

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Otimização da produção de etanol a 42°C utilizando  
uma co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia*  
*kudriavzevii* em batelada alimentada

**JÉSSICA CAROLINA MEDINA GALLARDO**

Tese de Doutorado  
2014



**Instituto de Química**

JÉSSICA CAROLINA MEDINA GALLARDO

Otimização da produção de etanol a 42°C utilizando uma  
co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia*  
*kudriavzevii* em batelada alimentada

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Laluce

Araraquara  
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

G163o	<p>Gallardo, Jéssica Carolina Medina</p> <p>Otimização da produção de etanol a 42°C utilizando uma co-cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Picchia kudriavzevii</i> em batelada alimentada / Jéssica Carolina Medina Gallardo – Araraquara : [s.n], 2014</p> <p>112 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Cecilia Laluce</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Etanol. 3. Melaço. 4. Levedos. 5. Altas temperaturas. I. Título.</p>
-------	---

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Jéssica Carolina Medina Gallardo

**Nome em citações bibliográficas:** GALLARDO, J. C. M.

**Nacionalidade:** Peruana

**Sexo:** Feminino

**Nascimento:** 21/11/1985 – Arequipa - Perú

**Endereço profissional:**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisco Degni nº55

Quitandinha - Araraquara

14800-900, SP - Brasil

**Endereço eletrônico:** [jmedina@iq.unesp.br](mailto:jmedina@iq.unesp.br)

---

### Formação acadêmica/titulação

- 2010 - atual**      Doutoranda em Biotecnologia.  
Instituto de Química-Universidade Estadual Paulista, IQ-UNESP, Brasil  
Orientadora: Cecilia Laluce  
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- 2008 - 2010**      Mestrado em Biotecnologia.  
Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, IQ-UNESP, Brasil  
Título: Produção de etanol a 40-42°C em uma co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis*, Ano de obtenção: 2010.  
Orientadora: Cecilia Laluce  
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- 2003 - 2007**      Graduação em Ingeniería Biotecnológica.  
Universidad Católica de Santa María, UCSM, Arequipa-Perú.
- 

### Formação complementar

- 2013 - 2013**      Curso de curta duração em Planejamento de Experimentos em Bioprocessos. (Carga horária: 6h).  
XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, Brasil.
- 2011 - 2011**      Curso de curta duração em Operação e instalação básica do Sistema HPLC. (Carga horária: 17h).  
Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.
- 2008 - 2008**      Curso de curta duração em Análise Sensorial. (Carga horária: 24h).  
Instituto de Química - Universidade de São Paulo, IQ-USP, Brasil
- 2008 - 2008**      Curso de curta duração em Biocombustíveis. (Carga horária: 32h).  
Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, IQ-UNESP, Brasil

<b>2007 - 2007</b>	Curso de curta duração em Matemática para Ingenieros Biotecnólogos. (Carga horária: 24h). Universidad Católica de Santa María, UCSM, Perú
<b>2007 - 2007</b>	Curso de curta duração em Planeamiento Estratégico en la Industria Biotecnológica. (Carga horária: 30h). Universidad Católica de Santa María, UCSM, Perú
<b>2007 - 2007</b>	Curso de curta duração em Taller de Espectroscopia UV-Visible. (Carga horária: 30h). Universidad Católica de Santa María, UCSM, Perú
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Ingles Técnico I. (Carga horária: 24h). Universidad Católica de Santa María, UCSM, Perú
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Taller de Evaluación de Impacto Ambiental. (Carga horária: 30h). Universidad Católica de Santa María, UCSM, Perú
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Biotecnología Vegetal. (Carga horária: 36h). Universidad Católica de Santa María, UCSM, Perú

---

### Atuação profissional

- Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista - IQ-UNESP**

**2010 - Atual** Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Doutoranda em Biotecnologia. Regime: Dedicção exclusiva.

**2008 - 2010** Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda em Biotecnologia. Regime: Dedicção exclusiva.
  - Universidad Católica de Santa María - UCSM**

**2007 - 2007** Vínculo: Estagiária. Enquadramento funcional: Estagiária. Regime: Dedicção exclusiva.
- 

### Áreas de atuação

- Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia Industrial e de Fermentação.
  - Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica dos Micro-organismos.
  - Ciências Biológicas / Microbiologia / Biologia e Fisiologia dos Micro-organismos.
- 

### Projetos

- |                    |   |
|--------------------|---|
| <b>2009 - 2011</b> | Ethanol Production from Sugarcane Bagasse: Enzymatic Pre-Treatments and Microbiological assays to evaluate Tolerance to Hydrolysates at Increasing Temperatures.<br>Situação: Concluído. Natureza: Projetos de pesquisa. Dra. Cecilia Laluce (Responsável).<br>Financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (programa BIOEN). |
|--------------------|---|

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.
<b>Espanhol</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.
<b>Português</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.

---

## Prêmios e títulos

<b>2013</b>	Best Poster at the XXVIII ISSCT Congress, International Society of Sugar Cane Technologists – ISSCT. São Paulo - Brazil.
-------------	--

---

## Patentes e Registros

<b>2013</b>	Pedido de Patente de Invenção: BR102013028239-1. Data do depósito: 01/11/2013. Título: “Processo de produção de etanol”. Inventores: Cecília Laluce (IQ) / <b>Jéssica Carolina Medina Gallardo</b> (IQ) / Maria Olívia Campos Masiero (IQ) / Eduardo Maffud Cilli (IQ). Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
-------------	--

---

## Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1. Laluce, C., Schenberg, A. C. G., **Gallardo, J. C. M.**, Coradello, L. F. C., Pombeiro-Sponchiado, S. R. Advances and Developments in Strategies to Improve Strains of *Saccharomyces cerevisiae* and Processes to Obtain the Lignocellulosic Ethanol-A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.166, p.1908-1926, 2012.
2. **Gallardo, J. C. M.**, Souza, C. S., Cicarelli, R. M. B., Oliveira, K. F., Morais, M. R., Laluce, C. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.38, p.405-414, 2011.

### Capítulos de livros publicados

1. Laluce, C., Longo, E., Sponchiado, S., Cilli, E. M., **Gallardo, J. C. M.**, Masiero, M. O. C. A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais In: Bioenergia: Desenvolvimento, Pesquisa e Inovação. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, p. 167-195, 2012.

### Trabalhos completos publicados em anais de eventos

1. Laluce, C., **Gallardo, J. C. M.**, Miranda, I. U. Ethanol production from molasses in mixed cultures. In: XXVIII International Society of Sugar Cane Technologists Congress-ISSCT, 2013, São Paulo. XXVIII ISSCT Congress Program and Abstract Book, São Paulo, 2013.
2. **Gallardo, J. C. M.**, Miranda, I. U., Laluce, C. Food fermentations: contributions of

positive cooperation between yeasts. In: IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2012, Araraquara-SP. Book of Abstracts of Ninth Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, p.102, Araraquara, 2012.

### Resumos publicados em anais de eventos

1. **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Fed-batch ethanol production at high temperatures. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa (SHEB), 2013, Foz do Iguaçu. Programação e Resumos XIX SINAFERM, p. 152, 2013.
2. **Gallardo, J. C. M.**, Coradello, L. F. C., Laluca, C. Ethanol production from molasses in co-cultures of *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* at 42°C. In: 13th International Congress on Yeasts ICY, 2012, Madison, Wisconsin. Program & Abstracts 13th ICY 2012, p.379. Madison, 2012.
3. Masiero, M. O. C., Coradello, L. F. C., **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Revitalization of *Saccharomyces cerevisiae* cells between successive fed-batch fermentations for ethanol production at 37°C. In: 13th International Congress on Yeasts ICY, 2012, Madison, Wisconsin. Program & Abstracts 13th ICY 2012, p.261, Madison, 2012.
4. **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Producción de Bioetanol: Aspectos básicos, importancia y obtención a partir de caña de azúcar en un co-cultivo de levaduras. In: V Congreso Internacional de Biotecnología, 2011, Arequipa, Perú. CD de Resúmenes. Arequipa, 2011.
5. **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. A promising yeast for fermentations at high temperatures. In: VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2010, São Carlos-SP. VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, p.101, 2010.
6. Laluca, C., **Gallardo, J. C. M.**, Morais, M. *Issatchenkia orientalis*: A Promising Yeast for Fermentations at High Temperatures. In: 4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi, 2010, Rotterdam, The Netherlands. Abstract Book, p. 116, 2010.

---

### Apresentação de trabalho e palestra

1. **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Fed-batch ethanol production at high temperatures, 2013. (Simpósio, apresentação de Trabalho).
2. Laluca, C., **Gallardo, J. C. M.**, Miranda, I. U. Ethanol production from molasses in mixed cultures, 2013, (Congresso, apresentação de Trabalho).
3. **Gallardo, J. C. M.**, Coradello, L. F. C., Laluca, C. Ethanol production from molasses in co-cultures of *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* at 42°C, 2012. (Congresso, apresentação de Trabalho).
4. **Gallardo, J. C. M.**, Miranda, I. U., Laluca, C. Food fermentations: contributions of positive cooperation between yeasts, 2012. (Congresso, apresentação de Trabalho).
5. **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Optimization of Ethanol Production Using a Mixed Culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Issatchenkia orientalis* at high temperatures, 2012. (Congresso, apresentação de Trabalho).
6. Miranda, I. U., **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Physicochemical procedures for fractionation of sugarcane bagasse and lignocellulose hydrolysis, 2012. (Congresso, apresentação de Trabalho).
7. Masiero, M. O. C., Coradello, L. F. C., **Gallardo, J. C. M.**, Laluca, C. Revitalization

- of *Saccharomyces cerevisiae* cells between successive fed-batch fermentations for ethanol production at 37°C, 2012. (Congresso, apresentação de Trabalho).
8. **Gallardo, J. C. M.**, Laluçe, C. An Innovative Process for the production of ethanol from molasses at 42°C maintaining high yeast viabilities and ethanol yields, 2011. (Congresso, apresentação de Trabalho).
  9. **Gallardo, J. C. M.**, Laluçe, C. Producción de bioetanol: Aspectos básicos, importancia y obtención a partir de caña de azúcar, 2011. (Congresso, apresentação oral de Trabalho).
  10. Laluçe, C., **Gallardo, J. C. M.**, Morais, M. Ethanol Production from Molasses at High Temperatures by a co-culture of *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae*, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho).
  11. **Gallardo, J. C. M.**, Laluçe, C. *Issactchenkia orientalis*: A promising yeast for fermentations at high temperatures, 2010. (Congresso, apresentação de Trabalho).
  12. **Gallardo, J. C. M.**, Laluçe, C. Molasses Fermentation at High Temperatures Making Use of the Synergism between *Issatchenkia orientalis* and other Yeasts, 2010. (Congresso, apresentação de Trabalho).
  13. **Gallardo, J. C. M.**, Laluçe, C., Souza, C., Sponchiado, S. A Promising New Yeast for Fermentation at High Temperatures, 2009. (Congresso, apresentação de Trabalho).
  14. **Gallardo, J. C. M.**, Laluçe, C. The optimization of a co-culture of two distinct yeasts interacting with each other to produce ethanol from molasses, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho).
- 

## Participação em eventos

1. Apresentação de Poster/Painel no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), 2013. (Simpósio). Fed-batch ethanol production at high temperatures.
2. Apresentação de Poster/Painel no 13th International Congress on Yeasts ICY, 2012. (Congresso). Ethanol production from molasses in co-cultures of *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* at 42°C.
3. Apresentação de Poster/Painel no IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2012. (Congresso). Food fermentations: contributions of positive cooperation between yeasts.
4. Apresentação de Poster/Painel na XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2012. (Congresso). Optimization of Ethanol Production Using a Mixed Culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Issatchenkia orientalis* at high Temperatures.
5. Workshop BIOEN de Pesquisa, 2012. (Encontro).
6. Workshop 2012 Programas de Pós-graduação Química e Biotecnologia, 2012. (Encontro).
7. Apresentação de Poster/Painel no 1st Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2011. (Congresso). An Innovative Process for the production of ethanol from molasses at 42°C maintaining high yeast viabilities and ethanol yields.
8. Conferencista no V Congreso Internacional de Biotecnología, 2011. (Congresso). Producción de bioetanol: Aspectos básicos, importancia y obtención a partir de caña de azúcar.
9. Apresentação de Poster/Painel no VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2010. (Congresso). *Issactchenkia orientalis*: A promising yeast

for fermentations at high temperatures.

10. Apresentação de Poster/Painel na XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010. (Congresso). Molasses Fermentation at High Temperatures Making Use of the Synergism between *P. kudriavzevii* and other Yeasts.

11. Apresentação de Poster/Painel na XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2009. (Congresso). A Promising new yeast for fermentation at high temperatures.

12. Apresentação de Poster/Painel no 25° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. (Congresso). The optimization of a co-culture of two distinct yeasts interacting with each other to produce ethanol from molasses at high temperatures.

13. Workshop 2009 Programas de Pós-graduação em Biotecnologia, 2009. (Encontro).

14. XXXVIII Semana da Química, 2008. (Encontro).

15. VII Brazilian Meeting on Chemistry of food and beverages, 2008. (Congresso).

16. IV Congreso Internacional de Biotecnología y II Congreso de Farmacia y Bioquímica, 2007. (Congresso).

17. Jornadas Farmacéuticas, Bioquímica y Biotecnológicas, 2006. (Seminário).

18. III Congreso Nacional de Estudiantes de Genética y Biotecnología, 2006. (Congresso).

19. III Congreso Internacional de Biotecnología, 2004. (Congresso).

20. II Congreso de Iniciación a la Vida Universitaria. 2003. (Congresso).

## JÉSSICA CAROLINA MEDINA GALLARDO

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 06 de junho de 2014.

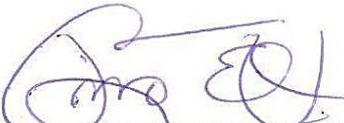
### BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. CECILIA LALUCE (Orientadora)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

  
Prof. Dr. RUBENS MONTI  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara / UNESP / Araraquara

  
Prof. Dr. OSSAMU HOJO  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

  
Dr.<sup>a</sup>. CRISTIANE SANCHEZ FARINAS  
Embrapa Instrumentação Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos

  
Prof. Dr. BORIS JUAN CARLOS UGARTE STAMBUK  
Centro de Ciências Biológicas / UFSC / Florianópolis

*A mis padres Gabriela y Godofredo, por ser mi fuerza, mi resguardo y apoyo en todas las grandes decisiones de mi vida, por su inmenso amor, entrega y confianza...*

*A mis hermanos Flavio y Doaner, por su amor y apoyo incondicionales...*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelas pessoas e oportunidades que Ele tem colocado no meu caminho diariamente.

À minha orientadora Profa. Dra. Cecília Laluze, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e me tornar parte do seu grupo, pelo aprendizado, pela paciência, incentivo e carinho. Agradeço a preocupação que sempre teve por mim e pela ajuda oferecida em assuntos não relacionados à pesquisa.

Aos meus pais, Gaby e Godo, por todos seus ensinamentos, dedicação e esforço dispensados para meu engrandecimento como pessoa. Agradeço a eles pela oportunidade de estudo, por acreditarem em minhas decisões mesmo parecendo um pouco malucas ou ousadas. Vocês, melhor que ninguém, sabem quão difícil que foram estes anos longe, agradeço por andarem comigo e por não me deixarem desfalecer no meio do caminho. Mi gratitud eterna para uds.!

Aos meus irmãos, Flavio e Doaner, pela grande amizade, pelo apoio e seus conselhos (o Flavio e seus famosos "tips"). Quem diria que todas nossas brigas quando crianças só serviriam para fortalecer nossa relação e nos tornar cada dia mais unidos. Obrigada por torcerem sempre por mim!

À minha avó, "mi querida mamá Maria", que mesmo não entendendo direito o que eu fazia, sempre se sentiu muito orgulhosa de mim. Obrigada pelo abraço carinhoso e afetuoso.

Às minhas famílias Medina e Gallardo pelo apoio e carinho de sempre.

Aos meus amigos e colegas que entraram, permaneceram e saíram do laboratório ao longo destes quatro anos, pelo convívio harmonioso, pelo aprendizado, pelas brincadeiras e risadas.

Às amigadas que fiz em Araraquara, em especial a: Andrea, Bianca, Daniel, Esteban, Fabio, Geraldo, Guilherme, Ismael, Juliana, Leonardo, Luiz Fernando, Maira, Mariana, Manuela, Maria Leticia, Maria Olivia, Meline, Muriel, Nely e Ricardo. Obrigada por me acompanharem na bancada e/ou fora dela. Estarão sempre em minha lembrança por mais que os anos passem e os quilômetros nos distanciem.

À minha querida amiga Maria Olivia, por ser a primeira a conversar comigo e me acolher em sua casa. Obrigada amiga pelas nossas conversas sobre ciência, sobre a vida e sobre "nada", pelas risadas até chorar, por aguentar meus desabafos,

pela paciência para me ensinar português (aprendi muito com você), pelos finais de semana, pelas viagens, pelo apoio, por seus conselhos e principalmente por me ensinar que longe de casa também podemos fazer grandes amizades e encontrar pessoas maravilhosas. Obrigada pela nossa amizade que já é eterna no meu coração!

A todos os meus amigos de Arequipa - Perú, por torcerem sempre por mim. Agradeço em especial à Brenda, Estefania e Gleny, minhas amigas de vida que, apesar da distância, sempre me demonstraram sua amizade e se preocuparam comigo. Muchas gracias chicas pelas conversas, risadas e pelos inesquecíveis momentos compartilhados sempre que eu estava em Arequipa.

Aos meus grandes amigos de faculdade, Claudio, Derecks, Derenisse, Fiorella, Lizbeth, Luige e Solange que, a pesar da distância, sempre deram um jeito de ficar por perto. Obrigada por todos os momentos compartilhados durante nosso longo aprendizado e por esses reencontros que nos fazem parecer que foi ontem que nos vimos naquelas salas de aulas.

Ao técnico do laboratório Fernando Delfino, pela paciência, amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca, pelas críticas e conselhos para enriquecer este trabalho.

À Cristina, funcionaria da biblioteca, pela paciência e ajuda na formatação e revisão do mesmo.

Os meus mais sinceros agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e ao Instituto de Química de Araraquara e a todos os funcionários da seção de pós-graduação. Agradeço em especial ao Professor Reinaldo Marchetto, diretor do Programa, à Wenia e à Célia pela colaboração e paciência em responder minhas inúmeras perguntas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq pelo apoio financeiro durante estes quatro anos.

*“Dejad el mundo un poco mejor de como lo encontrasteis...”*

*Robert Baden Powell  
(Creador del Movimiento Scout)*

***Resumo***

---

## RESUMO

O processo industrial de produção de etanol combustível é realizado sob condições não estéreis, portanto diferentes espécies de leveduras provenientes da matéria-prima e/ou do próprio ambiente podem ser encontradas no processo de fermentação. Geralmente, a temperatura nas dornas industriais é mantida ao redor de 32°C a 35°C, no entanto, devido ao curto tempo de fermentação, o resfriamento nem sempre é suficientemente eficaz na remoção de calor, atingindo temperaturas de até 40°C. Assim, uma levedura capaz de fermentar a temperaturas acima daquelas toleradas por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura utilizada como inóculo nas fermentações industriais, pode ser útil na produção de etanol durante períodos de elevação de temperatura, especialmente em países de clima tropical como o Brasil. *Issatchenkia orientalis* é uma levedura não-*Saccharomyces* capaz de converter glicose e frutose em etanol a temperaturas tão altas quanto 42°C, é encontrada em processos industriais de fabricação de pães e bebidas. O presente trabalho visou a produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar a 42°C utilizando uma cultura mista das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii*. Para atingir este objetivo, inicialmente, padronizaram-se as condições de fermentação em batelada alimentada a 42°C. Em ciclos únicos de fermentação, o inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (24 g/L, proporção inicial 1:3, m/v) produziu 78,76±2,08 g/L de etanol com uma produtividade de 9,85±0,29 g/L/h, rendimento teórico igual a 91,97% e ( $Y_{P/S}$ ) de 0,47±0,01 g/g após 8 h de fermentação. A seguir foi estudada a fermentação em batelada alimentada com reciclo de células e revitalização das células entre os ciclos de fermentação. A suplementação do meio de revitalização com um coquetel de sais, não teve efeito sobre o acúmulo da biomassa, a viabilidade e a produção de etanol. Por outro lado, quando uma fonte de nitrogênio orgânico (lisado celular) foi adicionado ao meio de revitalização observou-se um aumento significativo no acúmulo de biomassa, porém sem melhoras no rendimento do processo. Já que as duas condições de revitalização estudadas não levaram a resultados relevantes em relação à produção de etanol e ao aumento da viabilidade, decidiu-se realizar experimentos de reciclo sem revitalização das células entre os ciclos. Estes experimentos confirmaram que é possível reciclar as células da cultura mista durante 5 ciclos consecutivos a 40°C e 42°C sem perdas significativas na produção de etanol, ( $Y_{P/S}$ ) e viabilidade. Por fim, foi comprovada a tolerância da cultura mista a um coquetel de inibidores presentes nos hidrolisados de bagaço de cana e confirmou-se a resistência de *P. kudriavzevii* aos ácidos láctico e acético e ao etanol a temperaturas elevadas (40°C). Estes resultados representam uma inovação tecnológica para o setor sucroalcooleiro, uma vez que a utilização da co-cultura de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* aumentaram a produção de etanol em condições de estresse. Entretanto, ensaios em escala piloto são necessários para validar este processo utilizando volumes maiores de meio.

**Palavras-chave:** *Pichia kudriavzevii*. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação Melaço de cana-de-açúcar. Cultura mista. Condições de estresse.

***Abstract***

---

## ABSTRACT

The industrial ethanol production is carried out under non-sterile conditions, therefore different yeast species from both feedstock and environment can be found in the fermentation. Generally, the temperature in the industrial reactors is maintained between 32°C and 35°C. However, as the fermentation time is relatively short, cooling is not always sufficiently effective in removing heat, reaching temperatures up to 40°C. Thus, a yeast capable of fermenting at temperatures above those tolerated by *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast commonly used as inoculum in industrial fermentations, may be useful for ethanol production during periods of high temperatures, especially in tropical countries such as Brazil. *Pichia kudriavzevii* is a non-*Saccharomyces* yeast capable of converting glucose and fructose into ethanol at temperatures as high as 42°C, which could be found in industrial processes of bread and beverages manufacture. The present work aimed the ethanol production from sugarcane molasses at 42°C using a mixed culture of the yeasts *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii*. In order to achieve this goal, the first part of the work was focused on the optimization of the best conditions for a fed-batch fermentation at 42°C. The mixed inoculum of *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* (24 g/L, initial ratio 1:3 w/v) produced 78.76±2.08 g/L of ethanol with a productivity of 9.85±0.29 g/L/h, which is equivalent to a theoretical yield of 91.97% and  $Y_{P/S}$  of 0.47±0.01 g/g after 8h of fermentation. Fed-batch fermentations were also study with cell recycle and revitalization of cells between the fermentation cycles. The supplementation of revitalization medium with a cocktail of salts had no effect on biomass yields, viability and ethanol production. On the other hand, when an organic nitrogen source (cell lysate) was added to the revitalization medium a significant increase in biomass production was observed, nevertheless no improvement of ethanol productivity was achieved. Since the two revitalization conditions did not lead to better results regarding ethanol production and cell viability, the cell recycle process was performed without cell revitalization step between cycles. The data obtained showed that it is possible to recycle the cells of the mixed culture for five consecutive cycles at both 40°C and 42°C without significant losses in ethanol production ( $Y_{P/S}$ ) and viability. Finally, the mixed culture showed high tolerance to a cocktail of inhibitors usually present in sugarcane bagasse hydrolysates. Moreover, *P. kudriavzevii* showed high tolerance to acetic and lactic acid at high temperatures (40°C). These results represent a technological innovation for the alcohol industry, since the use of the mixed culture of *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* increased the ethanol production under severe conditions. However, pilot scale tests are necessary to validate this process using larger reactors.

