sacarose. Após 24 h quando a concentração de glicose é reduzida a  $38 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ , a frutose passa a ser consumida, indicando uma preferência pela glicose, conforme reportado na literatura (FONSECA et al., 2013).

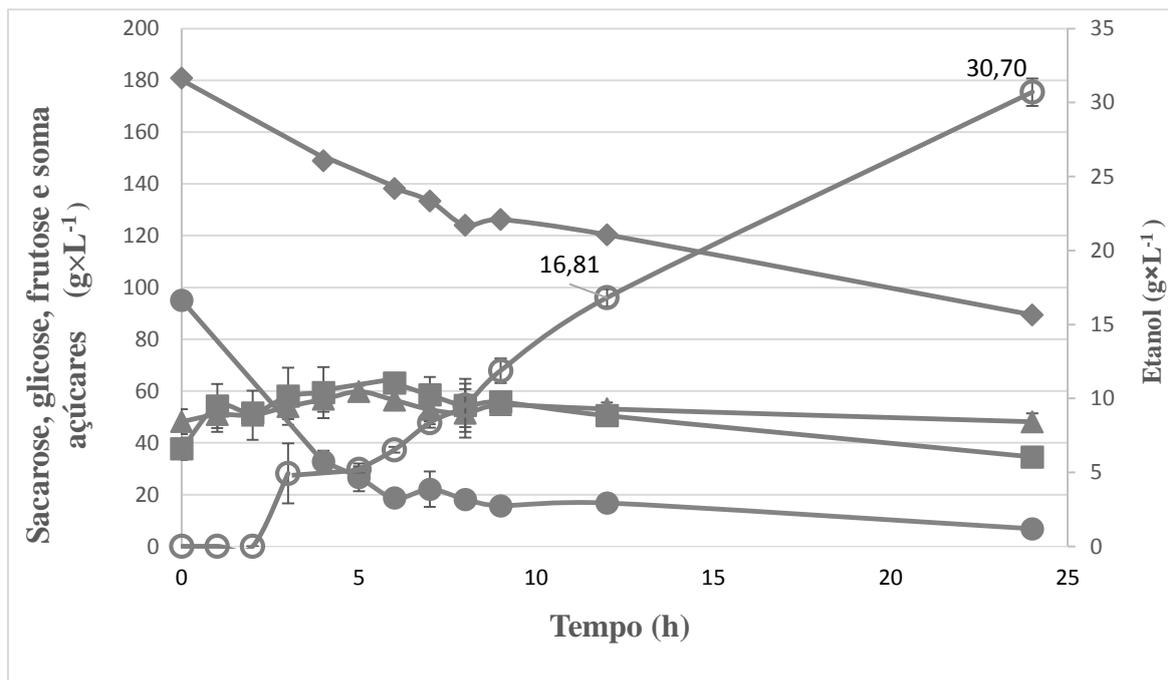
A produção de etanol iniciou após 3 h, gerando  $29,17 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de etanol em 24 horas. A melhor produção ocorreu no período de 6 a 9 h, produzindo  $1,94 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{h}^{-1}$  de etanol (Gráfico 9).

### **6.5.3. CULTIVO DE *S. cerevisiae* CAT-1 COM MEIO MINERAL A pH 5,0**

A correção do meio mineral pH 5,0 foi realizada com NaOH (1 mol), iniciando o cultivo com  $95 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de sacarose conforme Gráfico 10. Verificou-se que após 6 h de cultivo a concentração de sacarose foi reduzida de  $95 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  para  $18,69 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ . A sacarose. No mesmo período observou-se aumento na concentração de glicose e frutose, devido a hidrólise da sacarose. Presume-se que essa rápida hidrólise da sacarose seja devido a alta atividade de invertase. Observou-se queda nos valores de glicose e frutose assim que os valores de sacarose chegam próximos a  $15 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  no tempo de 9 horas. Após a queda nos valores de sacarose, a levedura apresentou consumo de  $21 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de glicose e apenas  $6 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$  de frutose de 9 a 24 h (Gráfico 10).