**Keywords:** *Pichia kudriavzevii*. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation. Sugarcane Molasses. Mixed Culture. Stress Conditions.

***Resumen***

---

## RESUMEN

La producción industrial de etanol combustible se lleva a cabo en condiciones no estériles, así, diferentes especies de levaduras provenientes de la propia materia-prima y/o del medio ambiente pueden ser encontradas en el proceso de fermentación. Generalmente, la temperatura en los reactores industriales es mantenida alrededor de 32°C a 35°C. Sin embargo, debido al corto tiempo de fermentación, el resfriamiento de los reactores no siempre es efectivo, pudiendo estos alcanzar temperaturas de hasta 40°C. Una levadura capaz de fermentar a temperaturas más altas de aquellas toleradas por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente utilizada como inóculo en las fermentaciones industriales, puede ser útil para la producción de etanol durante los periodos del año más calientes, especialmente en países tropicales como Brasil. *Pichia kudriavzevii* es una levadura no-*Saccharomyces*, frecuentemente encontrada en procesos de fabricación de pan y bebidas, capaz de convertir glucosa y fructosa en etanol a temperaturas tan altas como 42°C. El objetivo del presente trabajo fue la producción de etanol a partir de melaza de caña de azúcar a 42°C utilizando un cultivo mixto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii*. Inicialmente, se optimizaron las condiciones de fermentación en *fed-batch* a 42°C. En ciclos únicos de fermentación, el inóculo mixto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (24 g/L, proporción inicial 1:3, p/v) produjo 78,76±2,08 g/L de etanol con una productividad de 9,85±0,29 g/L/h, que corresponde a un rendimiento teórico de 91,97% e  $Y_{P/S}$  0,47±0,01 g/g después de 8 h de fermentación. Se estudió también la fermentación en *fed-batch* con reciclaje celular y revitalización de las células entre los ciclos. La suplementación del medio de revitalización con un cóctel de sales no tuvo ningún efecto sobre la producción de biomasa, viabilidad celular y producción de etanol. Por otro lado, cuando se añadió una fuente de nitrógeno orgánico (lisado celular) al medio de revitalización se observó un aumento significativo en la producción de biomasa, más sin efecto sobre el rendimiento del proceso. Dado que las dos condiciones de revitalización estudiadas no condujeron a mejores resultados con respecto a la producción de etanol y aumento de viabilidad, se prosiguió con las fermentaciones sin la etapa de revitalización celular entre los ciclos. Estos experimentos confirmaron que es posible reciclar las células del cultivo mixto durante 5 ciclos sucesivos a 40°C y 42°C sin reducción significativa en la producción de etanol ( $Y_{P/S}$ ) y viabilidad. Finalmente, se comprobó la tolerancia del cultivo mixto a un cóctel de inhibidores comúnmente encontrados en hidrolizados de bagazo de caña de azúcar; también se confirmó la tolerancia de *P. kudriavzevii* a los ácidos acético e láctico a 40°C. Estos resultados representan una innovación tecnológica para el sector sucroalcoholero, ya que el uso del co-cultivo de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* aumentó la producción de etanol en condiciones severas de fermentación. Sin embargo, la tecnología necesita ser testada en escala piloto y así validar el proceso en reactores de mayor capacidad volumétrica.

**Palabras-clave:** *Pichia kudriavzevii*. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentación. Melaza de caña de azúcar. Cultivos mistos. Condiciones de estrés.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar nas destilarias Brasileiras (Fonte: modificado de BANCO..., 2008)..... 32
- Figura 2** – Potenciais estresses fermentativos enfrentados pela levedura *S. cerevisiae* durante o processo de produção de etanol (Fonte: BAI *et al.*, 2008)..... 41
- Figura 3** – Sistema de reatores utilizado nas fermentações em batelada alimentada (Marconi S. A.)..... 50
- Figura 4** – Comparação da fermentação de melaço utilizando as culturas puras e mistas das leveduras *S. cerevisiae* (linhagem IQAr/45-1) e *P. kudriavzevii* (linhagem 195B) a 42°C: A concentração de inóculo misto ou simples foi 10 g/L: (-□-) *S. cerevisiae*, (-●-) *P. kudriavzevii* ou *I. orientlais*, (-△-) inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v)..... 62
- Figura 5** – Efeito da concentração de inóculo misto sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) durante a fermentação em batelada alimentada de melaço 18% usando *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C. A concentração inóculo misto foi: 10 g/L (-■-), 15 g/L (-○-), 18 g/L(-△-) e 24 g/L (-▽-)..... 64
- Figura 6** – Efeito da concentração do melaço sobre a formação de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e açúcar residual total (D) durante a fermentação em batelada alimentada usando o inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v). A concentração de açúcar na alimentação foi: 257 g/L ART (-■-), 285 g/L ART (-○-) e 330 g/L ART (-◆-)..... 66
- Figura 7** – Efeito da temperatura sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) durante a fermentação em batelada alimentada de melaço utilizando 24 g/L de inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 34°C (-▲-), 40°C (-○-) e 42°C (-■-)..... 67

<b>Figura 8</b> –	Diferença de morfologia entre as células (a) e colônias (b) de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> no início da fermentação de melaço em batelada alimentada.....	70
<b>Figura 9</b> –	Efeito da temperatura sobre a permanência das células de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> ao longo da fermentação em batelada alimentada de melaço a 34°C (A), 40°C (B) e 42°C (C).....	71
<b>Figura 10</b> –	Efeito da temperatura sobre a morfologia das células de <i>P. kudriavzevii</i> e <i>S. cerevisiae</i> no início e fim da fermentação em batelada alimentada de melaço a 34°C (A e D), 40°C (B e E) e 42°C (C e F) (amplificação 40X).....	72
<b>Figura 11</b> –	Efeito da suplementação do melaço com fonte de nitrogênio orgânico sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B) e produção de etanol (C) durante a fermentação em batelada alimentada utilizando o inóculo misto de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (■) controle sem adição de nitrogênio orgânico e (■) adição de nitrogênio orgânico (1 g/L).....	74
<b>Figura 12</b> –	Efeito da suplementação do melaço com fonte de nitrogênio orgânico (lisado celular) sobre a permanência das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> durante a fermentação em batelada alimentada de melaço a 42°C: (A) controle sem adição de lisado e (B) adição de lisado celular (1 g/L).....	75
<b>Figura 13</b> –	Acompanhamento da permanência das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> durante a fermentação de melaço 16% ART em batelada simples (A) e durante a fermentação de melaço 18% ART em batelada alimentada (B) a 42°C.....	78
<b>Figura 14</b> –	Atividade invertásica das células de <i>S. cerevisiae</i> (-●-), <i>P. kudriavzevii</i> (-▲-) e da cultura mista (-■-) constituída por <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> (proporção inicial 1:3, m/v) durante a fermentação de melaço em batelada simples a 42°C.....	79
<b>Figura 15</b> –	Efeito da composição do meio de revitalização sobre a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melaço inoculado com o inóculo misto das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (■) meio de revitalização controle	

	sem adição do coquetel de sais e (■) meio de revitalização contendo coquetel de sais.....	81
<b>Figura 16</b>	– Efeito da composição do meio de revitalização sobre a permanência das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> durante a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melaço a 42°C: (A) meio de revitalização controle sem adição de coquetel de sais e (B) meio de revitalização contendo coquetel de sais.....	82
<b>Figura 17</b>	– Efeito da composição do meio de revitalização sobre a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melaço inoculado com a mistura das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (■) meio de revitalização por 12 h sem adição de nitrogênio e (■) meio de revitalização contendo nitrogênio (1,0 g/L).....	84
<b>Figura 18</b>	– Efeito da composição do meio de revitalização sobre a permanência das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> durante a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melaço a 42°C: (A) meio de revitalização sem adição de lisado celular e (B) meio de revitalização contendo lisado celular (1,0 g/L).....	84
<b>Figura 19</b>	– Efeito da temperatura sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C), consumo de ART (D) e produção de glicerol interno (E) e externo (F) durante a fermentação sucessiva de melaço pela co-cultura das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> (proporção inicial 1:3, m/v) a 40°C (■) e 42°C (■).....	87
<b>Figura 20</b>	– Efeito da temperatura sobre a permanência das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> durante a fermentação sucessiva de melaço a 40°C (A) e 42°C (B).....	88
<b>Figura 21</b>	– Crescimento da linhagem 195B de <i>P. kudriavzevii</i> , linhagem IQAr45-1 de <i>S. cerevisiae</i> e linhagem PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> em meio YPD contendo ácido acético (0-0,9%, m/v) a 30°C e 40°C.....	90
<b>Figura 22</b>	– Crescimento da linhagem 195B de <i>P. kudriavzevii</i> , linhagem IQAr45-1 de <i>S. cerevisiae</i> e linhagem PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> em meio YPD contendo ácido láctico (0-8,0%, m/v) a 30°C e 40°C.....	91

- Figura 23** – Crescimento da linhagem 195B de *P. kudriavzevii*, linhagem IQAr45-1 de *S. cerevisiae* e linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* em meio YPD contendo etanol (0-12,0%, v/v) a 30°C e 40°C..... 92
- Figura 24** – Efeito do etanol adicionado sobre a fermentação de meio YPD contendo 10% (m/v) glicose usando a cultura mista de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (-●-) controle sem adição de etanol, (-■-) adição de 8% (v/v) etanol, (-◆-) adição de 10% (v/v) etanol, (-▲-) adição de 12% (v/v) etanol, (-▼-) adição de 14% (v/v) etanol..... 93
- Figura 25** – Efeito da adição dos inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos sobre a fermentação de melaço a 34°C utilizando 24 g/L do inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v): controle sem adição de inibidores (-■-), coquetel de inibidores 1X (-○-), coquetel de inibidores 2X (-▲-) e coquetel de inibidores 4X (-▼-)..... 94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição do melaço de cana-de-açúcar.....	31
<b>Tabela 2</b> – Indicadores obtidos durante a fermentação em batelada alimentada utilizando a co-cultura de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> a 34°C, 40°C e 42°C.....	69
<b>Tabela 3</b> – Indicadores obtidos durante a fermentação de melaço em batelada simples e batelada alimentada a 42°C.....	76
<b>Tabela 4</b> – Acúmulo de biomassa, viabilidade, produção de etanol e consumo de açúcar durante a revitalização das células em melaço contendo um coquetel de sais.....	83
<b>Tabela 5</b> – Acúmulo de biomassa, viabilidade, produção de etanol e consumo de açúcar durante a revitalização das células em melaço contendo fonte de nitrogênio orgânico (lisado celular).....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
μL	microlitro
AR	açúcar redutor
ART	açúcar redutor total
atm	atmosfera
ATP	adenosina tri fosfato
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	etanol
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	glicose
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
g	gramas
g/l	gramas por litro
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
L	litro
M	molar
mg/l	miligramas por litro
mL	mililitro
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
v/v	volume por volume
w/v	peso por volume
Y <sub>P/S</sub>	fator de conversão de substrato em produto
YPD	extrato de levedura, peptona e glicose

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1.1. Produção de bioetanol.....	29
1.2. Matéria-prima.....	30
1.2.1. Melaço de cana-de-açúcar .....	30
1.3. Processo de produção de etanol nas destilarias Brasileiras.....	31
1.3.1. Processo em batelada simples.....	33
1.3.2. Processo em batelada alimentada.....	33
1.3.3. Processo <i>Melle-Boinot</i> .....	34
1.4. Leveduras nos processos industriais.....	34
1.4.1. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
1.4.2. A levedura <i>Issatchenkia orientalis</i> ou <i>Pichia kudriavzevii</i> .....	36
1.5. Interação entre micro-organismos no processo de produção de etanol.....	38
1.6. Estresses fermentativos.....	41
1.6.1. Estresse térmico.....	41
1.6.2. Estresse alcoólico.....	42
1.6.3 Estresse ácido.....	43
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
3.1. Leveduras e manutenção de culturas.....	47
3.2. Meio de cultura.....	47
3.2.1. Meio YPD.....	47
3.2.2. Matéria-prima e tratamento.....	48
3.3. Propagação do inóculo.....	48
3.4. Fermentações em batelada alimentada.....	48
3.5. Acompanhamento da permanência das leveduras durante a fermentação.....	50
3.6. Fermentações em batelada alimentada com reutilização de células..	50

3.6.1. Fermentações em batelada alimentada com reutilização de células e revitalização das células entre os ciclos.....	50
3.6.1.1. Preparo do meio de revitalização.....	50
3.6.2. Fermentação em batelada alimentada com reutilização de células e sem revitalização das células entre os ciclos.....	51
3.7. Determinação da resistência aos inibidores da fermentação.....	51
3.7.1. Ensaio qualitativos.....	51
3.7.2. Ensaio quantitativos.....	52
3.8. Ensaio analíticos e microbiológicos.....	52
3.8.1. Biomassa celular.....	52
3.8.2. Viabilidade celular.....	53
3.8.3. Contagem do número de células.....	54
3.8.4. Açúcar Redutor total (ART).....	54
3.8.5. Etanol.....	55
3.8.6. Glicerol interno e externo.....	55
3.8.7. Nitrogênio livre.....	56
3.8.8. Determinação da atividade invertásica.....	56
3.9. Cálculo dos indicadores de fermentação.....	57
3.9.1. Fator de conversão de substrato em produto.....	57
3.9.2. Fator de conversão de substrato em biomassa.....	57
3.9.3. Rendimento fermentativo.....	57
3.9.4. Produtividade.....	58
3.9.5. Produção específica global.....	58
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
4.1. Padronização das condições de fermentações em batelada alimentada.....	63
4.1.1. Efeito da concentração de inóculo inicial misto.....	63
4.1.2. Efeito da concentração de açúcares no meio de alimentação.....	64
4.1.3. Efeito da temperatura de fermentação.....	65
4.1.4. Suplementação do melaço com fonte de nitrogênio orgânico .....	71

4.1.5. Comparação entre a fermentação em batelada simples e alimentada de melação a 42°.....	74
4.1.6. Determinação da atividade invertásica das células de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. kudriavzevii</i> em cultura simples e mista.....	77
4.2. Fermentação em batelada alimentada com reutilização de células e revitalização celular entre os ciclos de fermentação.....	80
4.2.1. Revitalização celular com coquetel de sais.....	80
4.2.2. Revitalização celular com fonte de nitrogênio orgânico.....	83
4.3. Fermentação em batelada alimentada a 42°C com reciclo de células sem revitalização celular.....	86
4.4. Resistência aos estresses fermentativos.....	88
4.4.1. Resistência aos ácidos e etanol .....	88
4.4.2. Efeito do etanol externo sobre a fermentação.....	92
4.4.3. Efeito da adição dos inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos.....	93
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>109</b>

# ***Introdução***

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produção de bioetanol

A preocupação com as mudanças ambientais no planeta e uma possível crise mundial energética estimulou o desenvolvimento e uso de formas de energia limpa alternativas, como o bioetanol, o qual tem recebido muita atenção e investimentos nas últimas décadas. O etanol é o principal biocombustível utilizado para o transporte, sendo o Brasil o maior exportador e segundo maior produtor do mundo, chegando a ser a primeira economia do globo a atingir o uso sustentável dos biocombustíveis (BASSO *et al.*, 2011). Os Estados Unidos (o maior produtor) e o Brasil foram responsáveis por 70% da produção mundial de etanol em 2012 (RFA, 2013). Assim, a produção de etanol no Brasil atingiu pouco mais de 25 bilhões de litros nesse ano (RFA, 2013).

Como uma fonte de energia renovável, o bioetanol pode ajudar a atenuar as mudanças climáticas, assim como também reduzir a dependência dos combustíveis fósseis nos setores de transporte e industrial. O etanol possibilita uma combustão limpa e um bom desempenho dos motores, o que contribui para reduzir as emissões poluentes, mesmo quando o etanol é misturado à gasolina (BALAT *et al.*, 2009). O acúmulo de CO<sub>2</sub> na atmosfera é gerado devido ao consumo de petróleo, carvão e queimadas, sendo este o principal causador do aquecimento global e alterações climáticas. Neste sentido, o uso do etanol vem contribuindo na redução das emissões de CO<sub>2</sub> pelos veículos em até 80-90% (WARD; SINGH, 2002; MUSSATTO *et al.*, 2010).

A produção e o uso de etanol como combustível para veículos são praticados regularmente no Brasil desde 1931, com notável evolução durante as últimas décadas (BANCO..., 2008). A crise do petróleo na década de 70 motivou o governo a desenvolver uma forma alternativa de combustível para substituir a gasolina. Nasceu então o bioetanol, um combustível obtido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, melaço ou ambos. Assim, em 1975, foi criado o Programa Nacional do Álcool "Proálcool" com a finalidade de reduzir a grande dependência do petróleo importado e criar um mercado paralelo de combustível para os produtores de açúcar (BALAT *et al.*, 2009). Desde então, a agroindústria canavieira brasileira tem se

expandido, consolidando-se economicamente com indicadores positivos de sustentabilidade ambiental. A partir do Proálcool, deu-se vida nova ao setor, com investimentos em equipamentos, serviços e desenvolvimento de novas tecnologias, tanto no setor agrícola quanto no industrial.

## **1.2. Matéria-prima**

O bioetanol pode ser produzido a partir de três tipos de matérias-primas renováveis: (1) diretamente fermentescível, como a cana-de-açúcar, sorgo ou beterraba; (2) matérias-primas amiláceas, não diretamente fermentescíveis, como o milho, mandioca ou trigo, cujo amido deve ser convertido em açúcares simples antes da fermentação e (3) material lignocelulósico, como madeira, forragem e bagaço de cana-de-açúcar, sendo esta matéria-prima bastante atrativa devido ao seu baixo custo (AMORIM *et al.*, 2009). Contudo, esta última rota para a produção de etanol ainda não está disponível em escalas industriais, embora haja expectativas de que nos próximos anos possa alcançar viabilidade econômica.

No contexto brasileiro, o etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar em unidades agroindustriais que produzem tanto etanol quanto açúcar, gerando melaços que podem, junto com o caldo de cana, compor os mostos fermentescíveis que alimentam as dornas de fermentação (BANCO..., 2008). Já nos Estados Unidos, a matéria-prima utilizada para a produção de etanol é o milho. No caso do milho é necessário liberar as moléculas de amido por cozimento e hidrolisá-las como o uso de enzimas industriais antes do processo de fermentação (BOTHAST; SCHLICHER, 2005; BALAT *et al.*, 2009). Portanto, este processo de produção de etanol é mais longo, complexo e exige uma maior quantidade de energia para produzir o mesmo volume, sendo o etanol produzido no Brasil a partir de cana-de-açúcar de menor custo (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

### **1.2.1. Melaço de cana-de-açúcar**

O melaço é resultante de uma etapa de centrifugação ou de decantação realizada após a cristalização do açúcar no processo de produção de sacarose comercial (BASSO *et al.*, 2011). Esta matéria-prima é composta de açúcares

reduzidos (glicose e frutose), sacarose não cristalizada, água, compostos não-açúcares de origem orgânica (aminoácidos, vitaminas, proteínas) e uma fração mineral composta principalmente de cálcio, magnésio, sódio e potássio (Tabela 1). A sua composição é muito variável, pois depende da qualidade e das condições de processamento da cana-de-açúcar (TECLU *et al.*, 2009).

O melaço tem sido muito utilizado na produção industrial de vários metabolitos de interesse comercial como o sorbitol, ácido láctico, ácido cítrico e o próprio etanol uma vez que apresenta alto teor de açúcar (50% em média) (LIU *et al.*, 2008). Além disto, é um subproduto da indústria açucareira relativamente barato e disponível em grandes quantidades.

**Tabela 1** – Composição do melaço de cana-de-açúcar

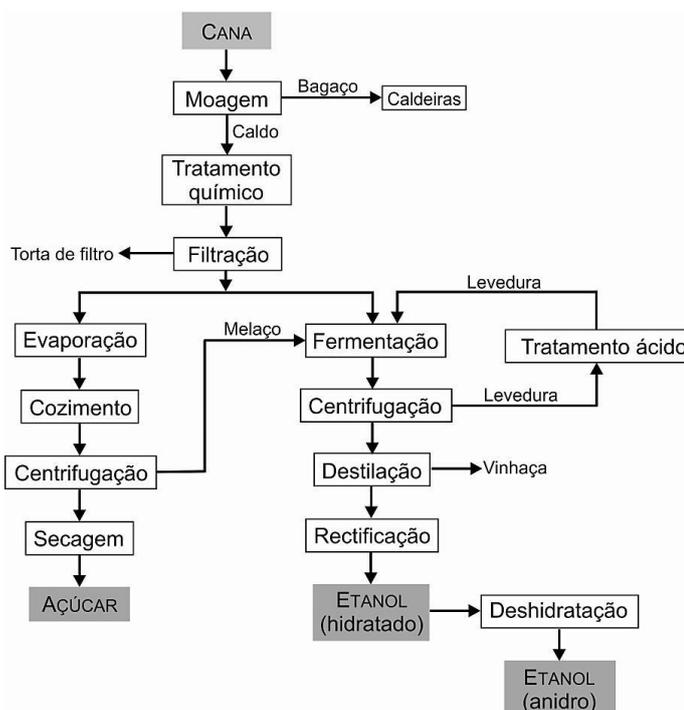
<b>Componente</b>	<b>%</b>
Água	17-25
Sacarose	30-40
Glicose	4-9
Frutose	5-12
Outros carboidratos	2-5
Cinzas	7-15
Compostos nitrogenados	2-6
Gorduras, esteróis, fosfolipídios	0,1-1
Fração mineral	4,08X10 <sup>-3</sup> - 4,38X10 <sup>-3</sup>
Ácidos não nitrogenados	2-8

**Fonte:** Teclu *et al.*, 2009.

### 1.3. Processo de produção de etanol nas destilarias Brasileiras

De acordo com BNDES (BANCO..., 2008) e como ilustrado na Figura 1, uma vez na usina, a cana é lavada e moída, sendo o caldo extraído sob pressão dos rolos das moendas. Depois disto, o caldo é separado do bagaço que segue para as caldeiras para a geração de energia que a própria usina utiliza. O caldo contendo os açúcares da cana pode, então, ser destinado à produção de açúcar ou etanol. Para a produção de açúcar, o caldo é tratado quimicamente, para a separação das impurezas, que são eliminadas por decantação e depois concentrado em evaporadores para a

cristalização da sacarose. Nesse processo, nem toda a sacarose disponível na cana é cristalizada e a solução residual rica em açúcar (melaço) pode retornar mais de uma vez ao processo com o propósito de recuperar mais açúcar. O melaço final que não retorna ao processo contém ainda sacarose e um elevado teor de açúcares redutores (glicose e frutose), podendo ser utilizado como matéria-prima para a produção do etanol. Desse modo, a produção de etanol de cana-de-açúcar pode basear-se na fermentação tanto do caldo da cana, diretamente, quanto de misturas de caldo com melaço, sendo as misturas as mais frequentemente utilizadas no Brasil. Assim, o caldo tratado é misturado com o melaço, dando origem ao mosto que segue para as dornas de fermentação onde a levedura é adicionada, fermentado por um período de 8 a 12 horas a uma temperatura de 33-35°C, dando origem ao vinho ou mosto fermentado com uma concentração de 7-11%, v/v de álcool (AMORIM *et al.*, 2011). Após o tempo de fermentação, as leveduras são recuperadas por centrifugação e tratadas para novo uso, enquanto o vinho é enviado para as colunas de destilação. Na destilação, o etanol é recuperado inicialmente na forma hidratada, com aproximadamente 96°GL, deixando a vinhaça ou vinhoto como resíduo. O etanol hidratado pode ser estocado como produto final ou pode ser enviado para a coluna de desidratação, onde o cicloexano é adicionado para facilitar a obtenção do etanol anidro.



**Figura 1** – Esquema da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar nas destilarias Brasileiras (Fonte: modificado de BANCO..., 2008).

### 1.3.1. Processo em batelada simples

O processo em batelada simples, também conhecido por batelada descontínua é um sistema de fácil operação e controle, no qual o reator recebe inicialmente todo o meio de cultura esterilizado e logo é inoculado com o microrganismo e incubado, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas (ZHANG, 2009). Terminada a fermentação, descarrega-se o reator, e o meio fermentado segue para os tratamentos finais para a recuperação dos produtos de interesse.

A principal característica deste tipo de processo é que o volume de meio do reator permanece sempre constante, no entanto a composição do meio muda constantemente devido às mudanças no metabolismo celular que apresenta uma curva de crescimento típica (CARVALHO, SATO, 2001). Além disto, na fermentação em batelada simples ocorre o esgotamento rápido dos nutrientes do meio com formação de níveis elevados de etanol, sendo estes tóxicos para a levedura.

Este sistema de fermentação é geralmente utilizado como base inicial em estudos de fermentação, portanto, seu uso está limitado à escala de laboratório.

### 1.3.2. Processo em batelada alimentada

Esse processo de fermentação, também chamado de descontínua alimentada, é utilizado quando se procura diminuir o efeito inibitório causado pelo excesso de substrato e/ou produto (LEE *et al.*, 1999). Durante este processo um ou mais nutrientes são adicionados ao reator, o qual contém o inóculo (YAMANE *et al.*, 1984). A forma de adição do substrato pode ser com vazão constante ou variável, contínua ou intermitente (CARVALHO, SATO, 2001). Esse tipo de operação ajuda a minimizar a pressão osmótica do meio, já que a concentração de glicose é mantida baixa, minimiza a formação de produtos tóxicos do metabolismo (e.g. ácidos fracos) e diminui a formação de espuma através da utilização de vazões decrescentes de alimentação.

De acordo com Carvalho e Sato (2001), devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, nos processos em batelada alimentada é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico.

### 1.3.3. Processo *Melle-Boinot*

As destilarias brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado *Melle-Boinot* (conhecido na indústria como batelada alimentada) ou com fermentação contínua, nos quais as células de levedura inoculadas no início do processo são reutilizadas durante fermentações consecutivas ao longo de toda a safra canavieira, sendo possível atingir até 90-95% de reuso celular em cada batelada (AMORIM *et al.*, 2011; MARQUES; SERRA, 2004).

A reutilização celular reduz a necessidade de propagação do inóculo, assim menos açúcar é desviado para a formação de biomassa (BASSO *et al.*, 2011). Estima-se que a biomassa de levedura aumenta de 5% a 10% (em relação à biomassa inicial) durante um ciclo de fermentação ou batelada, o que é suficiente para substituir as células perdidas durante a etapa de centrifugação. De acordo com Amorim *et al.* (2011), as células de levedura podem ser reutilizadas de 400 a 600 vezes, uma vez que as destilarias brasileiras operam de 200 a 300 dias durante toda a safra canavieira, isto dependendo da região, condições climáticas, variedade de cana e demandas do mercado.

No processo de reutilização de células as leveduras são separadas do vinho fermentado por centrifugação. O vinho é, então, encaminhado para as colunas de destilação, ao passo que as células centrifugadas passam por um tratamento antes de retornar ao processo, que consiste na diluição com água e adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até pH 1,8 - 2,5 com a finalidade de reduzir uma possível contaminação bacteriana (BASSO *et al.*, 2011; WHEALS *et al.*, 1999). Esta suspensão de células permanece em agitação durante aproximadamente de dois a três horas antes de retornar à dorna de fermentação (AMORIM *et al.*, 2011).

### 1.4. Leveduras nos processos industriais

As leveduras são usadas em muitos processos industriais para a produção de bebidas alcoólicas, biomassa e vários produtos metabólicos, sendo a levedura do gênero *Saccharomyces* a mais utilizada na conversão dos açúcares em etanol. No entanto, leveduras que não fazem parte do inóculo inicial são normalmente encontradas nos processos de fermentação. Essas leveduras são denominadas de

leveduras selvagens e leveduras não-*Saccharomyces*, pois estas proliferam ao longo do processo, já que a fermentação ocorre em condições não estéreis, facilitando a contaminação por diversos micro-organismos. Leveduras selvagens do gênero *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* e *Metschnikowia* podem ser encontradas em processos de produção de cerveja (JESPERSEN; JAKOBSEN, 1996), fermentação de vinhos, fabricação de alimentos e bebidas obtidas por fermentação natural (AIDO *et al.*, 2006) e no próprio processo de produção de etanol (BASSO *et al.*, 2008).

#### 1.4.1. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Os fungos ascomicetos da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são organismos eucariotos, unicelulares com 2 a 15 µm de diâmetro, não-filamentosos, anaeróbicos facultativos e quimioheterotróficos (utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono) que se reproduzem por esporulação (reprodução sexuada) e por brotamento (reprodução assexuada) (WALKER, 1998). Possuem 16 cromossomos lineares e a sua sequência genômica indica que aproximadamente 6000 genes são funcionais (GOFFEAU *et al.*, 1996).

Com respeito à morfologia, as células da levedura *S. cerevisiae* são ovais e formam colônias cremosas, lisas e brilhantes com bordas regulares, ao passo que as células das leveduras não-*Saccharomyces* apresentam uma forma mais alongada e, geralmente, formam colônias cremosas, rugosas e com bordas irregulares.

*S. cerevisiae* é a levedura mais utilizada na área da Biotecnologia e é tradicionalmente empregada na indústria de panificação, na produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível, entre outros produtos de importância industrial e econômica. Esse gênero *Saccharomyces* é sem dúvida um dos grupos de microrganismos mais estudados pela comunidade científica, já que é considerado organismo eucarioto modelo e organismo GRAS (*Generally Recognize as Safe*) (JOHNSON; ECHAVARRI-ERASUN; 2011).

A fermentação alcoólica é, portanto, um processo biológico conduzido por esta espécie de levedura e organizado em uma sequência de reações bioquímicas ligadas a sistemas enzimáticos. O processo de fermentação rende energia a este microrganismo (duas moléculas de ATP) e gera como subprodutos C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH e CO<sub>2</sub>. Já

na respiração, o açúcar (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) é completamente oxidado em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, produzindo como saldo energético 38 moléculas de ATP. Ambos os processos metabólicos, fermentativo e respiratório, são muito importantes em processos industriais de produção de etanol (WALKER, 1998).

#### **1.4.2. A levedura *Issatchenkia orientalis* ou *Pichia kudriavzevii***

Linhagens da levedura *P. kudriavzevii* foram isoladas e identificadas pela primeira vez de sucos e bagaços de frutas e descritas por Kudryavtsev (1960) como células elipsoidais, esferoidais ou alongadas (2,7 a 6,0 µm por 3,5 a 13,5 µm), com esporos arredondados de parede lisa e formados por ascos. No entanto, a análise do rRNA da sequência do gene D1/D2 LSU sugeriu que a espécie *Issatchenkia* era membro do *clade Pichia membranifaciens* (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Assim, algumas espécies de *Issatchenkia* foram descritas inicialmente como parte do gênero *Pichia*, porém o nome da espécie *Pichia orientalis* foi anteriormente dada a *Guilliermond*. Assim, em 1998, Kurtzman incluiu a espécie *P. kudriavzevii* ao gênero *Pichia* sob o nome de uma nova espécie, ou seja, *Pichia kudriavzevii* (KURTZMAN *et al.*, 2008). Embora o nome desta espécie tenha sido oficialmente alterado em 2008, a literatura ainda utiliza o nome *P. kudriavzevii*.

Diferentes linhagens de *P. kudriavzevii* ou *P. kudriavzevii* tem sido encontradas em uma variedade de processos biotecnológicos, tais como: (1) durante a fase tumultuosa e tardia da fermentação natural de vinhos (CLEMENTE-JIMENEZ *et al.*, 2004); (2) fermentação de tequila a partir do agave-azul (LACHANCE, 1995); (3) em massas tradicionais de pães azedos produzindo compostos aromatizantes (ALMEIDA; PAIS, 1996; HAYFORD; JAKOBSEN, 1999); (4) na produção de *champús*, bebida colombiana feita a partir do milho (OSORIO-CADAVID *et al.*, 2008); (5) fabricação de salsicha tradicional de porco (YUANGSAARD *et al.*, 2013); (6) fermentação de produtos lácteos (YADAV *et al.*, 2012); (7) produção de *tapai*, alimento tradicional da Ásia obtido a partir da fermentação de arroz (YADAV *et al.*, 2012); (8) fabricação de *Fufu*, comida Africana resultante da fermentação de mandioca (OYEWOLE, 2001); (9) produção de saquê, bebida japonesa fermentada de arroz (NAKAYAMA *et al.*, 2008); (10) produção de cachaça, porém em baixa concentração (GOMES *et al.*, 2007) e (11) em caldo e melaço de cana-de-açúcar e no processo de produção de etanol

combustível (DHALIWAL *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2002; BASSO *et al.*, 2008). Linhagens de *P. kudriavzevii* foram isoladas de um fermentador contínuo alimentado por xarope de caldo de cana após dois meses de operação neste laboratório. No final do processo, células alongadas foram observadas e um trabalho de isolamento e identificação mostrou que tais isolados (70) pertenceriam ao gênero *P. kudriavzevii* (GALLARDO *et al.*, 2011).

O potencial de *P. kudriavzevii* ou *I. orientalis* para a produção de etanol a temperaturas elevadas a partir de vários substratos tem sido muito estudado nos últimos anos, por exemplo, a partir de resíduos de casca e polpa de tangerina Kinnow utilizando o processo SSF (sacarificação e fermentação simultânea) (SANDHU *et al.*, 2012); palha de arroz previamente tratada com álcali via SSF (OBEROI *et al.*, 2012); amido de mandioca previamente hidrolisado (YUANGSAARD *et al.*, 2013); material lignocelulósico hidrolisado proveniente de resíduos de madeira (THALAGALA *et al.*, 2009) e a partir de resíduos de palha de milho hidrolisados enzimaticamente (KWON *et al.*, 2011). Além disto, Sirianuntapiboon e Tondee (2011) demonstraram a capacidade de *P. kudriavzevii* para degradar e descolorir a melanoidina (pigmento marrom escuro presente nas águas residuais resultantes da produção de açúcar), assim como também na detoxificação de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar reduzindo o teor de inibidores, tais como o ácido acético, furfural e guaiacol (ZHANG *et al.*, 2008). Além disto, isolados de *P. kudriavzevii* tem sido reportados como mais resistentes ao ácido lático e acético do que a levedura *S. cerevisiae* (HALM *et al.*, 2004; CASEY; DOBSON, 2003).

A linhagem 195B de *P. kudriavzevii* isolada e identificada em nosso laboratório mostrou uma temperatura ótima de 42°C para a produção de etanol a partir de glicose no meio YPD (GALLARDO *et al.*, 2011). Este isolado foi selecionado em um trabalho anterior para estudos de fermentação a partir de melaço de cana-de-açúcar a temperaturas elevadas (GALLARDO, 2010). Neste trabalho, esta linhagem foi capaz de produzir etanol a pH 2,5 e 40°C em meio YPD (contendo glicose 10%, m/v) atingindo uma produtividade de  $4,22 \pm 0,17$  g/L/h e  $Y_{p/s}$  de  $0,47 \pm 0,02$  e sem perda significativa de viabilidade celular. Neste trabalho também foi padronizado o uso de uma co-cultura de *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* (linhagem de laboratório) para a fermentação em batelada simples de melaço a 42°C.

O crescente desenvolvimento da tecnologia do DNA e o grande potencial deste micro-organismo tem viabilizado nos últimos anos o melhoramento genético de linhagens de *P. kudriavzevii* possibilitando um melhor aproveitamento dessa levedura. Recentemente, Toivari *et al.* (2013), construíram a linhagem VTT C-79090T de *P. kudriavzevii* capaz de expressar o gene da D-xilose desidrogenase da bactéria *Caulobacter crescentus*. Com esta simples modificação a linhagem produziu altas concentrações de D-xilonato a partir de xilose mesmo a pH 3,0. Em outro trabalho, Kitagawa *et al.* (2010) inseriram o gene da  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus aculeatus* na linhagem MF-121 de *P. kudriavzevii*. Com isto, os autores conseguiram fermentar celobiose sob condições de estresse (pH 3,0 e 40°C) atingindo até 29 g/L de etanol em um processo de SSF contendo 100 g/L de microcristais de celulose. Estes resultados sugerem que a utilização de um micro-organismo termotolerante geneticamente modificado como *P. kudriavzevii* poderia reduzir os custos de produção do etanol de segunda geração, pois menor concentração enzimática seria necessária para o processo de sacarificação.

### 1.5. Interação entre micro-organismos no processo de produção de etanol

O processo industrial de produção de etanol combustível é realizado sob condições não estéreis, portanto diferentes espécies de leveduras provenientes da matéria-prima e/ou do próprio ambiente podem ser encontradas no processo de fermentação. Geralmente, espécies como *Schizosaccharomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia* sobrevivem junto com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é o *starter* do processo, apresentando predominância dependente da fase em que se encontra o processo (BASSO *et al.*, 2008). Tanto a persistência quanto a dominância dessas espécies dependerão da interação entre elas, da matéria-prima, das condições de fermentação, assim como, da capacidade do micro-organismo em tolerar os diversos estresses gerados ao longo do processo como altas concentrações de etanol, temperatura e acidez.

A produção de etanol combustível no Brasil iniciou-se com o uso de leveduras de panificação como inóculo. A partir da década de 1990, as destilarias brasileiras passaram a utilizar linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas ao longo do próprio processo fermentativo (LALUCE *et al.*, 2012). De acordo com Laluce *et al.* (2012), a

primeira levedura a ser usada industrialmente como *starter* foi a linhagem IZ-1904 pertencente à espécie *Saccharomyces boulardii*. Linhagens comerciais, selecionadas de processos industriais passaram, então, a ser muito utilizadas como inóculo na produção de etanol combustível por melhor se adaptarem ao processo industrial. Um dos exemplos mais bem sucedidos é o isolado PE-2 de *S. cerevisiae* usado até por 30% das destilarias brasileiras como inóculo das fermentações (ARGUESO *et al.*, 2010). Nos últimos anos, as destilarias passaram a utilizar uma mistura de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* como *starters* das fermentações de xarope e/ou melaço de cana. Assim, as linhagens que compõem o inóculo inicial da maioria das destilarias brasileiras são: PE-2, BG1, CAT, SA-1 entre outras (BASSO *et al.*, 2008). Contudo, diversas experiências têm mostrado que o uso de leveduras comerciais (selecionadas de processos industriais) não assegura a implantação destas no processo fermentativo. Basso *et al.* (2008) observaram uma grande biodiversidade na fermentação industrial em várias destilarias da Região Centro-Sul do Brasil. Cada destilaria apresentou sua própria população que mostra uma sucessão de diferentes linhagens de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, encontrando linhagens persistentes em baixa frequência, e ainda mais raramente, linhagens dominantes. Silva-Filho *et al.* (2005) demonstraram, através da técnica PCR *fingerprinting* de amostras retiradas de diferentes destilarias, que as linhagens selvagens são mais resistentes e adaptas ao processo do que as linhagens comerciais usadas como inóculo no início do processo.

Vários autores têm estudado a produção de etanol empregando co-culturas de *S. cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces*. As interações mais conhecidas entre estas leveduras estão relacionadas com a diminuição ou aumento de acidez, aumentos em glicerol externo e modulação de sabores em bebidas fermentadas (FLEET, 2003). Em culturas mistas junto com *S. cerevisiae*, a linhagem KMBL 5774 de *P. kudriavzevii* foi capaz de produzir 7,8% (v/v) de etanol na fermentação de vinho além de reduzir até 70% do ácido málico desta bebida (KIM *et al.*, 2008). Por outro lado, García *et al.* (2010) estudaram o efeito da utilização da cultura mista de *Cândida membranifaciens* e *S. cerevisiae* sobre as qualidades físico-químicas e organolépticas de vinhos. Os vinhos produzidos por esta co-cultura apresentaram menos acidez volátil e concentrações de ésteres quando comparados com a monocultura de *S. cerevisiae*, afetando positivamente as qualidades sensoriais da bebida.

A maioria das leveduras não-*Saccharomyces* parecem não ser tolerantes a concentrações de etanol superiores a 5%-7% (v/v) e isto explica a sua perda de viabilidade quando a fermentação avança além do seu estágio médio da fase logarítmica. Entretanto, leveduras como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *P. kudriavzevii*, *Candida pulcherima* e *Hansenula anomala* têm sido encontradas interagindo umas com outras em mostos de uva contendo até 15% (v/v) de etanol produzido a 10°C a 15°C, mas perdas de viabilidades são observadas quando a temperatura eleva-se a 30°C (FLEET, 2003).

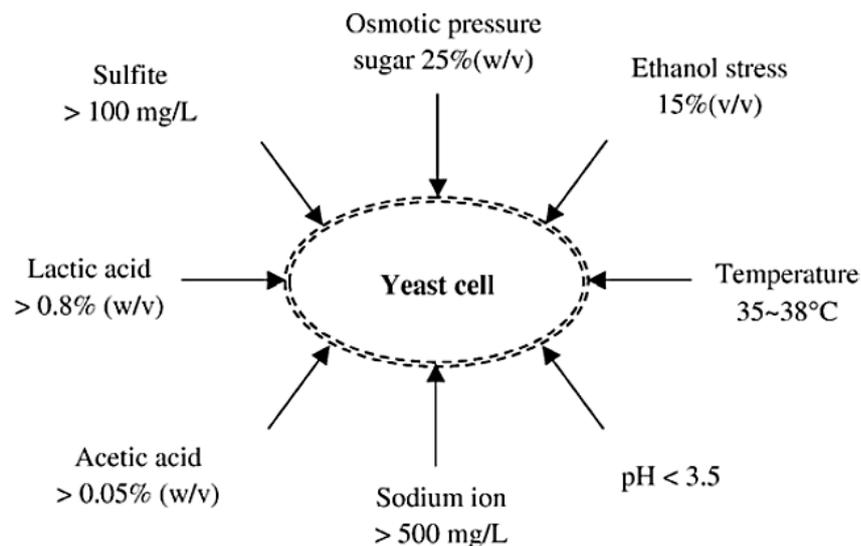
N'guessan *et al.* (2010) mostraram que um isolado de *S. cerevisiae* era capaz de atingir maiores concentrações de etanol a 35°C interagindo com *Cândida tropicalis* (proporção celular de 1:2) na produção de *tchapalo*, uma cerveja da África feita a partir de sorgo. Em um estudo mais recente, De Bari *et al.* (2013) demonstraram que o uso das leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *S. cerevisiae* em co-cultura aumenta consideravelmente o consumo de xilose e glicose e a produção de etanol quando comparadas com a cultura simples de *S. stipitis* livre ou imobilizada. Por outro lado, Jeon *et al.* (2007) desenvolveu um sistema de biorreatores em série utilizando um processo contínuo de co-cultivo do fungo *Aspergillus niger* e *S. cerevisiae* para a produção de etanol a partir de amido. O etanol produzido atingiu um nível de 2,78% (v/v), cerca de 80% do valor máximo teórico produzido a partir de 55 g/L de glicose.

Interações não só podem ocorrer entre diversos tipos de levedura, mas também entre cultivos de bactérias e leveduras (FLEET, 2008). Co-culturas de bactérias e leveduras têm sido reportadas como inóculos favoráveis em vários processos, como no caso da produção de *Kefir*, bebida láctea fermentada. *Lactobacillus kefiranofaciens*, principal responsável pela produção desta bebida, quando crescido em culturas mistas junto com *S. cerevisiae* não só reduz a concentração de ácido láctico, mas também aumenta o crescimento celular e a produção do *Kefir* por *L. kefiranofaciens* (CHEIRSILP *et al.*, 2003).

## 1.6. Estresses fermentativos

As leveduras industriais são submetidas, ao longo da fermentação, a diversos estresses simultâneos impostos pelo próprio processo, tais como: concentrações altas de etanol, alta pressão osmótica, baixo pH, altas temperaturas, presença de

contaminantes principalmente bactérias e muitos outros (Figura 2) (BAI *et al.*, 2008). Todos estes fatores de estresse ainda podem ser intensificados pela prática da reciclagem celular, levando a perdas de viabilidade das células e da capacidade de fermentação destas (BASSO *et al.*, 2011). Deste modo, as células de leveduras adotam estratégias que as levam a modificar o seu metabolismo e fisiologia, regulando a sua taxa de crescimento para garantir a sua sobrevivência em condições adversas (FLEET, 2011).



**Figura 2** – Potenciais estresses fermentativos enfrentados pela levedura *S. cerevisiae* durante o processo de produção de etanol (Fonte: BAI *et al.*, 2008).

### 1.6.1. Estresse térmico

Os processos industriais para a produção de etanol ocorrem na faixa de temperatura de 28°C a 35°C. Entretanto, o resfriamento pode não ser eficiente na remoção do calor apesar do curto tempo de fermentação, atingindo temperaturas de até 40°C, especialmente em períodos mais quentes como o verão (WHEALS *et al.*, 1999; LALUCE, 1991; AMORIM *et al.*, 2005). Além da economia de energia devido à redução de custos com o resfriamento, as principais vantagens das leveduras termotolerantes são: (1) maior taxa de sacarificação e fermentação nos processos SSF; (2) maior facilidade de destilação e (3) menor risco de contaminação (KUMAR *et al.*, 2009).

Várias pesquisas de laboratório foram feitas nas últimas décadas na busca por leveduras tolerantes a altas temperaturas, já que uma economia significativa nos custos de produção torna-se evidente, se a temperatura do fermentador for mantida a  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  (ABDEL-BANAT *et al.*, 2010). Entre as leveduras termotolerantes, *Kluyveromyces marxianus* tem recebido muita atenção devido a sua alta tolerância térmica, uma vez que consegue crescer a temperaturas acima de  $42^{\circ}\text{C}$  (LIMITONG *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2009). Kumar *et al.* (2009) demonstraram a capacidade da linhagem IIPE453 de *K. marxianus* de crescer e fermentar glicose a  $50^{\circ}\text{C}$ .