A produção de etanol iniciou após 3 h, gerando um total de  $30,70\text{g}\times\text{L}^{-1}$  em 24 h de cultivo, sendo este o maior valor quanto a produção de etanol em relação aos outros cultivos (Gráfico 10). Sua melhor produção foi em 9 h de cultivo ( $2,35 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{h}^{-1}$  de etanol).

**Gráfico 10.** Cinética de consumo dos substratos e produção de etanol com a *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mineral a pH 5,0 durante 24 horas de cultivo.



**Legenda:** Sacarose (●), glicose (■) frutose (▲) soma dos açúcares (◆) etanol (◐).

**Fonte:** O autor.

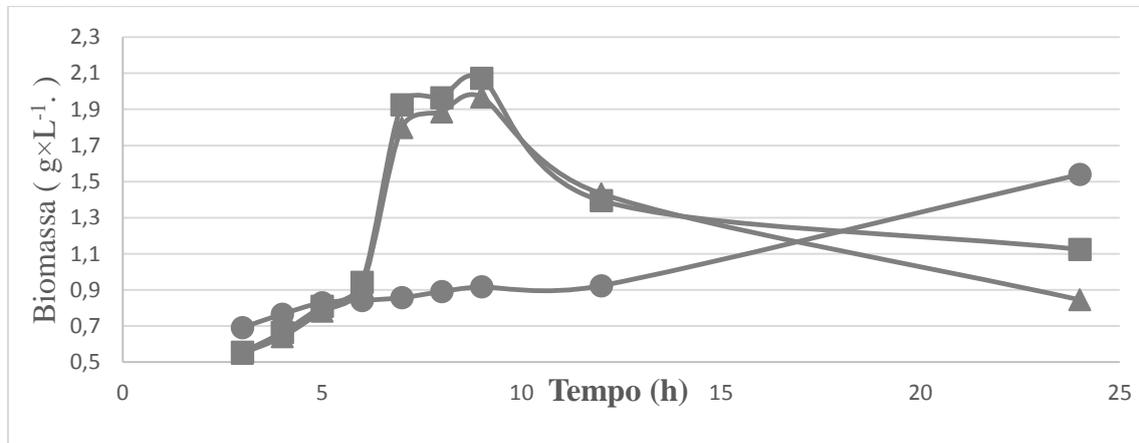
## 6.6. PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. cerevisiae* CAT-1 A PARTIR DE MEIO MINERAL A pH 3,0 - 5,0 E MOSTO A pH 5,0

O catabolismo dos substratos pela *S. cerevisiae* pode se dar pela via aeróbia e anaeróbia. Verifica-se que em leveduras, mesmo na presença de oxigênio, a via anaeróbia também pode ser escolhida. De acordo com os resultados baixos de biomassa presume-se que a escolha foi a fermentação. O processo de fermentação provoca aumento do consumo de energia para manutenção e desvio de carbono para formação de metabolitos como etanol. Mesmo na presença de oxigênio a fermentação pode ser adotada pela *S. cerevisiae* devido a inibição da respiração pela alta concentração de glicose. A glicose reprime a expressão dos genes que codificam as enzimas do ciclo de krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais, e induzem a expressão de genes envolvidos no metabolismo fermentativo (ESPIRITO-SANTO, 2012).

Os cultivos realizados apresentaram significativas alterações quanto a produção de biomassa, verificou-se que o meio mineral apresentou maior produção em menor

tempo de cultivo em relação ao meio mosto (Gráfico 11).

**Gráfico 11.** Perfil de produção de biomassa da *S. cerevisiae* CAT-1 no período de 3 a 24 h de cultivo.



**Legenda:** Biomassa ( $\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ) no cultivo em mosto a pH 5,0 (●), biomassa ( $\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ) no cultivo em meio mineral a pH 5,0, (■), biomassa ( $\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ) no cultivo em meio mineral a pH 3,0 (▲)

**Fonte:** O autor.

O meio mineral a pH 5,0 produziu maior valor de biomassa ( $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ) após 9 h de cultivo, no mesmo período o mosto a pH 5,0 produziu somente  $0,90 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ . Acredita-se que o meio mineral por ser um meio definido, apresenta composição mais rica de nutrientes favorecendo um melhor desenvolvimento da levedura. Estudos mostram que compostos nitrogenados são importantes para o sucesso e conclusão dos processos de fermentação industrial garantindo qualidade na produção de etanol. As deficiências de nitrogênio foram identificadas como uma das principais causas de fermentações paralisadas (MIRANDA Jr. et al.; 2009).

Presume-se que a produção de metabólitos e alta taxa de etanol, após 9h de cultivo, tenha desestruturado a estrutura e metabolismo da levedura, provocando queda na viabilidade das leveduras nos meios minerais pH 3,0 e 5,0. Devido o meio mineral apresentar em sua composição componentes nitrogenados, potássio, magnésio e vitaminas como a biotina, e tiamina. Acredita-se que esses componentes sejam de extrema importância nutricional para o desenvolvimento da levedura, favorecendo o cultivo para uma melhor produção de biomassa. Embora o mosto a base de caldo de cana seja um meio muito utilizado nos processos industriais, sabe-se que este apresenta baixa taxa nutricional com somente 0,5 e 1% de componentes nitrogenados, sua utilização se deve

ao seu baixo valor.

O mosto pH 5,0 apresentou fase de adaptação maior e menores valores de biomassa em relação ao meio mineral. Em 12 h de cultivo o mosto produziu  $0,92 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$  de biomassa enquanto os cultivos com meio mineral chegaram no mesmo valor em 6 h (Gráfico 11). O cultivo com mosto apresentou queda na produção de biomassa (Gráfico 11) e de etanol (Gráfico 8) após 24 h de cultivo. Possivelmente ocasionada pela alta concentração de etanol e outros metabólitos no meio, agindo como fator estressante sobre a levedura (Gráfico 11). Já no meio mineral reduziu a produção de biomassa após 9 h, correspondentemente no mesmo período de melhor produção de etanol (Gráficos 10 e 11). Demonstrando perda de viabilidade da levedura possivelmente devido ao aumento das concentrações de etanol.

O estresse com etanol inibe o sistema de transporte de aminoácidos e glicose e pode levar à perda da viabilidade celular e à inibição de crescimento celular (SOUZA, 2009). A fluidez da membrana, que está relacionada com a sua composição lipídica, é profundamente alterada na presença de etanol e, como resultado, a permeabilidade da membrana para alguns íons (especialmente íons  $\text{H}^+$ ) são significativamente afetados (BASSO et al.; 2011). Além de afetar a composição da membrana de levedura, o etanol afeta a fisiologia da levedura inibindo seu crescimento, ocasiona a inativação enzimática, o que leva a uma viabilidade celular diminuída.

Assim como confirma Camilios Neto et al. (2005), baixa concentração de nitrogênio no meio proporciona queda na concentração de biomassa. De acordo com os cultivos realizados por Fonseca et al. (2013), meios com baixa concentração de nutrientes apresentam crescimento limitado e baixo rendimento de biomassa no substrato. O reciclo de células durante o processo industrial ocasiona um aumento de células mortas que servem como fonte de alimento enriquecendo o meio fermentativo liberando aminoácidos, vitaminas e minerais, no presente trabalho o mosto não foi complementado nutricionalmente.

## **6.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INVERTASE NAS CÉLULAS**

Após os cultivos com a *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mineral e mosto a pH 3,0 e 5,0. Verificou-se que independente do meio e do pH adotado a levedura apresentou expressiva capacidade em hidrolisar a sacarose. Presume-se que esta quebra esteja

ocorrendo devido a expressão de enzimas invertases pela levedura. Assim como relatam Marques et al. (2017), que a linhagem das *Saccharomyces cerevisiae* apresentam como característica fisiológica a produção de enzimas invertases capazes de hidrolisar a sacarose presente no mosto liberando glicose e frutose para consumo da levedura.

Sendo assim, a partir desses resultados com intensa quebra de sacarose realizou-se o cultivo com o meio mineral a pH 5,0, com a *S. cerevisiae* CAT-1, com o intuito de comprovar a presença da enzima invertase e quanto sua natureza. Utilizou-se as 3 fontes de carbono presentes no mosto natural em diferentes concentrações, sacarose ( $122 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ), glicose ( $51 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e sacarose, glicose e frutose ( $211 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ).