De acordo com Walker (1998), a exposição a temperaturas elevadas provoca a quebra das ligações de hidrogênio, resultando na desnaturação das proteínas e dos ácidos nucleicos, aumentando a fluidez da membrana e reduzindo a permeabilidade desta pelos nutrientes essenciais, além de diminuir a atividade respiratória da célula e a divisão celular. As células de leveduras mostram uma resposta rápida de defesa quando expostas a temperaturas elevadas, como o aumento na síntese de proteínas do choque térmico ou *heat-shock proteins* (Hsps) e a alteração na composição dos ácidos graxos da membrana fosfolipídica (FLEET, 2011). Observa-se também um grande acúmulo de trealose (KIM *et al.*, 1996), glicerol (ALDIGUIER *et al.*, 2004) e outros metabólitos secundários, assim como algumas enzimas, tais como: catalase e superóxido dismutase mitocondrial (WALKER, 1998).

### 1.6.2. Estresse alcoólico

Em vista dos elevados níveis de etanol produzidos no final de cada ciclo de fermentação nos processos industriais (8-12%, v/v), a concentração de álcool é um dos fatores estressantes que mais afeta a levedura durante o processo fermentativo (BASSO *et al.*, 2011). O papel inibitório do etanol sobre a levedura *S. cerevisiae* não está totalmente esclarecido. No entanto, o principal alvo do etanol parece ser a membrana citoplasmática das células (ALEXANDRE *et al.*, 2001). Deste modo, A exposição a concentrações elevadas de etanol aumenta a fluidez das membranas levando a perdas em sua estrutura e função. O etanol, não somente inibe o crescimento e a reprodução celular, como também reprime o sistema de transporte da glicose, limitando a produção de etanol (WALKER, 1998).

De acordo com Basso *et al.* (2011), a reutilização celular impõe uma condição de estresse severa para as linhagens industriais. As células de levedura devem manter uma alta viabilidade no final de cada ciclo de fermentação a fim de serem capazes de lidar com o seguinte. É por isso que uma linhagem pode ter um bom desempenho em um único ciclo de fermentação, atingindo um teor até de 18% (v/v) de etanol final, porém o rendimento fermentativo desta linhagem cai consideravelmente quando é reciclada.

Outro efeito importante do etanol pode estar relacionado com sua ação sobre a invertase, enzima responsável pela quebra da sacarose nos açúcares fermentescíveis, glicose e frutose. A invertase perde 50% da sua atividade após 30 minutos em presença de 120 g/L de etanol a uma temperatura de 30°C (ZECH; GORISCH, 1995). Além disto, sabe-se que a toxicidade do etanol aumenta com a elevação da temperatura (ALDIGUIER *et al.*, 2004).

### 1.6.3. Estresse ácido

A tolerância à acidez é um fator muito importante nos processos industriais, já que diversos ácidos são formados e excretados no meio durante a fermentação, sobretudo pelas bactérias contaminantes, sendo as bactérias lácticas e acéticas as mais abundantes no processo (*Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.* e *Acetobacter sp.*) (LUCENA *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2004).

A levedura *S. cerevisiae* cresce e fermenta a pH 4,5 – 6,5 (WALKER, 1998). Variações no pH do meio podem levar à diminuição ou perda total da atividade catalítica das enzimas envolvidas na produção de etanol. Quando o pH do meio externo é muito baixo (2,5 - 3,5) a forma não dissociada dos ácidos fracos difundem-se através da membrana plasmática da levedura. Estes ácidos dissociam-se produzindo ânions e prótons diminuindo o pH interno da célula (DORTA *et al.*, 2006). A fim de restituir a homeostase celular, a célula bombeia os prótons para o exterior por meio da H<sup>+</sup>-ATPase. Isso pode resultar em uma queda do ATP celular diminuindo o *pool* de energia destinado ao crescimento e funções metabólicas essenciais da célula (DORTA *et al.*, 2006). Mesmo que as leveduras possam tolerar pHs baixos, o tratamento do creme de levedura (pé-de-cuba) realizado nos processos industriais com ácido sulfúrico (pH 1,8-2,5) após cada ciclo de fermentação com a finalidade

reduzir a contaminação bacteriana, pode provocar alterações fisiológicas nas células, levando muitas vezes a perdas de viabilidade e, conseqüentemente, quedas no rendimento do processo.

## ***Objetivos***

---

## Objetivo geral

Este trabalho visou à produção de etanol a temperaturas elevadas em fermentações sucessivas com reutilização de células utilizando duas linhagens de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii*.

## Objetivos específicos

- a) Padronizar as condições de fermentação para a produção de etanol a partir do melaço da cana-de-açúcar usando o inóculo misto das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii* em um processo de batelada alimentada na faixa de 34°C a 42°C.
- b) Utilizar o inóculo misto em um sistema de reciclo de células a temperaturas elevadas (40°C-42°C).
- c) Comparar diferentes estratégias de revitalização celular durante a reutilização da cultura mista em vários ciclos sucessivos de fermentação.
- d) Avaliar e comparar a tolerância das leveduras *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* e uma linhagem industrial (PE-2) aos ácidos acético e láctico a temperaturas elevadas.
- e) Avaliar a tolerância da cultura mista de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* a um coquetel de inibidores presente nos hidrolisados do bagaço de cana-de-açúcar.

## ***Material e Métodos***

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Leveduras e manutenção de culturas

Foram utilizadas as seguintes leveduras:

- a) A linhagem IQAr/45-1 da levedura híbrida *Saccharomyces cerevisiae* (protocolo PI0806141-6 A2, INPI Brasil).
- b) Linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* (gentilmente doada pelo Prof. Luiz Carlos Basso da ESALQ-USP).
- c) Linhagem 195B de *Pichia kudriavzevii*, isolada de um fermentador contínuo de cinco estágios operado a altas temperaturas e identificada neste laboratório (GALLARDO *et al.*, 2011).

As culturas foram estocadas a 4°C em meio sólido YPD e em meio líquido contendo glicerol 80% a -80°C.

#### 3.2. Meios de cultura

##### 3.2.1. Meio YPD (yeast extract-peptone-dextrose)

O meio YPD foi preparado segundo Sherman e Hicks (1991) e apresentou a seguinte composição (p/v):

Peptona	2%
Glicose	2%
Extrato de levedura	1%
Ágar	2%

Os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada sendo o ágar adicionado por último. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm e ainda quente foi distribuído em placas de Petri.

### 3.2.2. Matéria-prima e tratamento

A matéria-prima utilizada no presente trabalho foi o melaço de cana-de-açúcar doado pela Usina São Matinho, contendo 80-90° Brix e o melaço doado pela Usina Zilor, contendo 70-80° Brix. Esta matéria-prima passou por um processo de clarificação antes de seu uso: o melaço em estoque foi diluído duas vezes e, em seguida, o pH foi ajustado a 4,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mol/L antes de ser submetido ao aquecimento pelo vapor da autoclave durante 40 min. Em seguida, deixou-se decantar os resíduos sólidos por uma noite e coletou-se o sobrenadante (LALUCE *et al.*, 1991). Após a clarificação, foi realizada a dosagem de açúcares redutores totais (ART). O melaço clarificado foi estocado a 4°C para uso em um período de até duas semanas.

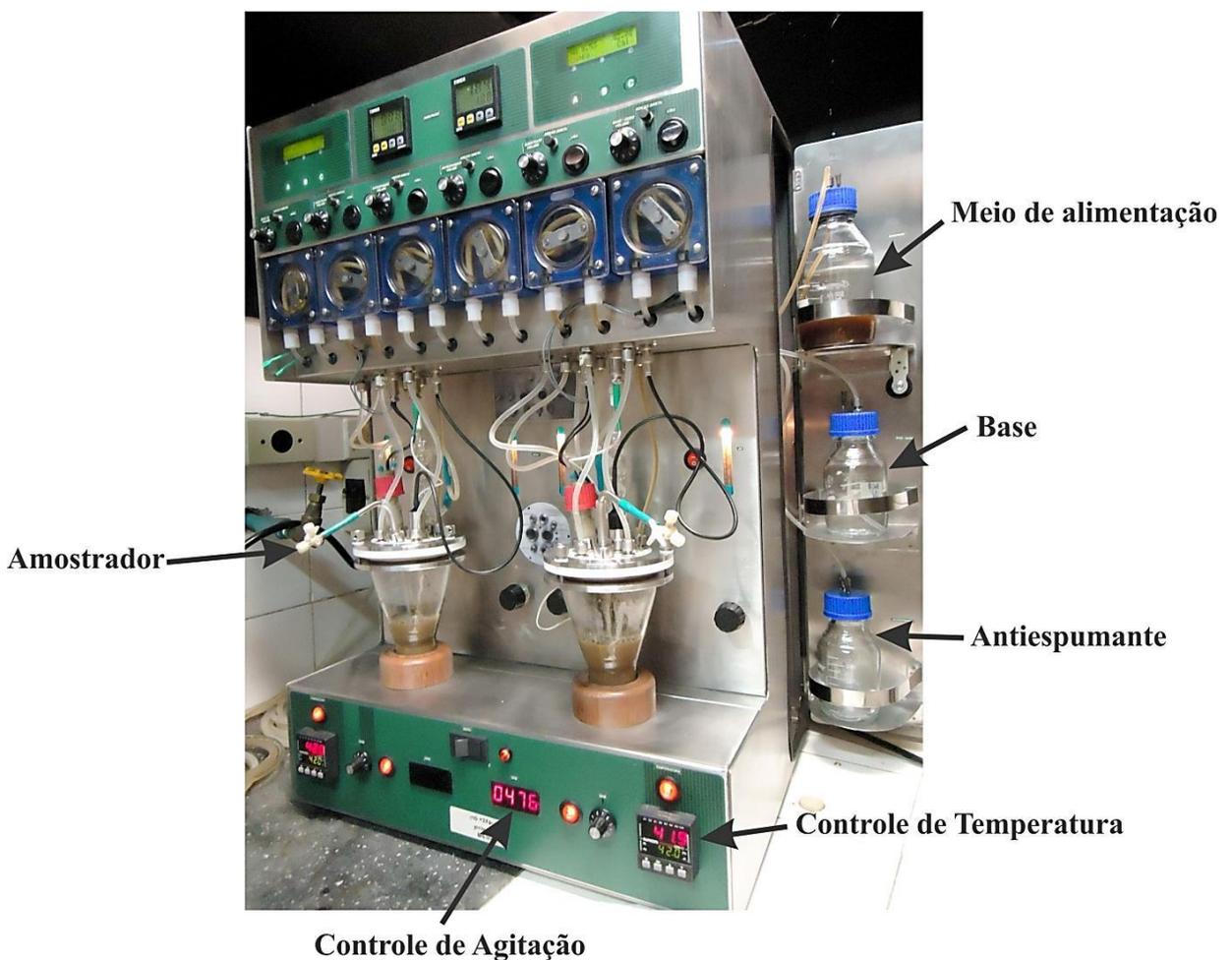
### 3.3. Propagação do inóculo

O inóculo das duas leveduras (linhagem 195B e IQAr/45-1) foi propagado, separadamente, em concentrações crescentes de melaço (3%, 5%, 8% e 12% de ART) para assim adaptá-los às altas concentrações de açúcar e etanol. Os frascos contendo melaço 3% (ART) foram inoculados com uma alça cheia de células da cultura estoque de cada levedura e incubados durante 12 h em mesa giratória operando a 34°C-37°C, dependendo da temperatura de fermentação. Após este tempo de propagação, o conteúdo do frasco foi vertido em um novo frasco contendo volume igual de melaço 5% (ART). Este procedimento foi repetido transferindo-se a cultura para os frascos contendo melaço 8% (ART), os quais foram transferidos, a seguir, para frascos contendo melaço 12% (ART) para uma quarta e última etapa de propagação de 12 h. Após a etapa de propagação, as células foram coletadas por centrifugação a 4700 rpm por 10 min. (centrifuga Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6R), lavadas com água destilada estéril e finalmente suspensas em água para formar o creme ou leite de levedura a ser utilizado como inóculo das fermentações.

### 3.4. Fermentações em batelada alimentada

Para o ajuste das condições de fermentação para a produção de etanol a partir de melaço foi utilizado um sistema semiautomático de quatro reatores (Marconi S. A.,

modelo MA 515/2X500) equipados com dispositivos independentes para o ajuste e controle do pH, temperatura, agitação, vazão de alimentação e amostragem (Figura 3). Os reatores com capacidade de 350 mL foram inoculados com a mistura de células das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii* e alimentados com melaço estéril durante 4 h (vazão de alimentação de 0,44 mL/min) atingindo um volume final de fermentação de 150 mL. A proporção inicial das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* no inóculo misto foi ajustada em um trabalho anterior e expressa em m/v como 1:3 (GALLARDO, 2010).



**Figura 3** - Sistema de reatores utilizado nas fermentações em batelada alimentada (Marconi S. A.)

Condições tais como concentração de açúcar na alimentação, concentração de inóculo misto e temperatura foram ensaiadas e padronizadas. Os experimentos foram realizados em duplicata e curvas de tempo de fermentação foram obtidas para a

viabilidade celular, biomassa, concentração de etanol e concentração de açúcar residual total.

### **3.5. Acompanhamento da permanência das leveduras durante a fermentação**

Amostras foram retiradas do fermentador e cultivadas em meio sólido YPD e incubadas por 48 h a 30°C. A permanência das células foi determinada por contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), uma vez que as colônias das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* apresentam diferente morfologia neste meio.

### **3.6. Fermentações em batelada alimentada com reutilização de células**

As fermentações sucessivas em batelada alimentada com reutilização de células foram realizadas utilizando o sistema de reatores descrito no item 3.4. Os fermentadores foram inoculados com  $24,0 \pm 1,0$  g/L da co-cultura das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção 1:3, m/v) e alimentados com melaço  $25,7\% \pm 1,0\%$  ART durante 4 h (vazão de alimentação de 0,44 mL/min), sendo a concentração final de açúcares no meio  $18,0 \pm 1,0\%$  ART e o volume final de fermentação 150 mL. A temperatura de fermentação foi de 40°C e 42°C. Amostras foram coletadas no início e ao fim de cada ciclo fermentativo para determinação da viabilidade, biomassa, produção de etanol e glicerol, açúcar residual e contagem de células (UFC/mL). Duas condições de fermentação em batelada alimentada com reutilização de células foram estudadas.

#### **3.6.1. Fermentação em batelada alimentada com reutilização de células e revitalização das células entre os ciclos**

Consistiu em coletar as células por centrifugação após cada ciclo de fermentação, lavá-las com água destilada e suspende-las em um meio denominado de revitalização.

### 3.6.1.1 Preparo do meio de revitalização

As células retiradas do fermentador após cada ciclo foram suspensas em melaço 8% ART e incubadas em mesa giratória a 34°C e 125 rpm durante aproximadamente 12 h. Duas estratégias de revitalização foram testadas:

- a) Melaço contendo um coquetel de sais: 0,01% de ZnSO<sub>4</sub>; 0,01% de MgSO<sub>4</sub> e 0,1% DAP (di-amônio-fosfato).
- b) Melaço contendo 1 g/L de nitrogênio orgânico obtido a partir de um lisado celular de levedura.

A padronização das concentrações de sais e nitrogênio orgânico no meio de revitalização foi realizada em um trabalho anterior neste laboratório (CORADELLO, 2012).

### 3.6.2. Fermentação em batelada alimentada com reutilização de células e sem revitalização das células entre os ciclos

A segunda condição de fermentação com reutilização consistiu em realizar as fermentações de maneira sucessiva e sem revitalização das células. Para isto, as células foram coletadas por centrifugação após cada ciclo, lavadas com água destilada e imediatamente inoculadas no reator para dar início a um novo ciclo fermentativo.

## 3.7. Determinação da resistência aos inibidores da fermentação

A fim de verificar a resistência das leveduras *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* aos inibidores da fermentação realizaram-se testes qualitativos (plaqueamento em meio sólido) e quantitativos (fermentações) para determinar o efeito destes sobre a viabilidade celular, produção de biomassa e de etanol.

### 3.7.1 Ensaios qualitativos

As culturas estoques das leveduras *S. cerevisiae* (linhagens IQAr/45-1 e PE-2) e de *P. kudriavzevii* (linhagem 195B) foram inoculadas em várias concentrações ( $10^5$  cel/mL a  $10^8$  cel/mL) em meio sólido YPD contendo os seguintes inibidores: ácido acético (0,0-0,9% m/v), ácido láctico (0,0-6,0% m/v) (NARENDRANATH *et al.*, 2001) e etanol (0,0-12,0% v/v). A análise foi baseada na observação qualitativa do crescimento das células inoculadas após 24 h de incubação a 30°C.

### 3.7.2 Ensaios quantitativos

Para os ensaios de fermentação foi utilizado o sistema de quatro reatores, descrito no item 3.4. As concentrações dos inibidores foram estabelecidas em um trabalho anterior e resultaram em um coquetel contendo a seguinte mistura otimizada de inibidores (MASIERO, 2011):

Ácido acético	20,0 mmol/L	1,20 g/L
Ácido fórmico	3,3 mmol/L	0,15 g/L
Ácido levulínico	21,6 mmol/L	2,51 g/L
Furfural	6,6 mmol/L	0,63 g/L
Vanilina	5,0 mmol/L	0,76 g/L

Soluções estoques deste coquetel concentradas uma vez, duas vezes e quatro vezes foram adicionadas ao meio de alimentação. Os fermentadores foram inoculados com  $24,0 \pm 1,0$  g/L da co-cultura das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção 1:3, m/v) e alimentados com melaço 25,7% $\pm$ 1,0% ART contendo o coquetel de inibidores durante 4 h a 34°C.

### 3.8. Ensaios analíticos e microbiológicos

Os seguintes ensaios foram realizados em duplicata:

### 3.8.1. Biomassa celular

A biomassa de ambas as linhagens 195B e IQAr/45-1 foi determinada por medidas de densidade ótica a 570 nm e convertidas a valores de massa seca (g/L) utilizando uma curva padrão obtida para cada linhagem (Figuras 1 e 2 do Apêndice A). A equação para a determinação da biomassa para a linhagem 195B de *P. kudriavzevii* foi:

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs-0,021}{2,189} \times dil \quad (1)$$

A equação referente à linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* foi a seguinte:

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs-0,026}{1,894} \times dil \quad (2)$$

### 3.8.2. Viabilidade celular

A viabilidade das células foi determinada pelo método do azul de metileno (LEE *et al.*, 1981). Ao contato com o reagente azul de metileno as células viáveis permaneceram incolores, enquanto as mortas tornaram-se azuis. A viabilidade foi expressa em valores de porcentagem e calculada pela seguinte relação:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células totais}} \times 100 \quad (3)$$

#### Composição do reagente azul de metileno

Glicose	5,0 g
KCl	0,21 g
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,24 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 g
NaCl	4,5 g
Azul de metileno	0,125 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada, sendo o reagente estocado a temperatura ambiente.

**Procedimento:** a suspensão de células foi diluída no reagente azul de metileno, após 5 minutos de contato com o corante, realizou-se a contagem das células utilizando a câmara de Neubauer e microscópio ótico com aumento de 40X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

### 3.8.3. Contagem do número de células

O número de células por mL ( $n^{\circ}\text{cel/mL}$ ) foi determinado pela seguinte fórmula utilizando a câmara de Neubauer e microscópio com aumento de 40X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany):

$$N^{\circ}\text{células/mL} = \text{contagem} \times 5 \times 10^4 \times \text{dil} \quad (4)$$

### 3.8.4. Açúcar Redutor total (ART)

O ART foi determinado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1951). Uma curva padrão de glicose 0,2%, (m/v) foi obtida para relacionar a absorbância com a concentração de açúcar nos hidrolisados (Figura 3 do Apêndice A). A quantidade de açúcar redutor total foi expressa em g/L e calculada pela seguinte relação:

$$\text{ART (g/L)} = \frac{\text{Abs}+0,096}{31,941} \times 10 \times \text{dil} \quad (5)$$

#### Composição do reagente DNS

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	1,0 g
Tartarato de Sódio e Potássio tetrahidratado	30,0 g
Hidróxido de Sódio	1,6 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada, a seguir adicionou-se o ácido dinitrosalicílico que fora dissolvido separadamente. O reagente foi estocado a temperatura ambiente.

**Procedimento:** as amostras retiradas dos reatores foram centrifugadas a 10400 rpm por 3 min a 4°C (centrifuga Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6R), o resíduo celular foi descartado enquanto o sobrenadante foi diluído em água destilada, hidrolisado em HCl 6 mol/L por 7 min a 60°C e neutralizado com NaOH 2,4 mol/L. Após a hidrolise foram adicionados 2 mL do reagente de DNS, os tubos de reação foram então incubados em banho de água fervente e após 5 min foram colocados no gelo. As medidas de absorbância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro a 546 nm (espectrofotômetro marca Bioespectro SP-22) uma vez que os tubos atingiram temperatura ambiente.

### 3.8.5. Etanol

O etanol produzido foi medido utilizando um cromatógrafo a gás (Modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil), operando com um detector de ionização de chama, uma coluna empacotada PAD/2499 e calibrado com soluções padrões de concentração 0,5% e 1,0% (v/v). As concentrações de etanol foram expressas em g/L.

**Procedimento:** o sobrenadante das amostras foi diluído em água destilada, 4µL desta solução foram injetados no cromatógrafo para obter as medidas de concentração de etanol em % (v/v) que depois foram convertidas a g/L.

### 3.8.6. Glicerol interno e externo

A dosagem de glicerol foi feita utilizando-se o kit para Triglicérides GPO-Trinder (Laborclin). Foi obtida uma curva padrão usando-se uma solução de glicerol 0,208 mg/mL para relacionar a absorbância com a concentração de glicerol (Figura 4 do Apêndice A). As concentrações de glicerol interno e externo foram expressas em  $\mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$  e mg/mL, respectivamente e calculadas pela seguinte relação:

$$\text{glicerol (mg/mL)} = \frac{\text{Abs}-0,001}{92,172} \times \text{dil} \quad (6)$$

**Procedimento:** para a dosagem do glicerol interno a cada 100 mg de células foi adicionado 1 mL de tampão Tris/HCl 0,01 mol/L, pH 7,2. O rompimento celular foi realizado com 1 g de microesferas de vidro (*glass beads*) de diâmetro 0,4-0,6 mm agitando por 4 vezes (por período de 30 seg. seguido de 30 seg. em banho de gelo). As microesferas de vidro e as células foram separadas por centrifugação a 10400 rpm por 5 min a 4°C. Para a dosagem do glicerol externo as amostras foram centrifugadas a 10400 rpm por 3 min a 4°C sendo o resíduo celular descartado. Os sobrenadantes nos dois casos foram usados na reação colorimétrica com leituras em 500 nm.

### 3.8.7. Nitrogênio livre

A fonte de nitrogênio orgânico foi obtida a partir de um lisado celular de levedura preparado utilizando-se a levedura seca comercial Pe-2. A dosagem do nitrogênio orgânico livre presente no lisado celular foi realizada como descrito por Coradello (2012) usando o método da ninidrina (ABERNATHY *et al.*, 2009). Diferentes metodologias foram usadas para aumentar o teor de nitrogênio deste extrato. Os detalhes destes procedimentos foram omitidos no trabalho de Coradello (2012), pois estavam sujeitos ao pedido de uma patente para esta metodologia.