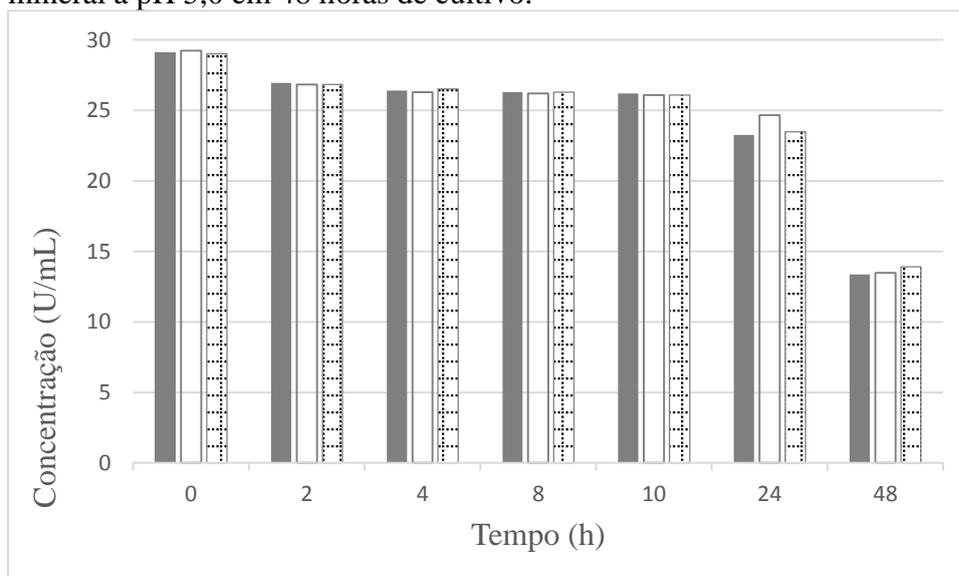
A *S. cerevisiae* CAT-1 produziu a mesma quantidade de enzima com as 3 fontes de carbono testadas e em diferentes concentrações de açúcar. Sendo assim o ensaio comprova a presença da enzima invertase e de acordo com a dosagem das enzimas os valores iguais em diferentes fontes de carbono, demonstram a presença de enzima constitutiva (Gráfico 13). Assim como Trujillo et al. (2009) verificaram a presença de invertase constitutiva em fungos *Aspergillus* diante de diferentes fontes de carbono. Enzimas constitutivas são produzidas continuamente por microrganismos, seja eles fungos filamentosos ou leveduriformes, independentemente da presença de substrato são produzidas em quantidades constantes sem ter em conta a exigência fisiológica ou a concentração do substrato. Elas são sintetizadas continuamente porque seu papel na manutenção dos processos celulares ou estrutural são indispensáveis (LI et al., 2013).

A *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou como característica a produção de enzimas invertases e essas de natureza constitutiva. Esses resultados quanto a presença da enzima e sua natureza, explicam a quebra da sacarose, independente da presença de glicose ao livre presente no meio durante os experimentos. Isso deve-se ao fato desta linhagem apresentar enzimas constitutivas, onde independente do açúcar disponível o microrganismo irá produzir enzimas capazes de trabalhar na quebra da sacarose presente no meio reacional, liberando monossacarídeos (glicose e frutose), para o consumo da levedura. A *S. cerevisiae* CAT-1 por apresentar invertase constitutiva, pode ser um dos motivos que garantem a superioridade da levedura industrial nas destilarias, onde as invertases provenientes da *S. cerevisiae* CAT-1 hidrolisam rapidamente a sacarose em glicose e frutose, disponibilizando estes açúcares para o consumo da levedura, acelerando o processo fermentativo para produção de etanol.

A *S. cerevisiae* apresenta alta atividade invertase e também vários *loci SUC* no genoma, quando expostas a meios de culturas onde a sacarose é o principal açúcar a ser

fermentado (mosto), o gene *SUC2* está presente em todas as leveduras do gênero *Saccharomyces* (STAMBUK et al., 2009). Essa rápida hidrólise da sacarose provocada seja pela enzima invertase ou pela ação do gene *SUC2*, libera grande quantidade de glicose e frutose no meio, podendo favorecer o desenvolvimento de outras leveduras que não possui invertase, inclusive linhagens contaminantes. Entretanto estudos demonstram que devido as condições estressantes existentes no processo industrial, a *S. cerevisiae* CAT-1 ainda é a levedura mais utilizada e mais preparada para o uso em grande escala na produção de etanol industrial. Esse aumento de monossacarídeos livres no meio pode provocar alterações na expressão gênica das células de outras *S. cerevisiae* devido a alterações no equilíbrio osmótico do meio, ocasionado pelas altas concentrações de glicose e frutose geradas (VERSTREPEN et al., 2004).

**Gráfico 12.** Produção de enzima invertase pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em meio mineral a pH 5,0 em 48 horas de cultivo.



**Legenda:** Sacarose, glicose e frutose (■); sacarose (□) e glicose (#)

**Fonte:** O autor.

A *S. cerevisiae* CAT-1 produziu inicialmente 29 U/mL de invertase nas 3 condições de substrato (Gráfico 13). A levedura indiferente a fonte de carbono oferecida, por ser constitutiva, produz enzimas para degradação da sacarose. Durante as 24 h de cultivo a produção enzimática manteve-se constante, após 48 h de cultivo a produção reduziu para 13 U/mL com as 3 fontes de carbono (Gráfico 13), esse fato pode ocorrer pela inibição do metabolismo da levedura ou pela presença de outros compostos, como a

presença de etanol presentes no meio devido o tempo de reação. A presença de etanol no meio, desnatura a proteína.

No entanto, o que faz a linhagem *S. cerevisiae* CAT-1 bem adaptada às rigorosas condições de usina e garante sua maior dominância e persistência em relação a outras leveduras, são questões ainda não totalmente compreendidas (DELLA BIANCA et al., 2013).

## 7. CONCLUSÃO

*P. kudriavzevii* BB2 e *S. cerevisiae* BB9 não apresentaram potencial industrial para a produção de etanol de acordo com os resultados em mosto similar ao adotado na indústria, atribuído à limitação da hidrólise da sacarose devido não ativação da enzima invertase. *S. cerevisiae* CAT-1 teve melhor desempenho fermentativo diante das outras leveduras testadas. Esta apresentou melhor produção de etanol e características fisiológicas que garantiram um bom desempenho diante de aspectos estressantes.

*S. cerevisiae* CAT-1 apresentou baixa produção de etanol em meio mosto pH 3,0, devido a composição do mosto e fatores estressantes, inibindo a levedura. Os resultados foram melhores quanto a produção de etanol em meio mosto pH 5,0. Acredita-se que se deve a menor condição estressante provocada a levedura nessas condições de pH. Já os resultados com os meios minerais mostraram boa adaptação fermentativa seja ela em pH 3,0 estressante, seja ela pH 5,0 padrão, se deve a composição do meio mineral que proporcionou maior resistência a levedura durante o cultivo.

A taxa de produção de invertase foi igual diante das 3 fontes de carbono testadas a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou a mesma produção de enzima. Ou seja os resultados demonstraram que indiferente ao substrato presente a levedura produziu a enzima invertase responsável pela degradação de sacarose presente no meio. Essa ação é característica a enzima constitutiva.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABREU-CAVALHEIRO A; MONTEIRO G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.44, n. (3), p. 665-671, 2013.
- ANDJELKOVICA, U.; PICURIĆB, S., VUJČIĆC, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. (3), p. 799-804, 2010.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol-Brasil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 195-200, 2007.
- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG C.; ANDRIETTA M. G. S.; Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3002–3008, 2008.
- ARAQUE E.; PARRA C.; RODRIGUEZ M.; FREER J.; BAEZA L.; Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43 p.120–123, 2008.
- BABRZADEH, F.; JALILI R.; WANG C.; SHOKRALLA S.; PIERCE S.; ROBINSON-MOSHER A.; NYREN P.; SHAFER R. W.; BASSO L. C.; AMORIM H. V.; OLIVEIRA A. J.; DAVIS R. W.; RONAGHI M.; GHARIZADEH B.; STAMBUK B. U.; Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, p.485–494, 2012.
- BARBOSA, P. M. G.; **Produção de Invertases por Leveduras Isoladas no Centro-Oeste Brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Grande Dourados- MS/ 2015.
- BASSO, T. O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MULLER, G.; SHLOLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, JEAN-MARC; GOMBERT, A.K.; van MARIS, A. J.A; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U.; Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 694-703, 2011.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croatia: INTECH, chap. 5, p. 85-100, 2011.
- BASSO, L. C.; de AMORIM, H. V., de OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research** v.8, p.1155-1163, 2008.
- BATISTOTE, M.; CARDOSO C.A.L.; RAMOS D.D.; ERNANDES J.R.; Desempenho