Foi obtida uma curva padrão usando-se uma solução de glicina 1072 mg/L para relacionar a absorvância com a concentração de aminoácidos livres (CORADELLO, 2012). Os resultados foram expressos em mg/L usando a seguinte relação:

$$\text{glicina (mg/L)} = \frac{\text{Abs}-0,0096}{0,0407} \times \text{dil} \quad (7)$$

#### Composição do reagente de Ninidrina:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Ninidrina	0,5 g
Frutose	0,3 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

### 3.8.8. Determinação da atividade invertásica

A atividade invertásica ligada à parede das células foi realizada conforme descrito por Naudin *et al.* (1986). A reação ocorreu através da incubação de 1,5 mL de suspensão celular (amostra retirada do reator de concentração 1 g/L) diluída com 1,0 mL da solução de sacarose 10% (m/v) e tampão acetato de sódio 0,2 mol/L pH 4,7 a 30°C durante 3 min. Os açúcares redutores formados como resultado da hidrólise da sacarose foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1951) como descrito no item 3.8.4, e utilizando a equação (5) para relacionar a absorbância com a concentração de açúcares formados após a reação enzimática. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de açúcares redutores em  $\mu\text{mol}$  liberados em 1 min, nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em U/mg de célula.

## 3.9. Cálculo dos indicadores de fermentação

### 3.9.1 Fator de conversão de substrato em produto

O fator de conversão do substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi calculado pela seguinte relação:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (8)$$

Onde  $P_f$  é a concentração de etanol final em g/L,  $P_0$  é a concentração inicial de etanol em g/L,  $S_f$  é a concentração de açúcar final em g/L e  $S_0$  é a concentração inicial de açúcar em g/L.

### 3.9.2 Fator de conversão de substrato em biomassa

O fator de conversão do substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) foi calculado pela seguinte relação:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (9)$$

Onde  $X_f$  é a concentração celular final,  $P_0$  é a concentração celular inicial,  $S_f$  é a concentração de açúcar final e  $S_0$  é a concentração inicial de açúcar.

### 3.9.3 Rendimento fermentativo

O rendimento foi calculado com base na estequiometria da conversão de açúcar em etanol, onde 100 g de glicose são transformadas em 51,11 g ou 64 mL de etanol:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100 \quad (10)$$

### 3.9.4 Produtividade

A produtividade foi calculada pela seguinte relação:

$$\text{Produtividade (g/L/h)} = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{tempo}} \quad (11)$$

Onde o tempo de fermentação foi considerado como o instante no qual a produção de etanol e o consumo de açúcares tornaram-se constantes.

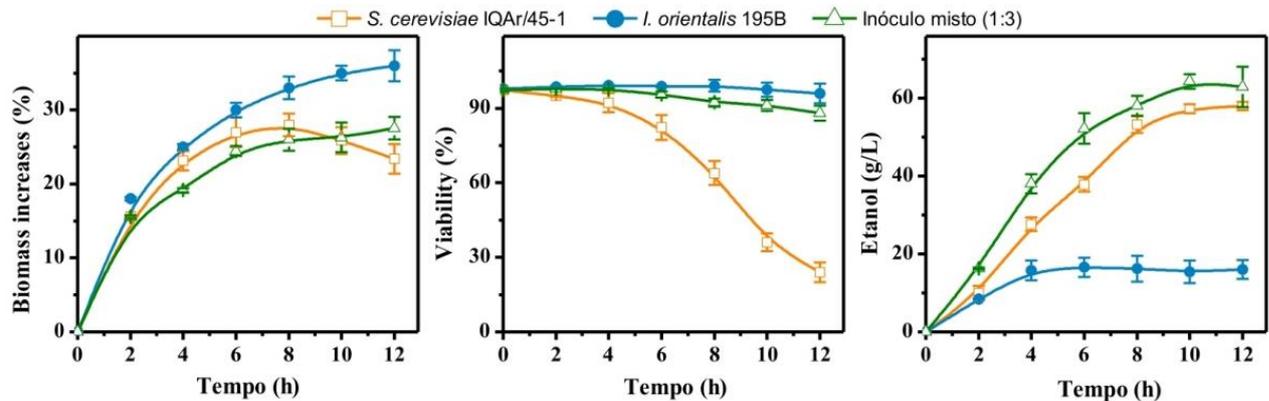
## ***Resultados e Discussão***

---

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos descritos neste trabalho tiveram por finalidade prosseguir os estudos de fermentação de melaço de cana-de-açúcar utilizando culturas mistas a altas temperaturas, desenvolvidos em um trabalho anterior (GALLARDO, 2010). Naquele trabalho, foi observado o sinergismo entre duas espécies de levedura: *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* na fermentação de melaço para a produção de etanol a 42°C. Assim, foram realizadas fermentações de melaço a 42°C utilizando as culturas puras de ambas as leveduras e a cultura mista destas. A figura 4 mostra uma perda muito grande de viabilidade das células de *S. cerevisiae* a partir das 6 horas de fermentação. Provavelmente este fato seja devido à alta temperatura de fermentação. No entanto, o reator inoculado com a cultura pura de *P. kudriavzevii* e a mistura das duas leveduras mostraram poucas variações em viabilidade. Ainda na mesma figura observa-se que a mistura das duas leveduras permitiu elevar a produção de etanol a 42°C, sendo este valor muito próximo ao valor de etanol obtido com a levedura *S. cerevisiae* após 12 horas de fermentação, porém com viabilidade menor a 30%. Apesar dos valores de  $Y_{P/S}$  serem próximos na fermentação com *S. cerevisiae* e com a co-cultura, as diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ) em viabilidade mostram a vantagem de se utilizar a co-cultura para a fermentação de melaço a temperaturas tão altas quanto 42°C. Fica evidente a necessidade das duas leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* que apresentaram um sinergismo durante a fermentação do melaço e que permitiu aumentar o consumo dos açúcares e a manutenção da viabilidade final das células a 42°C. Este sinergismo estaria baseado na deficiência da levedura *P. kudriavzevii* para produzir ou secretar a enzima invertase e pela tolerância desta levedura a altas temperaturas. Assim, a levedura *S. cerevisiae* que é susceptível a temperaturas maiores de 40°C estaria produzindo invertase suficiente para hidrolisar, nas primeiras horas de fermentação quando ainda a viabilidade é alta, a sacarose contida no melaço. Os açúcares redutores produto da hidrólise da sacarose estariam disponíveis para a sua conversão em etanol pela *kudriavzevii* que não é afetada com temperaturas elevadas (42°C). Deste modo, o inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (10 g/L, proporção 1:3 em m/v) foi capaz de fermentar melaço 15% (ART) em batelada simples a 42°C. Após 12 h obteve-se uma concentração de etanol igual

a 63 g/L equivalente a um rendimento teórico de 83,89% sem deixar quantidades significativas de açúcar residual no meio.



**Figura 4** – Comparação da fermentação de melaço utilizando as culturas puras e mistas das leveduras *S. cerevisiae* (linhagem IQAr/45-1) e *P. kudriavzevii* (linhagem 195B) a 42°C: A concentração de inóculo misto ou simples foi 10 g/L: (-□-) *S. cerevisiae*, (-●-) *P. kudriavzevii* ou *I. orientalis*, (-△-) inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v).

Visto que o estudo de um processo fermentativo envolve o desenvolvimento de uma estratégia de otimização para atingir uma maior produtividade de etanol, decidiu-se validar as condições de fermentação já padronizadas em batelada simples para um processo de fermentação em batelada alimentada e estudar a possibilidade de reutilização celular durante vários ciclos sucessivos de fermentação. Neste processo em batelada alimentada aumentou-se o volume de meio tornando o sistema mais complexo.

Primeiramente, padronizaram-se as condições de fermentação de melaço em batelada alimentada a 42°C usando o inóculo misto. A seguir estudou-se a reutilização celular e o efeito da revitalização do leite de levedura com adição de um coquetel de sais ou uma fonte de nitrogênio orgânico entre os ciclos sucessivos de fermentação. Por fim, determinou-se a resistência das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* aos estresses fermentativos, assim como também a tolerância destas duas leveduras a um coquetel de inibidores presentes nos hidrolisados do bagaço de cana-de-açúcar.

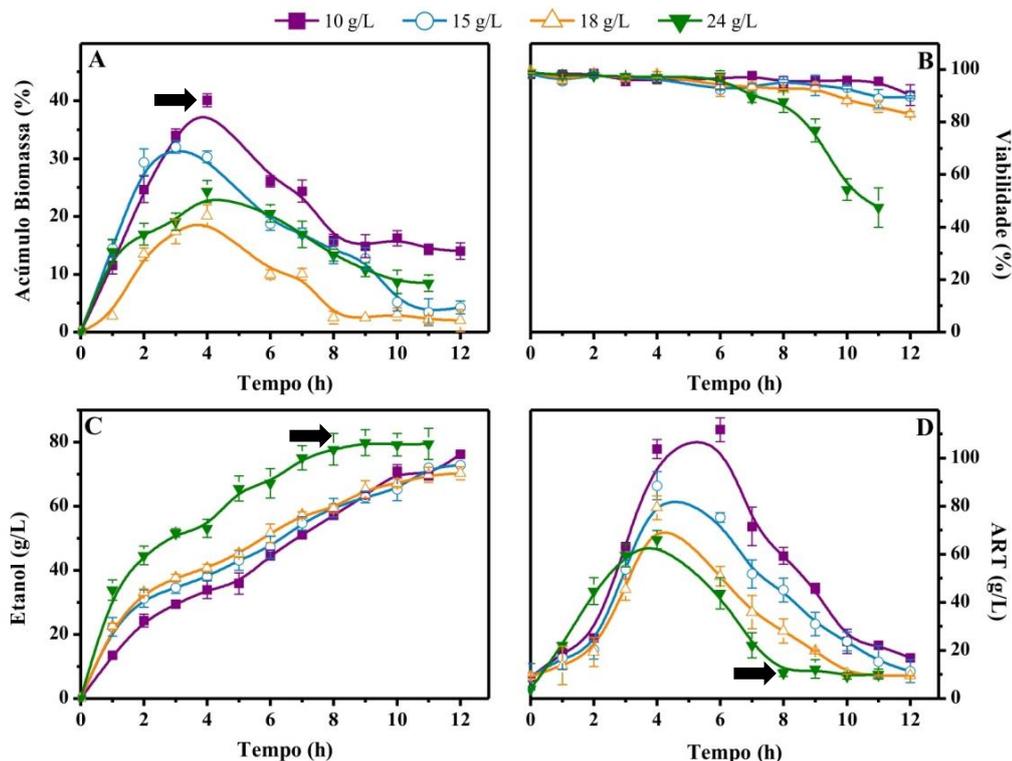
## 4.1. Padronização das condições de fermentações em batelada alimentada

### 4.1.1. Efeito da concentração do inóculo misto

Os estudos de padronização foram iniciados com o aumento da concentração inicial de células da cultura mista com o objetivo de atingir valores altos de produtividade no processo de fermentação. Variou-se, então, a concentração de inóculo na faixa de 10 g/L a 24 g/L (proporção 1 parte *S. cerevisiae*: 3 partes de *P. kudriavzevii*, em m/v). Comprovou-se, como ilustrado na Figura 5, que existem diferenças entre as velocidades de consumo de açúcar quando se usam diferentes concentrações de inóculo. Como esperado, observou-se que utilizando um inóculo maior que 10 g/L é possível reduzir consideravelmente o tempo de fermentação a 42°C. Assim, no tempo de 8 h observou-se um consumo quase total dos açúcares quando um inóculo misto igual a 24 g/L foi utilizado. Porém, a viabilidade celular mostrou quedas significativas a partir deste tempo, possivelmente causado pelo esgotamento dos nutrientes do meio. Nestas condições, a produção máxima de etanol atingiu uma concentração de  $78,76 \pm 2,87$  g/L ( $9,98 \pm 0,36\%$ , v/v), equivalente a uma produtividade de  $9,85 \pm 0,38$  g/L/h e rendimento teórico 90,67%, sendo a concentração final dos açúcares no meio  $18,0 \pm 1,0\%$  ART e o volume final de fermentação 150 mL após 4 h de alimentação. Além disto, observou-se que o acúmulo máximo de biomassa para todas as condições ensaiadas foi atingido ao termino da alimentação (4 h) e foi maior quando um inóculo baixo foi utilizado, provavelmente, devido à maior disponibilidade de nutrientes no meio.

A literatura descreve que a levedura *P. kudriavzevii* é encontrada nas fases iniciais da produção de vinhos como sendo uma levedura sensível ao etanol (FLEET, 2003). Contudo, no presente trabalho foram realizadas fermentações com *P. kudriavzevii* a 42°C, temperatura na qual o etanol é bastante tóxico sendo possível obter níveis bastante altos de etanol ( $78,76 \pm 2,87$  g/L).

Pelo exposto acima, selecionou-se um inóculo misto de 24 g/L para os experimentos descritos a seguir e padronizou-se o tempo de fermentação em 8 h, tempo no qual a produção de etanol e açúcares residuais tornaram-se constantes, como é mostrado na Figura 5.



**Figura 5** – Efeito da concentração do inóculo misto sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) durante a fermentação em batelada alimentada de melaço 18% ART usando *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C. A concentração inóculo misto foi: 10 g/L (-■-), 15 g/L (-○-), 18 g/L (-△-) e 24 g/L (-▼-).

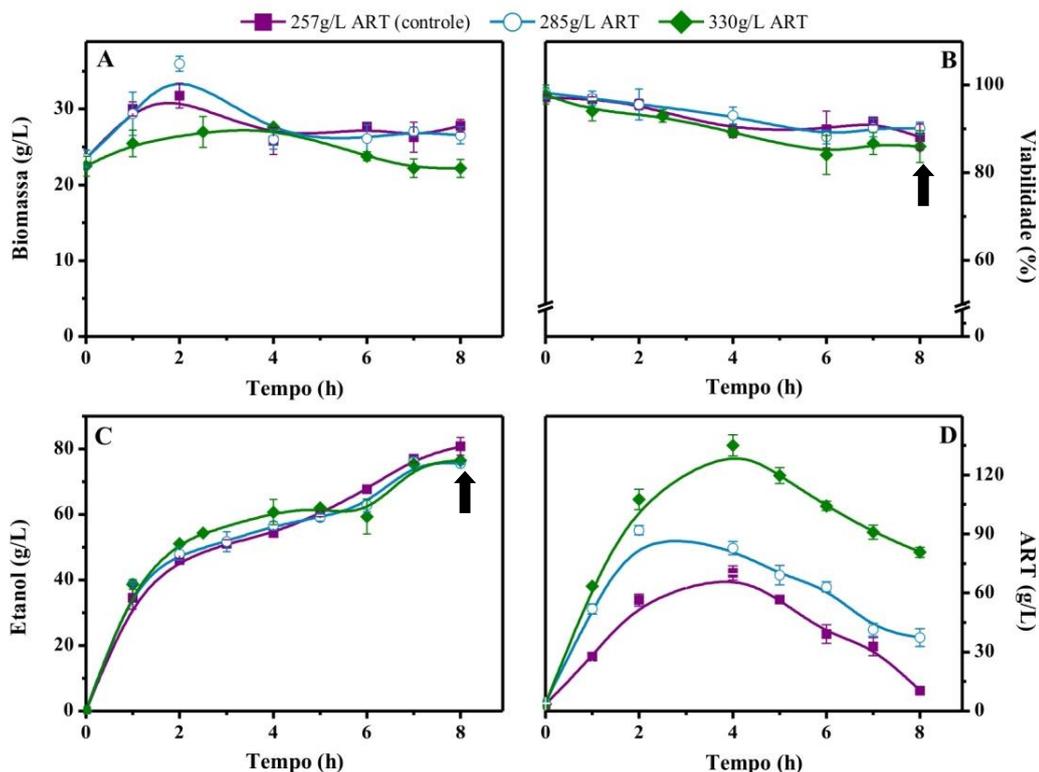
#### 4.1.2. Efeito da concentração de açúcares no meio de alimentação

Visando uma maior produção de etanol pela co-cultura, decidiu-se estudar o efeito da concentração dos açúcares redutores totais presentes no meio de alimentação sobre a cultura mista de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii*. Na Figura 6 é mostrado que a elevação do ART no meio de alimentação diminuiu a formação de biomassa e prolongou o tempo de fermentação. Acima de 330 g/L de ART no meio de alimentação, o acúmulo de biomassa diminuiu consideravelmente devido à inibição pelo substrato comprovada pela alta concentração de açúcar residual no final da fermentação ( $80,76 \pm 2,60$  g/L). Assim, fermentações de mais curta duração podem ser obtidas utilizando 257-285 g/L de ART no melaço de alimentação. Observou-se que o aumento da concentração dos açúcares na alimentação não afetou significativamente os níveis de etanol produzidos pela co-cultura e um teor de

80,85±2,71 g/L de etanol (10,25±0,34% v/v) foi obtido após 8 h de fermentação a 42°C (rendimento teórico 86,6%).

Os resultados obtidos mostraram que a inibição devido à concentração de açúcares no meio foi maior para o crescimento do que para a produção de etanol. Estudos anteriores com *S. cerevisiae* mostraram que a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) não é afetada pela concentração do substrato inicial em meio definido contendo glicose como fonte de carbono (ORTIZ-ZAMORA *et al.*, 2009). No entanto, em um meio mais complexo e com alto teor de sólidos, a pressão osmótica do meio reduziu, consideravelmente, o acúmulo de biomassa.

Conforme Souza *et al.* (2007), fermentações com concentrações de açúcar maiores que 180 g/L de ART a temperaturas acima de 37°C comprometem a viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* em fermentações em batelada alimentada com meio sintético. Contudo, não foram observadas perdas na viabilidade celular nas condições ensaiadas neste experimento, provavelmente porque o melaço é um meio muito mais rico do que o meio sintético, além disto, após as 8 h de fermentação ainda houve açúcares disponíveis no meio quando um melaço contendo mais que 25% de ART na alimentação foi utilizado. A falta de nutrientes no meio ou de açúcares de reserva da própria célula (trealose) pode levar à morte celular por falta de energia de manutenção das atividades vitais. Neste experimento, a viabilidade final foi mantida alta apesar da elevação do açúcar do melaço de alimentação, porém grandes quantidades de açúcar residual foram deixadas no meio (37 g/L de açúcar residual com melaço 285 g/L ART e 81 g/L com melaço 330 g/L ART). Escolheu-se, por tanto, a concentração de 257 g/L ART no meio de alimentação para os seguintes ensaios de fermentação.



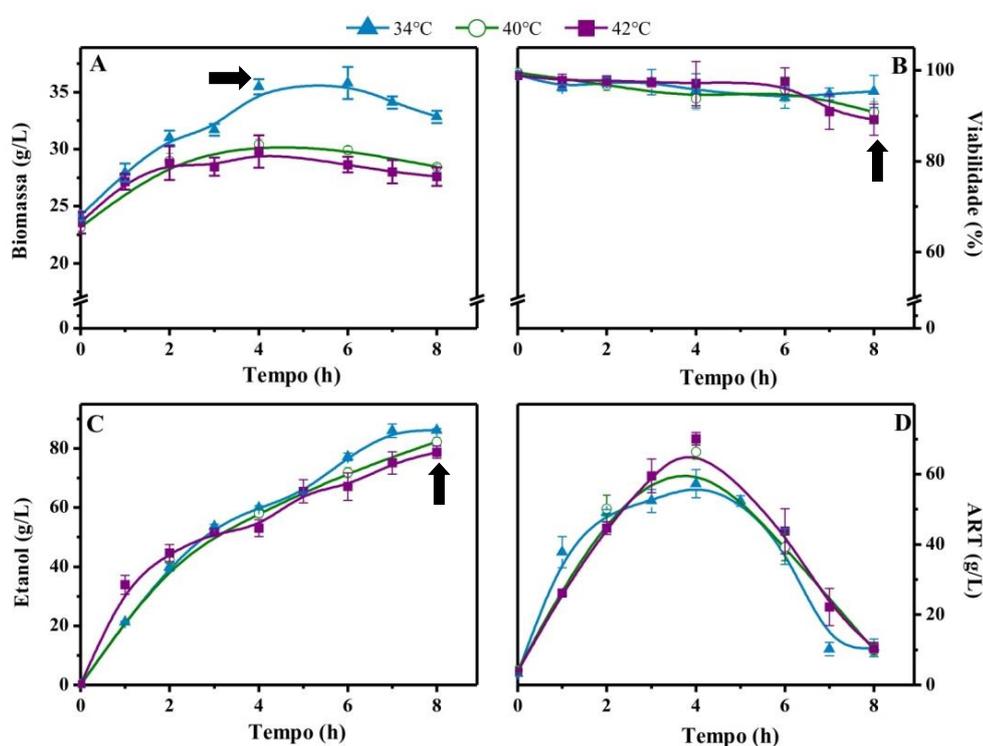
**Figura 6** – Efeito da concentração do melaço sobre a formação de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e açúcar residual total (D) durante a fermentação em batelada alimentada usando o inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v). A concentração de açúcar na alimentação foi: 257 g/L ART (-■-), 285 g/L ART (-○-) e 330 g/L ART (-◆-).

#### 4.1.3. Efeito da temperatura de fermentação

A temperatura de fermentação representa um fator crítico na produção de etanol, pois temperaturas acima de 38°C afetam o comportamento e o desempenho das células de levedura (ABDEL-BANAT *et al.*, 2010). As fermentações industriais que utilizam a levedura *S. cerevisiae* ocorrem na faixa de 32°C-35°C. (BASSO *et al.*, 2011). Neste experimento, variou-se a temperatura de fermentação na faixa de 34°C a 42°C com a finalidade de avaliar o desempenho fermentativo da co-cultura em temperaturas usadas pela indústria, assim como também a temperaturas mais elevadas.

Na Figura 7 é mostrado um maior acúmulo de biomassa quando a temperatura de fermentação foi 34°C. Esse acúmulo atingiu um valor máximo de 48% em relação à concentração de inóculo, ao passo que o acúmulo de biomassa a 40°C e 42°C foi 31% e 26%, respectivamente. Observou-se uma pequena queda na viabilidade das

células da co-cultura, atingindo um valor aproximado de 90% após 8 h de fermentação para as três condições ensaiadas, como é mostrado na Figura 7B. Estes resultados são superiores aqueles obtidos por Souza *et al.* (2007), no qual mostrou-se que a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* produziu até 10,1% (v/v) de etanol a 40°C a partir de sacarose (200 g/L), porém com perdas na viabilidade na ordem de 70%. Manter a viabilidade no final da fermentação é importante por causa da reutilização de células empregadas em destilarias brasileiras, processo que diminui os custos de propagação do inóculo, assim como, o tempo de produção (SOUZA *et al.*, 2007).



**Figura 7** – Efeito da temperatura sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) durante a fermentação em batelada alimentada de melão utilizando 24 g/L de inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 34°C (-▲-), 40°C (-○-) e 42°C (-■-).

Por outro lado, a produção de etanol foi levemente favorecida quando se fermentou a uma temperatura mais baixa, pois o rendimento teórico aumentou de 91,97% (42°C) para 97,85% (34°) (Tabela 1). Fermentações a altas temperaturas tem atraído muito a atenção de pesquisadores nas últimas décadas, por exemplo, Sree *et al.*, (2000) estudaram os efeitos do aumento da temperatura sobre a produção de etanol em linhagens mutantes de *S. cerevisiae*. Os autores comprovaram que quando

se aumentou a temperatura de 30°C para 40°C em meio contendo 150 g/L de glicose, a concentração de etanol produzido pelos melhores mutantes diminuiu de 75,2 g/L para 55,0 g/L, mas não há nenhuma menção quanto a perda de viabilidade destes mutantes.

A temperatura ótima de produção de etanol a partir de glicose em meio YPD pela linhagem 195B de *P. kudriavzevii* foi determinada em um trabalho anterior em batelada simples, como sendo de 42°C (GALLARDO, 2010). Nesse trabalho a diminuição da temperatura de 42°C para 40°C, em fermentações em batelada simples usando a co-cultura de *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae*, favoreceu o acúmulo de biomassa até 6 h de fermentação com um aumento significativo na produção de etanol. Este fato parece não acontecer quando um sistema em batelada alimentada é utilizado, pois as curvas de tempo para biomassa e produção de etanol apresentaram o mesmo perfil tanto a 40°C quanto a 42°C (Figuras 7A e 7C).

Os parâmetros obtidos durante a fermentação em batelada alimentada a 34°C, 40° e 42°C pela co-cultura de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* estão apresentados na Tabela 1. Diferenças pouco significativas foram observadas para o fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ), viabilidade, produtividade, rendimento teórico e açúcar residual quando as três condições de fermentação são comparadas. Contudo, tanto o fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) quanto o acúmulo de biomassa foram favorecidos com a diminuição da temperatura, como discutido anteriormente.

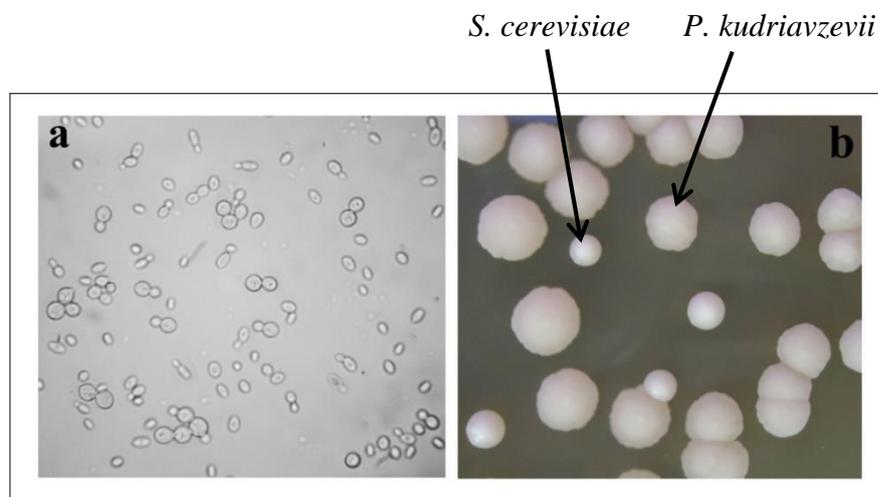
**Tabela 2** – Indicadores obtidos durante a fermentação em batelada alimentada utilizando a co-cultura de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* a 34°C, 40°C e 42°C.

<b>Indicadores de fermentação</b>	<b>34°C</b>	<b>40°C</b>	<b>42°C</b>
Tempo de fermentação (h)	8	8	8
Acúmulo biomassa (g/L)	8,65±0,64	6,28±0,41	5,03±1,18
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,051±0,004	0,037±0,002	0,030±0,007
Etanol produzido (g/L)	86,18±0,52	82,36±1,54	78,76±2,08
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,50±0,01	0,48±0,01	0,47±0,01
Produtividade (g/L/h)	10,77±0,15	10,30±0,23	9,85±0,29
Rendimento (%)	97,85	93,93	91,97
Açúcar residual (%)	1,05±0,25	1,00±0,16	1,60±0,15
Viabilidade (%)	95,38±3,53	90,77±2,34	90,85±2,46

Os resultados obtidos neste experimento representam uma inovação para o setor sucroalcooleiro, já que a utilização da co-cultura de linhagens de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* permitiu a produção de etanol sem perdas significativas de viabilidade mesmo a temperaturas elevadas. Geralmente, a temperatura nas dornas industriais é mantida ao redor de 32°C a 35°C, no entanto, devido ao curto tempo de fermentação, o resfriamento nem sempre é suficientemente eficaz na remoção de calor, atingindo temperaturas de até 40°C, especialmente durante o verão (BASSO *et al.*, 2011). Abdel-Banat *et al.* (2010) demonstraram que o aumento de 5°C apenas na temperatura de fermentação pode afetar significativamente os custos de produção do etanol combustível. Desta forma, a fermentação utilizando esta co-cultura é uma alternativa para diminuir as perdas na produtividade do etanol quando temperaturas elevadas são atingidas.

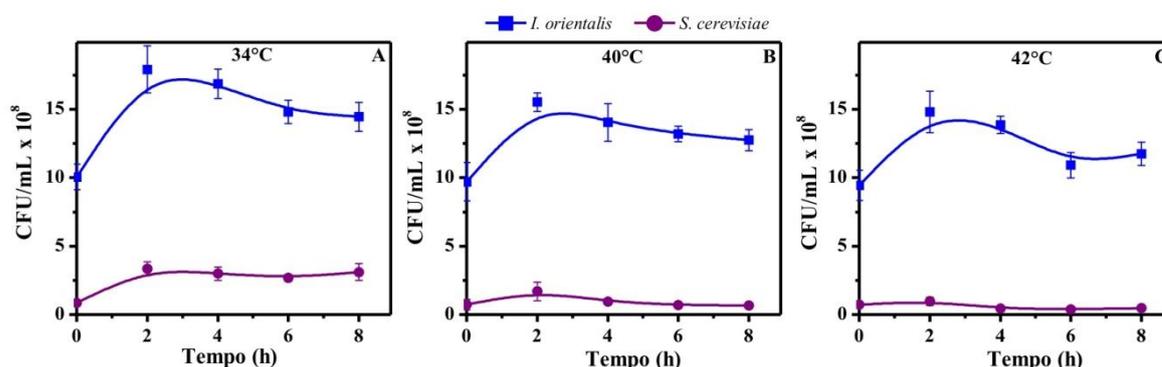
Por outro lado, acompanhar as variações na proporção de leveduras dominantes em uma fermentação é fundamental. Por isto, acompanhou-se a permanência das duas leveduras no decorrer da fermentação por meio de plaqueamento em meio YPD. As células da cultura mista no início da fermentação são mostradas na Figura 8A: as células arredondadas e maiores são de *S. cerevisiae*, ao passo que as células mais alongadas e menores são de *P. kudriavzevii*. Após 48 h de incubação a 30°C, foi possível diferenciar dois tipos de colônias nas placas:

colônias cremosas, lisas e menores pertencentes à levedura *S. cerevisiae* e colônias cremosas, rugosas e maiores pertencentes à levedura *P. kudriavzevii* (Figura 8B). Como descrito na literatura, as células da levedura *S. cerevisiae* são ovais e formam colônias cremosas, lisas e brilhantes com bordas regulares, enquanto que as células das leveduras não-*Saccharomyces* apresentam uma forma mais alongada e, geralmente, formam colônias cremosas, rugosas e com bordas irregulares (FLEET, 2011). Esta diferenciação, portanto, permitiu acompanhar o número de UFC/mL ao longo das fermentações realizadas com a mistura de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*.



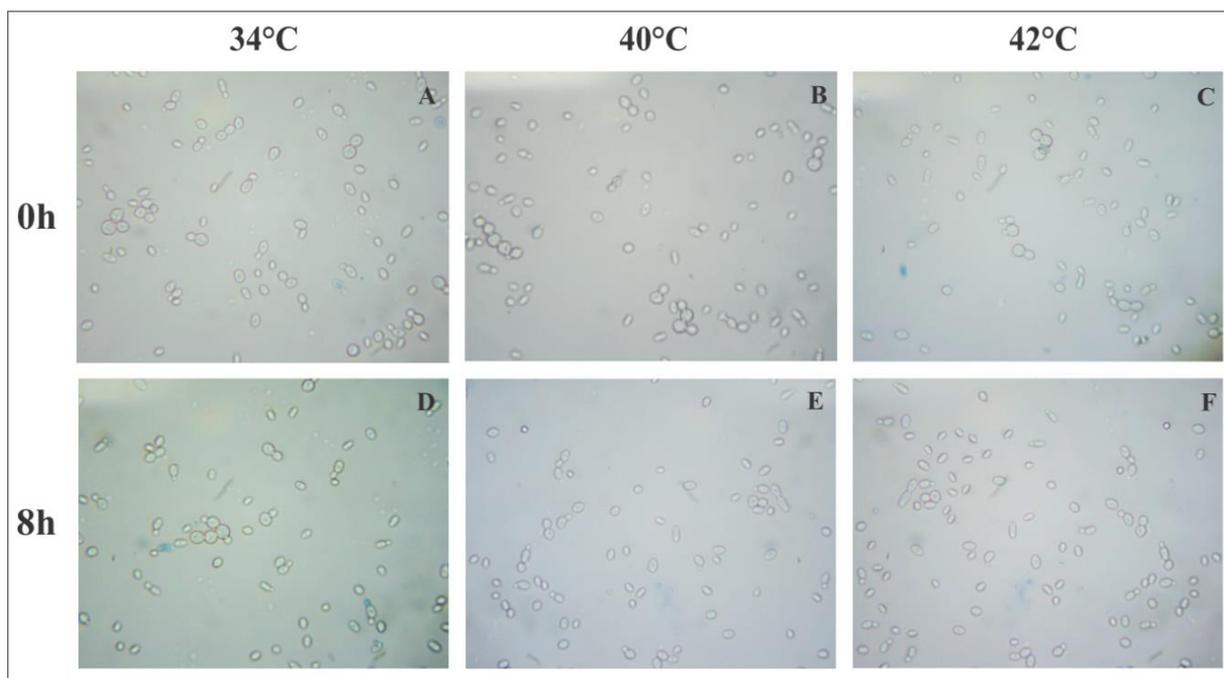
**Figura 8** – Diferença de morfologia entre as células (a) e colônias (b) de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* no início da fermentação de melado em batelada alimentada.

Na Figura 9 é mostrada uma queda no número de UFC/mL tanto para *S. cerevisiae* quanto para *P. kudriavzevii* após o término de alimentação do reator (4 h) a 40°C e 42°C, sendo este número de UFC/mL praticamente constante até o fim da fermentação. Como discutido anteriormente (Figura 7), a diminuição da temperatura de fermentação favoreceu a proliferação celular e foi possível manter um número alto de UFC/mL para ambas as leveduras quando a temperatura de fermentação foi de 34°C. Ainda na Figura 9, observa-se um acúmulo máximo no número de UFC para ambas as leveduras após 2 h de fermentação nas três condições ensaiadas, talvez devido à grande disponibilidade de açúcares e à baixa concentração de etanol produzido ainda neste tempo.



**Figura 9** – Efeito da temperatura sobre a permanência das células de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* ao longo da fermentação em batelada alimentada de melaço a 34°C (A), 40°C (B) e 42°C (C).

Estudou-se também o efeito da temperatura sobre a morfologia das células na cultura mista após 8 h de fermentação a 34°C, 40°C e 42°C. As imagens obtidas no início e fim da fermentação em batelada alimentada a 34°C mostraram que não houve uma alteração quanto à morfologia e tamanho de ambas as leveduras (Figuras 10A e 10D). Assim, nestas imagens é mostrado que é possível diferenciar as células de *S. cerevisiae* (células maiores e arredondadas) e *P. kudriavzevii* (células menores e alongadas) mesmo após 8 h de fermentação. Porém, quando se comparam as imagens das culturas mistas no início e fim das fermentações a 40°C e 42°C, observa-se uma diminuição no tamanho das células após 8 h de fermentação (comparar a Figura 10B com 10E, e a Figura 10C com 10F). Apesar de constatado por Dinh *et al.*, (2008) que o tamanho das células de *S. cerevisiae* aumenta quando estas estão adaptadas ao estresse alcoólico, a redução no tamanho das células observado neste experimento, pode ser atribuído ao estresse alcoólico associado ao estresse térmico, sofrido pelas células ao longo da fermentação.



**Figura 10** – Efeito da temperatura sobre a morfologia das células de *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* no início e fim da fermentação em batelada alimentada de melaço a 34°C (A e D), 40°C (B e E) e 42°C (C e F) (amplificação 40X).

#### 4.1.4. Suplementação do melaço com fonte de nitrogênio orgânico

As células de levedura encontram diversas condições simultâneas de estresse impostas pelo próprio processo fermentativo. É importante que as células encontrem disponíveis no meio os nutrientes necessários para contornar estas condições de estresse desfavoráveis e assim, manter suas atividades fisiológicas. Embora a matéria-prima utilizada no presente trabalho não seja muito rica em nutrientes, altos rendimentos na produção de etanol tem sido obtidos em trabalhos anteriores utilizando melaço de cana como substrato (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2012; GALLARDO, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho e discutidos anteriormente mostraram uma diminuição da produção de biomassa quando as leveduras foram expostas a temperaturas tão altas quanto 42°C (Figura 7). Deste modo, decidiu-se estudar o efeito da suplementação do melaço visando reduzir os efeitos da temperatura sobre a produção de etanol e biomassa durante o processo. Várias fontes de nitrogênio foram estudadas para a suplementação de melaço por Coradello (2012), sendo os melhores aditivos para o meio o extrato de levedura e um lisado

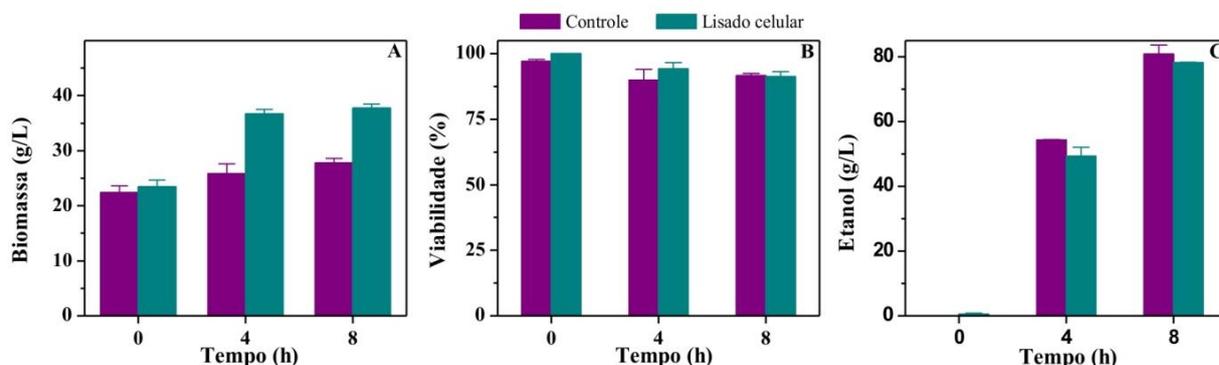
celular. O uso deste lisado celular foi equivalente quanto à produção de biomassa ao extrato de levedura, com a vantagem de ser obtido a um preço muito menor.

No presente trabalho foi utilizado este lisado celular como fonte de nitrogênio orgânico (1 g/L) na suplementação do melaço de alimentação das fermentações em batelada alimentada a 42°C. Fontes de nitrogênio e carbono constituem as principais exigências nutricionais para a proliferação celular e produção de etanol, pois o carbono e nitrogênio estão presentes em quase todas as macromoléculas dos micro-organismos (WALKER, 1998). Como as fontes de carbono e de nitrogênio são os principais nutrientes presentes em mostos para a produção de cerveja, vinho e etanol combustível, isto sugere que a interação mútua destes nutrientes pode ter efeitos importantes sobre o metabolismo de leveduras (SCHNEPER *et al.*, 2004). Assim, altos níveis de fontes de carbono associados a baixos níveis de fontes de nitrogênio são as causas mais comuns do baixo rendimento das fermentações (PRETORIUS, 2000).

Na Figura 11, nota-se que houve um aumento nos níveis de biomassa quando o lisado celular foi adicionado ao meio de alimentação. Este aumento atingiu um máximo de 36% em relação ao experimento controle após 8 h de fermentação a 42°C (Figura 11A). Já, a viabilidade mostrou-se constante nas duas condições, ficando em média 91% (Figura 11B). Apesar do aumento da biomassa, a produtividade não foi alterada, já que o etanol produzido foi equivalente no controle e no meio contendo o lisado celular. As duas condições permitiram atingir um rendimento teórico de aproximadamente 87%.

Albers *et al.* (1996) estudaram o efeito do nitrogênio sobre o crescimento e formação de etanol por *S. cerevisiae* em meio sintético contendo glicose. Os autores demonstraram que quando a fonte de nitrogênio do meio é constituída por substâncias tais como peptídeos e aminoácidos livres em lugar de sais de amônio, ocorre um aumento no acúmulo de biomassa e produção de etanol com redução dos níveis de glicerol formados. Esses resultados parecem estar em conformidade com os obtidos no presente trabalho, já que a adição de uma fonte de nitrogênio livre favoreceu a proliferação celular. Fernández-López *et al.* (2012), porém, verificaram que o enriquecimento de melaço de cana com diferentes fontes de nitrogênio não apresentou vantagens significativas na produção de etanol e, ainda comprovaram que, as velocidades de crescimento ( $\mu_{max}$ ) foram semelhantes em meios com e sem

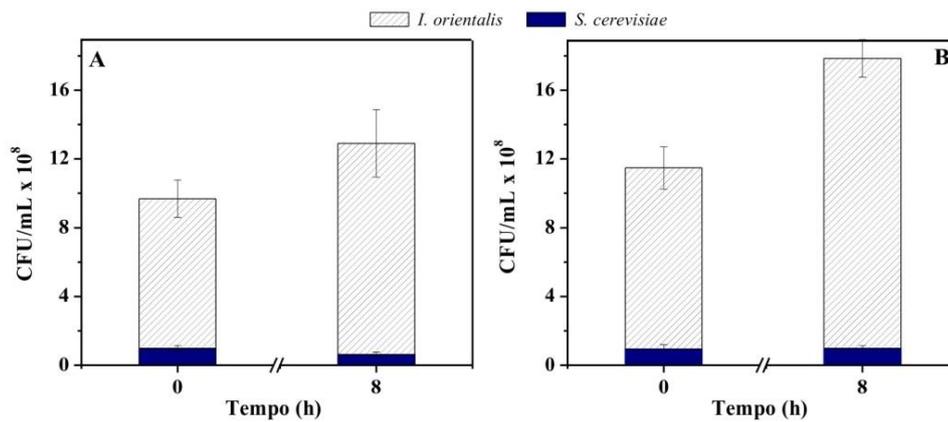
suplementação. Estes autores confirmaram, então, que o melaço utilizado por eles e chamado de "B" era suficiente para uma boa produção de etanol e biomassa a 35°C, devido ao alto conteúdo de vitaminas e de sais nele presentes.



**Figura 11** – Efeito da suplementação do melaço com fonte de nitrogênio orgânico sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B) e produção de etanol (C) durante a fermentação em batelada alimentada utilizando o inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (■) controle sem adição de nitrogênio orgânico e (■) adição de nitrogênio orgânico (1 g/L).

As fermentações suplementadas com lisado celular durante a fase de alimentação foram acompanhadas por plaqueamentos das amostras retiradas ao início e ao final da fermentação (0 e 8 h), como é mostrado na Figura 12. No tempo de 8 h, observou-se um aumento no número de UFC/mL das duas leveduras na presença do lisado. Assim, a levedura *P. kudriavzevii* teve um aumento de 37% no número de UFC/mL em relação ao experimento controle; ao passo que a levedura *S. cerevisiae* aumentou em aproximadamente 59%.

Neste experimento, o aumento do acúmulo de biomassa foi comprovado utilizando o lisado celular como fonte de nitrogênio orgânico, porém sem vantagens quanto à produção de etanol. Optou-se, portanto, pela fermentação sem suplementação do meio, uma vez que a composição do meio pode ter grande impacto sobre os custos de produção.



**Figura 12** –Efeito da suplementação do melaço com fonte de nitrogênio orgânico (lisado celular) sobre a permanência das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* durante a fermentação em batelada alimentada de melaço a 42°C: (A) controle sem adição de lisado e (B) adição de lisado celular (1 g/L).

Como resultado da padronização, a condição escolhida para a fermentação em batelada alimentada a altas temperaturas utilizando o inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* foi: inóculo misto de 24 g/L (proporção inicial 1:3, m/v), concentração de açúcares do meio de alimentação sem suplementação 25,7±1,0% ART e fermentação de 8 h a 42°C.

#### 4.1.5. Comparação entre a fermentação em batelada simples e alimentada de melaço a 42°C

Em um trabalho anterior, a fermentação de melaço de cana-de-açúcar pelo inóculo misto das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* foi padronizada em um processo de batelada simples a 42°C (GALLARDO, 2010). A cultura mista resultante foi capaz de fermentar melaço 15% ART a 42°C sem deixar quantidades significativas de açúcar residual no meio após 12 horas e com acúmulo de 64,05±1,36 g/L de etanol (Tabela 3). Como descrito anteriormente, quando esta mesma cultura mista foi utilizada na fermentação de melaço em batelada alimentada observou-se um aumento significativo na produção de etanol, assim como na diminuição no tempo de fermentação. O processo de produção de etanol em batelada alimentada apresenta algumas vantagens em relação ao processo em batelada simples, dentre as quais podemos citar: a concentração dos açúcares no meio é mantida sempre baixa

(dificilmente excede 5-7%, m/m) e minimização da formação de produtos tóxicos do metabolismo, como por exemplo, ácidos fracos (BASSO *et al.*, 2008).

Na Tabela 3 são mostrados os indicadores de fermentação referentes a ambos os processos. Observou-se que o valor do fator de conversão de açúcar em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) teve um aumento significativo quando um sistema em batelada alimentada foi utilizado. No entanto, o valor do fator de conversão de açúcar em etanol ( $Y_{p/s}$ ) é praticamente igual para os dois processos. Um aumento na produtividade de 5,36 g/L/h para 9,85 g/L/h é observado com a utilização da batelada alimentada, uma vez que, o tempo de fermentação diminuiu de 12 h para 8 h. Além do mais, houve uma maior retenção da viabilidade celular com a utilização do processo em batelada alimentada.