de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana-de-açúcar. **Ciência e Natura**, v.32, n (2), p. 83-95, 2010.

BORTOLI, D. A. S.; SANTOS, F.; STOCCO, N. M.; ORELLI, J. A.; TOM, A.; NEME, F. F.; DEFAVARI, D. N. Multiplicação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, ano 3, n. (2), p. 50-68, 2013.

BROWN, N. A.; DE CASTRO, P. A.; FIGUEIREDO, B. DE C. P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M. S.; LOPES, M. L.; PAULLILO, S. C. DE L.; BORGES, E. P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H.; Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. (13), p.277–290, 2013.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L.; Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**. v.2, n.(1), p. 27-37, 2011.

CAMARGO, J. Z.; **Estudo da Fisiologia de Diferentes Leveduras Industriais e Isoladas na Região Centro-Oeste**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.

CAMILIOS NETO, D.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; OLIVEIRA, M. R.; Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-açúcar. **Ciências, exatas e tecnológicas**, v. 26, n.(1), p. 17-22, 2005.

CONAB- **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 2 - Safra 2015/16, n. 3 - terceiro levantamento, Brasília, p. 1-65, dezembro 2015.

CUNHA, J.T; AGUIAR T.Q.; ROMANÍ A.; OLIVEIRA C.; DOMINGUES L.; Contribution of PRS3, RPB4 and ZWF1 to the resistance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors. **Bioresource Technology**, v.191, p. 7–16, 2015.

DÁRIO, M.G.; MACHADO, L.O.; SCHLOGL, P.S.; STAMBUK, B.U. Fermentação de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas no gene *SUC2*. **ANAIS**. 54º Congresso Brasileiro de Genética. 2008.

DELLA-BIANCA B., E.; BASSO T. O.; STAMBUK B., U.; BASSO L., C.; GOMBERTA., K.; What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 979–991, 2013.

ESPIRITO-SANTO, J. C. A. do; **Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes *SUC2* e *AGT1* em linhagens diploides de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado Instituto Ciências Biomédicas) Universidade de São Paulo, 2012.

FERREIRA, L. V.; AMORIM H. V.; BASSO, L. C.; Fermentação de trealose e glicogênio endógeno sem *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de**

**Alimentos**, v.19, n.(1), p.15, 1999.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C.; Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v.32, p. 623-638, 2009.

FIGUEIREDO, C. M.; **Análise molecular da flocculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**.  
Dissertação (Mestrado Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

FONSECA, G. G.; DE CARVALHO, N. M. B.; GOMBERT, A. K; Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n.(11), p. 5055–5067, 2013.

FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P.; Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 2, p. 29- 37, 2013.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J.; Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production, **International Sugar Journal**, v. 110, n.(1311), p.175-181, 2008.

GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. JA.; Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v.33, p. 81–86, 2015.

GUIMARÃES, L.T.; TURETTA, A. P. D.; COUTINHO, H.L.C.; Uma proposta para avaliar a sustentabilidade da expansão do cultivo da cana-de açúcar no estado do Mato Grosso do Sul. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v.22, n.(2), p. 313- 327, 2010.

LEITE, R. C. DE C.; LEAL, M. R. L.V.; O Biocombustível no Brasil, **Novos Estudos**, v.78, 2007.

LI B.; LIU H.; ZHANG Y.; KANG T.; ZHANG L.; TONG J.; XIAO L.; ZHANG H.; Constitutive expression of cell wall invertase genes increases grain yield and starch content in maize. **Plant Biotechnology Journal** v. 11, pag. 1080–1091, 2013.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v.3, p.1-593, 2001.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F.; Quantificação da flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.(1), p. 63-68, 2001.

MACEDO, I. C., The current situation and prospects for ethanol. **Estudos Avançados**, v. 2, n.(59), p.157-165, 2007.

MARQUES, W. L.; RAGHAVENDRAN, V.; STAMBUK, B. U.; GOMBERT, A. K.;

- Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, p. 107, 2015.
- MARQUES, W. L.; MANS, R.; MARELLA, E. R.; CORDEIRO, R. L.; BROEK, M. VAN DEN; DARAN, J. G.; PRONK, J. T.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, J. A.; **Elimination of sucrose transport and hydrolysis in *Saccharomyces cerevisiae*: a platform strain for engineering sucrose metabolism.** *FEMS Yeast Research*, v.17, n° 1, 2017.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MIRANDA JÚNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R.; **Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources.** *Journal of the Institute of Brewing*, v.115, n(3), p. 191–197, 2009.
- MOREIRA, B. L. D.; PARAZZI C.; PAPIN L. F.; LOPES J. J. C.; Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica; **Bioscience Journal**, v 29, p. 1672-1677, 2013.
- MORENO, S.; SANCHEZ, Y.; RODRIGUEZ, L. Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*, **Biochemistry Journal**, v.267, p. 697-702, 1990.
- MULLER, G. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*, visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil.** Tese (Doutorado- Bioquímica) Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; CONSOLI, M.; O mapa sucroenergético do Brasil. Etanol e Bioeletricidade A cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. **UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar**, p.14-43, 2010.
- NOBRE, T. de P.; **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** Dissertação (mestrado Ciências), Universidade Luiz de Queiroz, São Paulo, 2005.
- PACHECO, T. F.; **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Dissertação (mestrado Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- PRADO, J. L.; **Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica.** Dissertação (mestrado em Energia na Agricultura), Universidade Estadual Paulista - Botucatu, 2014.
- QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; BHUTTO, M. A.; DAHOT, M. U.; IKRAM-UL-HAQ; BANO, S.; IQBAL, H.; Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophyllus* EFRL 03. **African Journal of Microbiology**, v. 11, p. 10736-10743, 2012.

ROMANI, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 150–158, 2015.

SANTOS, E.F.S., SCHAUTZ, L.C.A., CARDOSO, C.A.L., ERNANDES, J.R., BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras indústrias. **Ciência e Natura**, v. 2, p. 009-014, 2013.

SILVA, R. O.; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P.; Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. (3), p. 22-27, 2011.

SOUZA, C. S.; **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem *S. cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.

STAMBUK, B. U.; DUNN, B.; ALVES JR., S. L.; DUVAL, E. H.; SHERLOCK, G.; Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2009.

STECKELBERG, C.; **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade estadual de Campinas, 2001.

STROPPA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, ANA LUÍZA F. De F.; CASTRO, C. C.; Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência Agrotécnica**, v.33, p.1978-1983, 2009.

TAKESHIGE K.; OUCHI K.; Factors Affecting the Ethanol Productivity of Yeast in Molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 79, n (5), p. 449-452, 1995.

TRUJILLO, A. M.; ARANDA J. S.; SANCHEZ C. G.; AGUILAR B. T.; OSORIO G. A.; Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *aspergillus flavipes* fp-500 and their modulation by ph and carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 40, p. 40-47, 2009.

WANG, L.; ZHAO, XIN-QING; XUEL, C.; BAIL, FENG-WU; Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 133, 2013.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration an alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501-517, 1992.

VERSTREPEN, K. J.; ISERENTANT, D.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J.; PRETORIUS, I. S.; THEVELEIN, J. M.;

DELVAUX, F. R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?  
**Trends Biotechnol**, v. 22, p. 531-537, 2004.

ZABED, H.; FARUQ, G.; SAHU, J. N.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; BOYCE, A.  
N.; Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice, **Scientific World Journal**, v.  
2014, p.11, 2014.