**Tabela 3** – Indicadores obtidos durante a fermentação de melaço em batelada simples e batelada alimentada a 42°C.

<b>Indicadores de fermentação</b>	<b>Batelada simples</b>	<b>Batelada alimentada</b>
Tempo de fermentação (h)	12	8
Acúmulo biomassa (g/L)	2,65±0,36	5,03±1,18
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,020±0,002	0,030±0,007
Etanol produzido (g/L)	64,30±1,81	78,76±2,08
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,48±0,02	0,47±0,01
Produtividade (g/L/h)	5,36±0,16	9,85±0,29
Rendimento (%)	94,19	91,97
Açúcar residual (%)	2,31±0,53	1,06±0,15
Viabilidade (%)	86,0±2,0	90,85±2,46

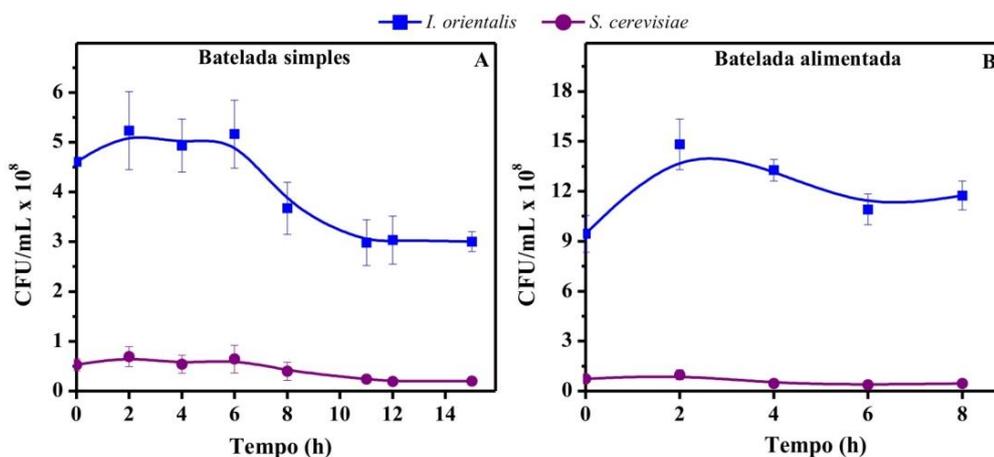
Uma linhagem de *Pichia kudriavzeii*, usada por Dhaliwal *et al.* (2011), foi capaz de produzir etanol a 40°C com uma produtividade de 4,0 g/L/h a partir de caldo de cana-de-açúcar suplementado. Para atingir tais resultados os autores adaptaram as células de *P. kudriavzeii* ao meio YPD usando galactose ao invés de glicose como fonte de carbono a 35°C. Apesar disto os autores conseguiram valores mais baixos de produtividade (4,0 g/L/h) daqueles obtidos no presente trabalho para ambos os

processos em batelada simples e alimentada a 42°C e mesmo sem um processo de adaptação das células

Segundo Laopaiboon *et al.* (2007) o processo em batelada alimentada melhora a eficiência do processo de produção de etanol a 30°C a partir de sorgo, utilizando como inóculo uma linhagem de *S. cerevisiae*. Além disto, a literatura descreve um isolado de *Issatchenkia* sp. capaz de produzir 42 g/L de etanol a 40°C no meio YM (extrato de malte, extrato de levedura e peptona) utilizando glicose como fonte de carbono (WANAPU *et al.*, 2009). A produção de etanol com este isolado foi melhorada quando os mesmos autores passaram a utilizar o processo de batelada alimentada por pulsos, através dos quais as quantidades de 35-40% de glicose foram adicionadas ao reator elevando a produção de etanol para 77 g/L após 24 horas de fermentação.

A permanência das duas leveduras no decorrer da fermentação em ambos os processos, batelada simples e alimentada é mostrada na Figura 13. A contagem das colônias foi feita após 48 h de incubação em meio YPD a 30°C. Observa-se uma queda no número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) tanto para *S. cerevisiae* (24%) quanto para *P. kudriavzevii* (22%) após 8 h de fermentação em batelada simples, sendo este número de células mantido constante até as 15 h (Figura 13A). Já, na Figura 13B, constatou-se um aumento no número de células de *P. kudriavzevii* nas primeiras 4 h de fermentação e após este tempo o número de UFC/mL apresentou um decréscimo de 10%. Além disso, observou-se uma queda no número de células de *S. cerevisiae* após 4 h de fermentação, sendo que após as 8 h o número de UFC/ml de *S. cerevisiae* caiu até aproximadamente 27% em relação ao número de células inoculadas no início da fermentação em batelada alimentada. Uma possível razão para o resultado observado seria a alta temperatura na qual as fermentações foram realizadas. A temperatura ótima de crescimento para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, usada na produção de etanol, é 32°C±2. No entanto, nas zonas de temperaturas mais elevadas, a eficiência do processo de produção de álcool cai devido ao aumento da temperatura acima de 40°C (MUKHTAR *et al.*, 2010). Já, *P. kudriavzevii* é uma levedura termo-tolerante capaz de produzir etanol a temperaturas maiores que 40°C (DHALIWAL\_ *et al.*, 2011; GALLARDO *et al.*, 2011; ISONO *et al.*, 2012; OBEROI *et al.*, 2012; WANAPU *et al.*, 2009). Em um trabalho anterior foi demonstrado que a levedura *S. cerevisiae* começa perder viabilidade após

6 horas de fermentação a 42°C, ao passo que a linhagem 195B de *P. kudriavzevii* mantém uma viabilidade de 93% nas mesmas condições (GALLARDO, 2010).



**Figura 13** – Acompanhamento da permanência das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* durante a fermentação de meloço 16% ART em batelada simples (A) e durante a fermentação de meloço 18% ART em batelada alimentada (B) a 42°C.

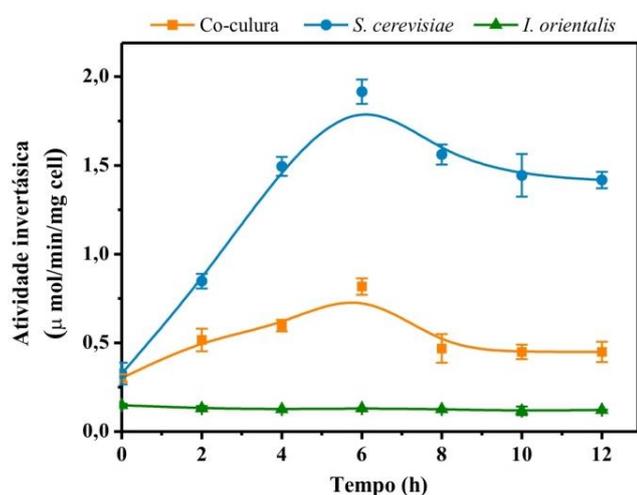
#### 4.1.6. Determinação da atividade invertásica das células de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* em cultura simples e mista

Segundo Barnett *et al.* (2000), *P. kudriavzevii* assimila e fermenta glicose e frutose porém, não assimila e nem fermenta sacarose. No entanto, Kurtzman (1980) e Hisamatsu *et al.* (2006) observaram assimilação de sacarose por linhagens de *P. kudriavzevii* como sendo um crescimento tardio. Neste experimento teve-se como objetivo determinar a atividade da enzima invertase, responsável pela hidrólise da sacarose do meloço em glicose e frutose, produzida pelas células de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* em cultura simples e mista.

A levedura *S. cerevisiae* produz dois tipos de invertase: interna e externa. A função da forma interna não é ainda bem conhecida. Sabe-se que a invertase externa, altamente glicosilada, está localizada no espaço periplasmático e encontra-se associada à parede celular da levedura (ZECH; GORISCH, 1995). A invertase é um determinante crítico na fermentação de meloços e pode ser inibida por altas concentrações de açúcar, já que a expressão dos genes de invertase de *S. cerevisiae* é reprimida pela glicose livre no meio (TRUMBLY, 1992).

Na Figura 14 é mostrado que a atividade de invertase ligada à parede das células foi maior na cultura simples de *S. cerevisiae*, atingindo o valor máximo de  $1,92 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  em 6 h de fermentação, após este tempo observou-se uma queda na atividade, possivelmente devido à inibição pela concentração de glicose no meio. Já a cultura mista das duas leveduras mostrou uma atividade total máxima de  $0,82 \pm 0,05 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  no mesmo tempo. O método utilizado não detectou atividade da enzima livre no meio, a atividade invertásica foi detectada apenas na enzima imobilizada na superfície das células de *S. cerevisiae*. Como esperado, uma baixa atividade enzimática foi detectada no sobrenadante da cultura de *P. kudriavzevii* ( $0,13 \pm 0,1 \text{ U}/\text{mg}$ ).

Outro fator importante para a atividade da invertase é a concentração de etanol no meio. A invertase perde até 50% da sua atividade após 30 min em presença de 120 g/L de etanol a uma temperatura de 30°C (ZECH; GORISCH, 1995). Além disso, de acordo com Takeshige e Ouchi (1995) e Zech e Gorish (1995), alguns inibidores, originalmente, presentes no melão (por exemplo, NaCl) poderiam também estar envolvidos na redução da atividade enzimática.



**Figura 14** – Atividade invertásica das células de *S. cerevisiae* (-●-), *P. kudriavzevii* (-▲-) e da cultura mista (-■-) constituída por *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) durante a fermentação de melão em batelada simples a 42°C.

## **4.2. Fermentação em batelada alimentada com reutilização de células e revitalização celular entre os ciclos de fermentação**

As destilarias brasileiras operam com o sistema de fermentação contínua ou em batelada alimentada, nos quais as células de levedura inoculadas no início do processo são reutilizadas ao longo de fermentações sucessivas. A etapa de reutilização de células é de vital importância para o processo industrial de fermentação, já que o acúmulo e manutenção da biomassa precisam ser garantidos entre os ciclos de fermentação. A reutilização das células impõe condições de estresse alto para as linhagens industriais (BASSO *et al.*, 2011). Além disso, o estudo da reutilização de células torna-se de vital importância quanto à análise dos teores de compostos tóxicos à fermentação, visto que, se eles são produzidos durante o processo, podem acumular-se no inóculo promovendo perdas de viabilidade, eficiência e produtividade (MARQUES; SERRA, 2004).

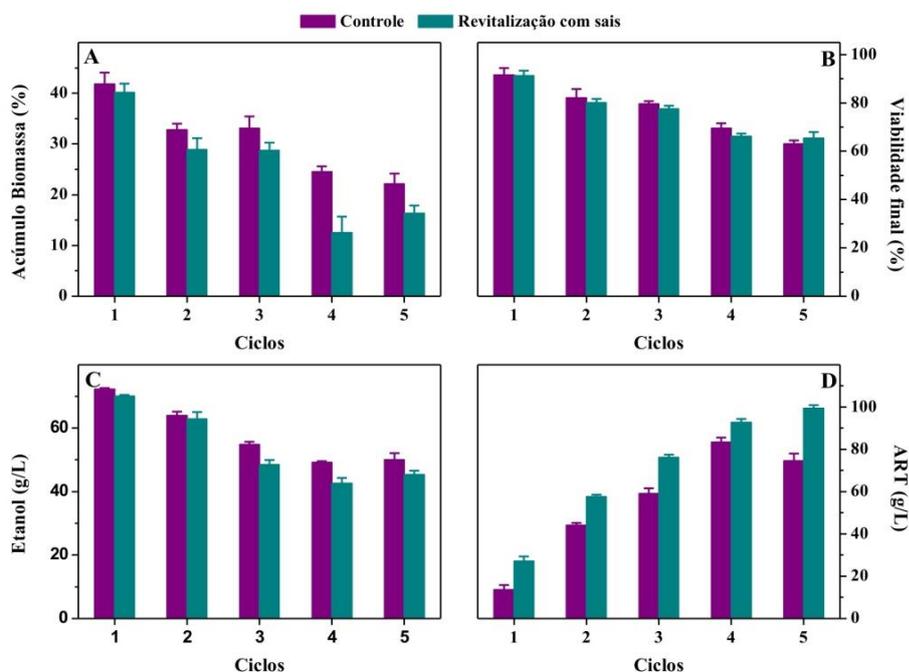
Considerando-se o exposto, decidiu-se estudar a revitalização das células de levedura entre os ciclos fermentativos.

### **4.2.1. Revitalização celular com coquetel de sais**

Na Figura 15 é mostrada a produção de etanol, o acúmulo de biomassa, viabilidade e o açúcar residual durante cinco ciclos de fermentação utilizando a cultura mista de *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* a 42°C. A revitalização das células entre os ciclos de fermentação consistiu na adição de um coquetel de sais (Zn SO<sub>4</sub> 0,01%; Mg SO<sub>4</sub> 0,01%; DAP 0,1%) ao meio contendo 8% ART a 34°C (CORADELLO, 2012).

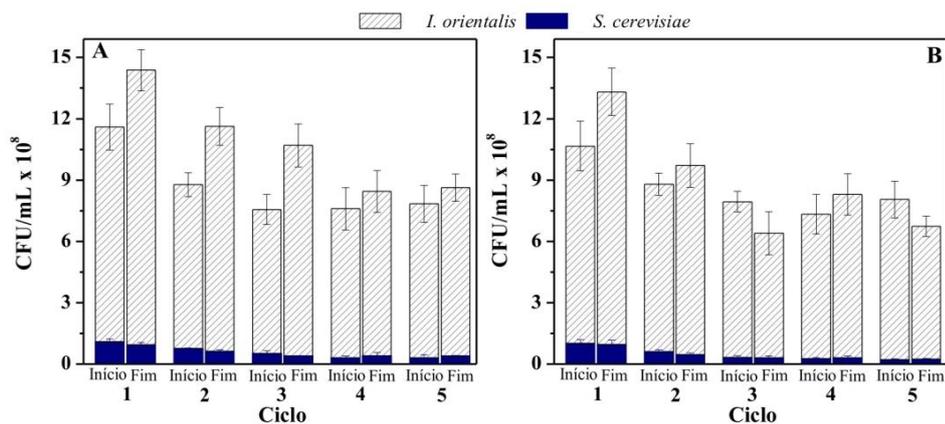
No trabalho de Silva (2010), o uso destes sais resultou em um aumento do rendimento tanto do etanol quanto da biomassa durante a fermentação de melaço a 30°C. Porém, neste experimento observou-se que o acúmulo de biomassa sofre uma queda significativa de 42% para 22% após cinco ciclos sucessivos de fermentação, sendo esta queda ainda maior quando o meio de revitalização foi suplementado com sais, como mostrado na Figura 11A. A alta temperatura de fermentação e o acúmulo dos diversos subprodutos tóxicos formados durante os ciclos de fermentação parecem afetar, consideravelmente, a eficiência do processo, já que o etanol produzido no primeiro ciclo teve uma queda de até 31% após o quinto ciclo. Além disto, a viabilidade

da cultura mista após os 5 ciclos atingiu um valor de 63% e 66%, no experimento controle e na revitalização com sais, respectivamente. As células de levedura devem manter uma viabilidade alta no fim de cada ciclo de fermentação, para poderem permanecer e proliferar nos seguintes ciclos (BASSO *et al.*, 2011).



**Figura 15** – Efeito da composição do meio de revitalização sobre a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melão inoculado com a mistura das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: meio de revitalização controle sem adição do coquetel de sais (■) e meio de revitalização contendo coquetel de sais (■).

O acompanhamento do número de UFC/mL de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* durante os cinco ciclos de fermentação confirmaram os dados obtidos na Figura 15A, onde foi observado que a adição do coquetel de sais no meio de revitalização não apresentou vantagem para a formação de biomassa.



**Figura 16** – Efeito da composição do meio de revitalização sobre a permanência das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* durante a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melaço a 42°C: (A) meio de revitalização controle sem adição de coquetel de sais e (B) meio de revitalização contendo coquetel de sais.

Pelo exposto, a suplementação do meio de revitalização com o coquetel de sais parece não oferecer nenhum benefício para a produção de etanol, o acúmulo de biomassa nem para a retenção da viabilidade da co-cultura em fermentações sucessivas a 42°C.

Durante a etapa de revitalização realizada entre os ciclos fermentativos (12 h) observou-se que o uso do coquetel de sais manteve um acúmulo de biomassa de aproximadamente 12%, confirmando, assim, a renovação celular durante esta etapa (Tabela 4). Por outro lado, a viabilidade apresentou uma queda ao longo das revitalizações, porém esta não foi afetada pela composição do meio, já que valores próximos foram obtidos para o experimento controle e o meio contendo sais. Já, a produção de etanol foi baixa, em média 33 g/L (4,2%, v/v) e praticamente constante durante os 4 ciclos de revitalização para ambas as condições estudadas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Acúmulo de biomassa, viabilidade, produção de etanol e consumo de açúcar durante a revitalização das células em melaço contendo um coquetel de sais.

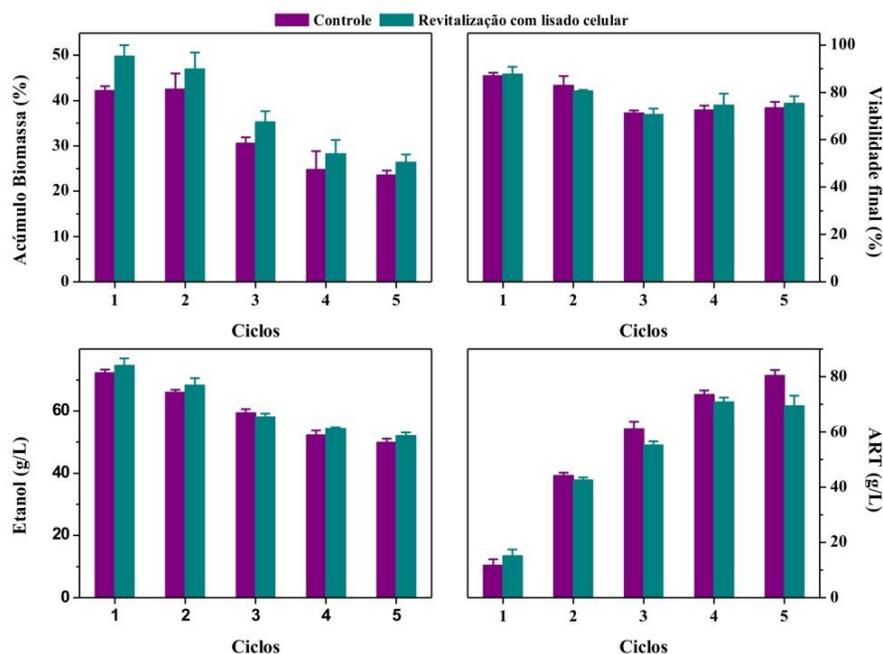
Condição	Revitali-zação <sup>(a)</sup>	Acúmulo Biomassa (%)	Viabilidade (%)		Etanol Produzido (g/L)	ART (g/L)	
			Inicial	Final		Inicial	Final
Controle	1	2,07±0,94	91,61±1,33	85,65±0,91	32,01±0,87	84,16±0,25	3,39±0,08
	2	15,20±2,60	82,22±0,55	82,39±1,29	33,07±1,07	86,01±0,55	3,58±0,08
	3	3,14±0,63	75,56±0,91	71,04±2,21	34,03±1,07	86,28±1,20	3,22±0,02
	4	5,27±1,35	74,68±1,35	74,57±0,97	31,87±2,01	85,33±1,31	3,13±0,05
Meio com sais	1	8,36±1,50	91,27±0,93	85,45±1,01	31,20±1,5	84,43±0,58	3,50±0,03
	2	13,55±0,27	80,11±1,54	79,96±1,03	33,00,0,54	86,14±0,13	3,42±0,02
	3	12,70±1,28	77,62±1,15	72,23±1,57	35,17±1,43	83,37±0,75	3,27±0,07
	4	13,51±0,93	76,23±2,04	74,62±1,66	32,56±1,66	84,18±0,91	3,36±0,06

<sup>(a)</sup> Melaço 8% ART a 34°C durante 12h.

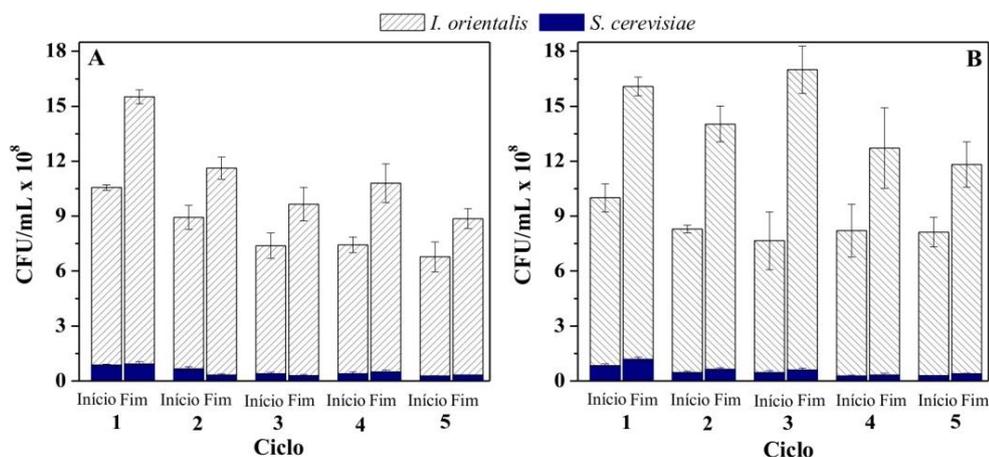
#### 4.2.2. Revitalização celular com fonte de nitrogênio orgânico

Outra estratégia de revitalização estudada no presente trabalho consistiu na adição de uma fonte de nitrogênio (1 g/L obtido a partir de um lisado celular) ao melaço 8% ART. Confirmando os resultados obtidos na Figura 11, referentes à suplementação do meio de alimentação com lisado celular, neste experimento o acúmulo de biomassa foi maior quando este lisado celular foi adicionado ao meio de revitalização durante cinco ciclos sucessivos de fermentação. No entanto, a biomassa sofreu uma queda a partir do terceiro ciclo passando a permanecer quase constante tanto no experimento controle quanto no experimento contendo o lisado (Figura 17). Por outro lado, a viabilidade celular e a formação de etanol não foram afetadas quando o meio de revitalização foi suplementado com o lisado celular.

Na Figura 18 é verificado como o número de UFC/mL da levedura *P. kudriavzevii* é favorecido com a adição do lisado celular ao meio de revitalização. Como esperado, a temperatura elevada (42°C) parece estar afetando a proliferação das células de *S. cerevisiae*, já que, a temperatura ótima de crescimento para esta levedura é 32°C±2 (MUKHTAR *et al.*, 2010). Conseqüentemente, o lisado celular parece não ter nenhum efeito positivo sobre o número de UFC/mL quando as células são submetidas a estresse térmico durante fermentações sucessivas de melaço.



**Figura 17** – Efeito da composição do meio de revitalização sobre a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melão inoculado com a mistura das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (■) meio de revitalização por 12 h sem adição de nitrogênio e (■) meio de revitalização contendo nitrogênio (1,0 g/L).



**Figura 18** – Efeito da composição do meio de revitalização sobre a permanência das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* durante a fermentação sucessiva (reutilização de células) de melão a 42°C: (A) meio de revitalização sem adição de lisado celular e (B) meio de revitalização contendo lisado celular (1,0 g/L).

A biomassa, viabilidade e o etanol produzido durante a etapa de revitalização com lisado celular também foram determinados. A Tabela 5 mostra que a renovação celular foi maior quando o lisado foi adicionado ao meio, apesar disto, observou-se que a diferença é pouco significativa em relação ao controle, já que o acúmulo de

biomassa passou de 6,4% para 8,8% no primeiro ciclo de revitalização e de 3,5% para 8% no quarto ciclo. Por fim, a produção de etanol não foi afetada pelo uso de lisado celular no meio de revitalização. Porém, observou-se que os valores obtidos de etanol foram menores aqueles obtidos durante a etapa de revitalização com o coquetel de sais (comparar Tabelas 4 e 5).

Em vista que as duas condições de revitalização estudadas não levaram a resultados relevantes em relação à produção de etanol e ao aumento da viabilidade, decidiu-se continuar os estudos de fermentação sem a suplementação do meio.

Poucos estudos têm sido realizados sobre a revitalização celular durante fermentações sucessivas com reciclo de células. Contudo, várias estratégias de revitalização foram estudadas e testadas no nosso laboratório, com a finalidade de garantir a manutenção da viabilidade e a renovação celular entre os ciclos fermentativos (CORADELLO, 2012).

**Tabela 5** – Acúmulo de biomassa, viabilidade, produção de etanol e consumo de açúcar durante a revitalização das células em melaço contendo fonte de nitrogênio orgânico (lisado celular).

Condição	Revitali-zação <sup>(a)</sup>	Acúmulo Biomassa (%)	Viabilidade (%)		Etanol Produzido (g/L)
			Inicial	Final	
<b>Controle</b>	1	6,43±0,36	87,08±1,21	85,44±0,87	23,75±0,21
	2	3,19±0,98	82,89±3,90	79,31±0,96	22,32±0,99
	3	3,23±1,01	71,22±0,21	85,01±0,96	13,97±1,24
	4	3,51±0,54	72,36±1,34	83,14±1,34	14,73±0,81
<b>Meio lisado celular</b>	1	8,76±0,62	87,65±2,14	81,18±0,93	19,17±1,51
	2	9,03±1,03	80,55±0,93	80,33±1,09	14,20±0,84
	3	7,95±1,35	70,61±1,49	82,39±1,22	14,58±0,33
	4	8,02±1,03	71,66±1,29	80,00±1,57	15,77±0,97

<sup>(a)</sup> Melaço 8% ART a 34°C durante 12h.

### 4.3. Fermentação em batelada alimentada a 42°C com reciclo de células sem revitalização celular

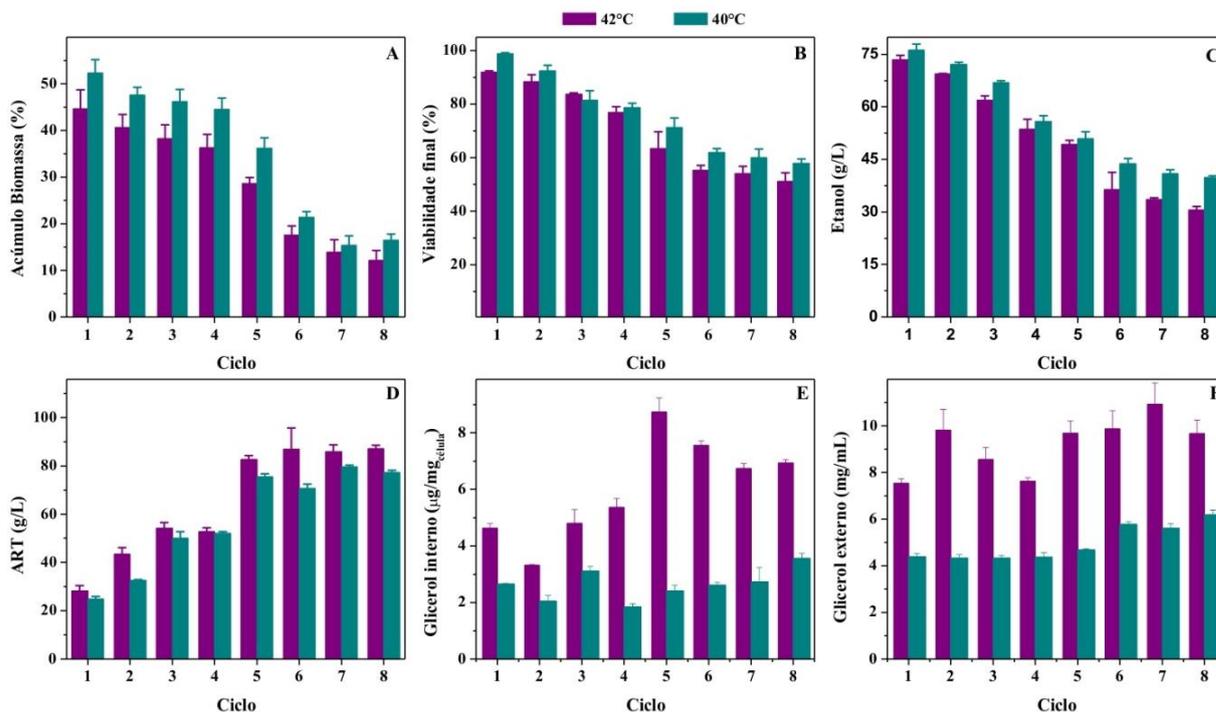
As destilarias operam em ciclos curtos de fermentação (6 a 10 h) e isso permite que a levedura possa ser reciclada até três vezes por dia operando em média 400 a 600 ciclos durante toda a safra canvieira (AMORIM *et al.*, 2011). O experimento descrito na Figura 18 teve como principal objetivo simular uma destilaria realizando vários ciclos de fermentação por dia e sem intervalos de revitalização celular entre eles.

Como discutido anteriormente na Tabela 2, a redução da temperatura de 42°C para 40°C em um único ciclo de fermentação, favoreceu a formação de biomassa ( $Y_{x/s}$ ) e a produção de etanol ( $Y_{p/s}$ ), por este motivo decidiu-se verificar o efeito da temperatura sobre a fermentação com reutilização de células a 40°C e 42°C. Na Figura 19A é mostrada uma diminuição significativa no acúmulo de biomassa após seis ciclos de fermentação (58%), sendo essa diminuição ainda maior quando a temperatura de fermentação foi 42°C (63%). Na fermentação a 40°C foram verificados pequenos decréscimos de viabilidade em relação ao valor inicial ao longo dos ciclos, porém uma queda de viabilidade mais significativa foi observada nos últimos três ciclos de fermentação a 42°C (Figura 19B). A produção de etanol apresentou uma queda até o 6º ciclo e manteve-se constante até o 8º ciclo com um valor médio de 42 g/L e 33 g/L a 40° e 42°C, respectivamente (Figura 19C). A produtividade variou de  $9,52 \pm 0,25$  g/L/h para  $5,00 \pm 0,11$  g/L/h a 40°C e de  $9,19 \pm 0,19$  g/L/h para  $3,83 \pm 0,13$  g/L/h a 42°C após oito ciclos. Provavelmente, devido à perda de viabilidade nos últimos ciclos de fermentação, o açúcar residual aumentou para ambas as condições ensaiadas (Figura 19D). Outros autores mostraram que um isolado de *P. kudriavzevii* foi capaz de manter os níveis de etanol produzidos, a partir de xarope de cana suplementado, ao redor de 73 g/L após 4 ciclos sucessivos de fermentação a 40°C sem mencionar variações na viabilidade celular, porém foram necessárias 18 h para o consumo total dos açúcares (DHALIWAL *et al.*, 2011).

Por outro lado, os níveis de glicerol foram bastante alterados pela temperatura de fermentação. Isto também tem sido observado e muito estudado na fermentação de vinhos (TORIJA *et al.*, 2002). O Glicerol é o principal subproduto da fermentação produzido principalmente como resultado da re-oxidação do excesso de NADH

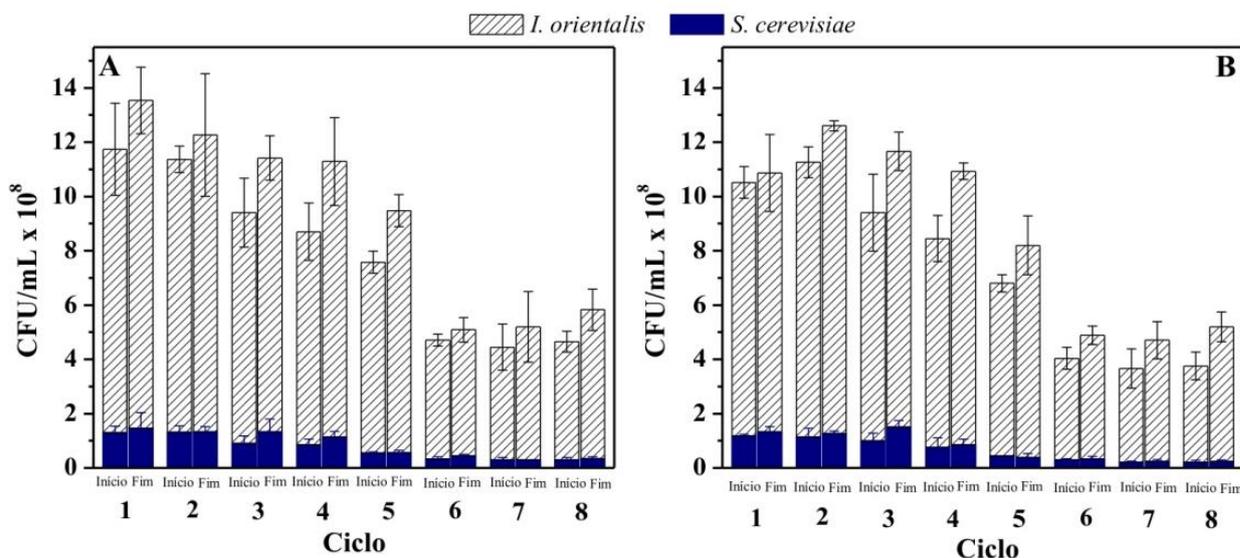
formado em condições anaeróbicas (VANDIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Tanto o glicerol interno quanto o externo mostraram um aumento de concentração quando as células foram submetidas à elevação da temperatura de 40°C para 42°C (Figuras 19E e 19F). O glicerol interno, além de atuar como um protetor osmótico também contribuiu com a manutenção do balanço redox das células, em caso de estresse osmótico. No presente trabalho, o glicerol interno e externo produzido a 40°C mantiveram-se praticamente constantes durante os oito ciclos com um valor médio de  $2,6 \pm 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{célula}}$  e  $5,0 \pm 0,7$   $\text{mg}/\text{mL}$ , respectivamente. Já a 42°C, as concentrações do glicerol interno e externo variaram ao longo dos ciclos.

O aumento da produção de glicerol pode ser considerado como um indicativo de estresse geral durante as fermentações industriais (BASSO *et al.*, 2011). Isto foi comprovado no presente trabalho, já que os níveis de glicerol interno aumentaram em 95% no 8º ciclo a 42°C em relação à fermentação a 40°C, ao passo que o glicerol externo teve um aumento de 56% nas mesmas condições. Oura (1977) observou que durante as fermentações industriais 5% a 8% dos açúcares disponíveis no meio são convertidos a glicerol pelas células de levedura.



**Figura 19** – Efeito da temperatura sobre a produção de biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C), consumo de ART (D) e produção de glicerol interno (E) e externo (F) durante a fermentação sucessiva de melaço pela co-cultura das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 40°C (■) e 42°C (■).

Como é mostrado na Figura 20, o número de UFC/mL de *S. cerevisiae* e de *P. kudriavzevii* apresentaram uma queda significativa a partir do 6º ciclo de fermentação tanto a 40°C (75% para *S. cerevisiae* e 57% para *P. kudriavzevii*) quanto a 42°C (79% para *S. cerevisiae* e 61% para *P. kudriavzevii*), com pouca variação depois deste ciclo. Este fato foi também verificado para os valores de acúmulo de biomassa (Figura 19A).



**Figura 20** – Efeito da temperatura sobre a permanência das leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* durante a fermentação sucessiva de melaço a 40°C (A) e 42°C (B).

Pelo exposto acima, pode-se concluir que a fermentação em batelada alimentada com reutilização de células sem períodos de revitalização celular entre os ciclos seria uma boa estratégia para a fermentação de melaço a temperaturas elevadas. No entanto, as células reutilizadas puderam ser recicladas somente por cinco ciclos sucessivos sem queda significativa no acúmulo de biomassa e viabilidade celular.

#### 4.4. Resistência aos estresses fermentativos

##### 4.4.1. Resistência aos ácidos e etanol

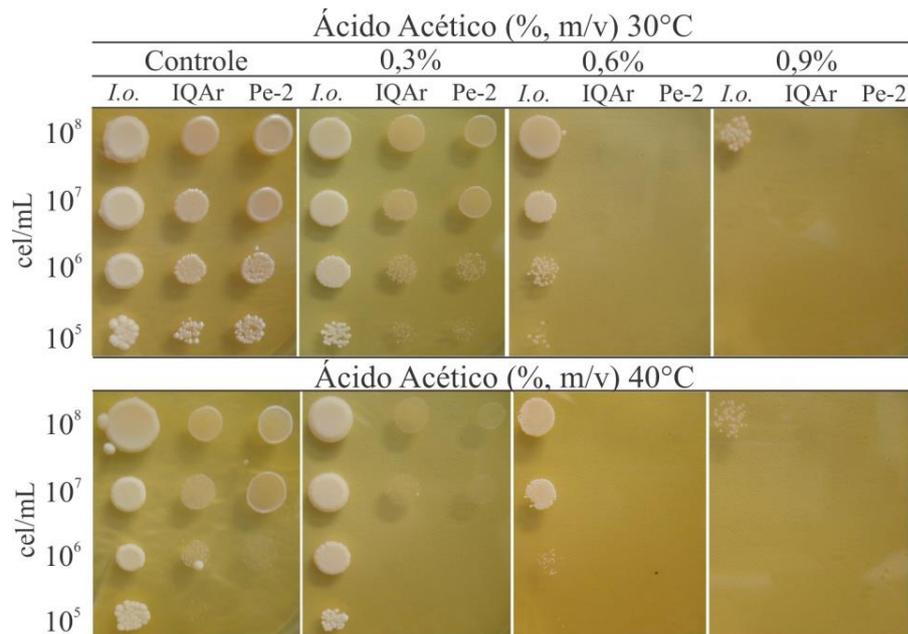
Embora seja bem conhecido que as leveduras podem tolerar baixos valores de pH, o tratamento com ácido sulfúrico após o término de cada ciclo fermentativo para reduzir a contaminação bacteriana, pode provocar perturbações fisiológicas nas

células (DORTA *et al.*, 2006). Além disto, as leveduras competem com os microorganismos contaminantes presentes na matéria-prima, tais como bactérias produtoras de ácido acético e láctico, o que contribui na diminuição do pH do meio. Pelo exposto, é importante que as leveduras utilizadas como inóculo das fermentações tolerem níveis baixos de pH e apresentem resistência a estes ácidos. Assim, a resistência de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* aos ácidos foi comparada como a linhagem PE-2, usada na maioria de destilarias brasileiras como inóculo em fermentações industriais.

Na Figura 21 é mostrada a inibição do crescimento pelo ácido acético em placas de YPD inoculadas com concentrações de células na faixa de  $10^5$  a  $10^8$  cel/mL. Segundo a replicação das linhagens de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* foi possível verificar a resistência da levedura *P. kudriavzevii* aos ácidos acético e láctico mesmo a 40°C. Confirmou-se que a inibição diminui com o aumento da quantidade de inóculo. Assim, observou-se crescimento com um inóculo de  $10^8$  cel/mL de *P. kudriavzevii* no meio contendo 0,9% de ácido acético, sendo que as leveduras *S. cerevisiae* ensaiadas (IQAr/45-1 e PE-2) foram inibidas com uma concentração de 0,6% deste ácido usando a mesma concentração celular. Já a 40°C, a inibição foi maior, pois nenhum crescimento foi observado para as linhagens IQAr/45-1 e PE-2 com 0,6% de ácido, ao passo que a levedura *P. kudriavzevii* apresentou inibição com 0,9% de ácido acético.

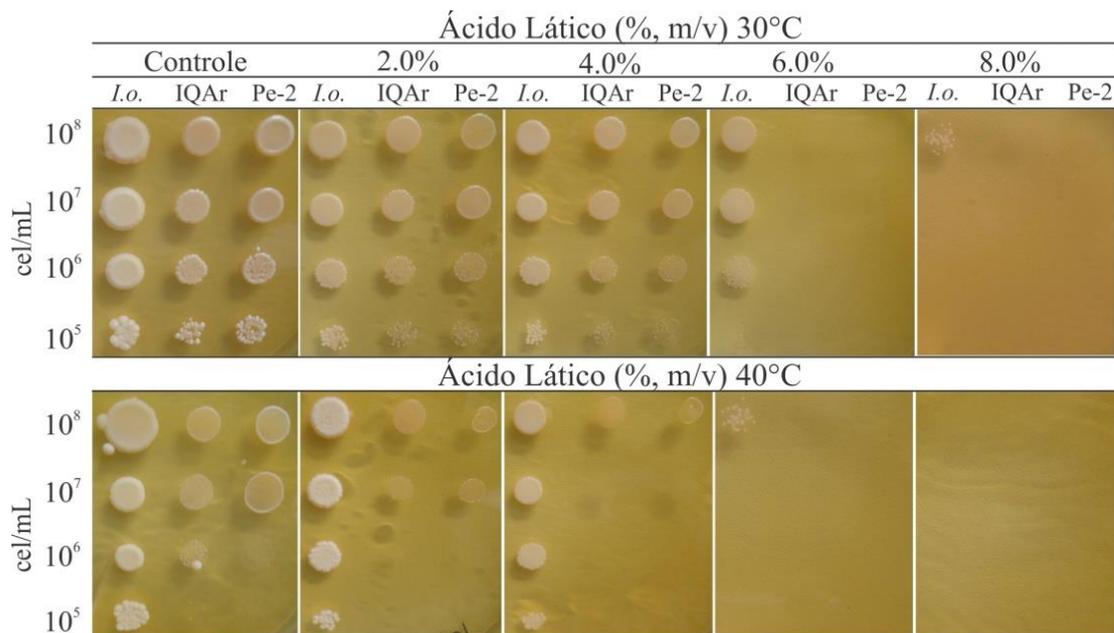
A tolerância de *P. kudriavzevii* à acidez tem sido muito estudada, por exemplo, Nakayama *et al.* (2008) comprovou a alta resistência de *Candida krusei* (*P. kudriavzevii*) quando comparada com uma linhagem de *S. cerevisiae* em presença de até 2,0% de ácido succínico a 30°C.

A resistência de isolados de *P. kudriavzevii* ao ácido láctico e acético tem sido comprovada em trabalhos anteriores, porém a uma temperatura de 30°C (HALM *et al.*, 2004; CASEY; DOBSON, 2003).



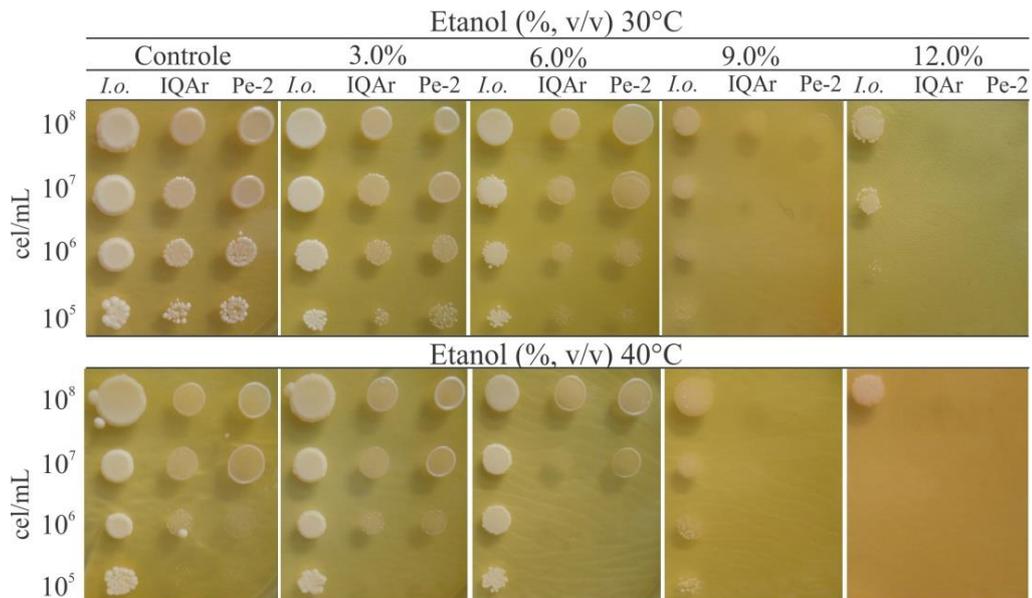
**Figura 21** – Crescimento da linhagem 195B de *P. kudriavzevii*, linhagem IQAr45-1 de *S. cerevisiae* e linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* em meio YPD contendo ácido acético (0-0,9%, m/v) a 30°C e 40°C.

A inibição do crescimento pelo ácido láctico em placa de YPD com quantidade de células replicadas na faixa de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> cel/mL é mostrada na Figura 22. Observou-se que a inibição aumentou com a diminuição da concentração de células. As células da levedura *P. kudriavzevii* sofreram menor inibição do que as células das leveduras *S. cerevisiae* (IQAr/45-1 e PE-2) a 30° e 40°C. A inibição de *P. kudriavzevii* ocorreu na presença de ácido láctico 6,0% utilizando como inóculo 10<sup>5</sup> cel/mL a 40°C, enquanto que a inibição total ocorreu com concentrações maiores de 8,0% deste ácido. Uma redução de 53% no número de UFC/mL de *S. cerevisiae* foi observada em fermentação contínua de glicose com uma concentração de 3,44% (m/v) de ácido láctico, ao passo que com adição de 5,35% (m/v) de ácido a inibição das células foi total (BAYROCK; INGLEDEW, 2004). Esses resultados parecem estar em conformidade com os obtidos no presente trabalho, já que o crescimento das linhagens IQAr/45-1 e PE-2 de *S. cerevisiae* foi completamente inibido com adição de 6% (m/v) de ácido láctico a 30°C e 4% (m/v) a 40°C.



**Figura 22** – Crescimento da linhagem 195B de *P. kudriavzevii*, linhagem IQAr45-1 de *S. cerevisiae* e linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* em meio YPD contendo ácido lático (0-8,0%, m/v) a 30°C e 40°C.

Na Figura 23 é mostrada a inibição do crescimento pelo etanol na faixa de 0% a 12% (v/v). A levedura *P. kudriavzevii* apresentou crescimento em placas contendo até 12% de etanol tanto a 30°C quanto a 40°C com uma concentração de 10<sup>8</sup> cel/mL. Enquanto que, as leveduras IQAr/45-1 e PE-2 foram inibidas totalmente com 9% de etanol a 30°C e 40°C utilizando a mesma concentração celular. Estes resultados foram inesperados para a levedura comercial PE-2, pois sabe-se que ela é muito tolerante ao etanol. No entanto, a inibição com 9% de etanol pode ter ocorrido devido ao uso de levedura seca, que foi reidratada em H<sub>2</sub>O antes de ser inoculada nas placas contendo etanol. Apesar de a viabilidade após reidratação ter sido relativamente alta (85%), o processo de secagem de algumas leveduras pode afetar o seu metabolismo e prolongar a sua fase *lag* de crescimento, retardando sua adaptação a condições de stress como altas concentrações de etanol. Estes resultados mostram a superioridade da linhagem 195B de *P. kudriavzevii* sobre as linhagens de *S. cerevisiae* ensaiadas.



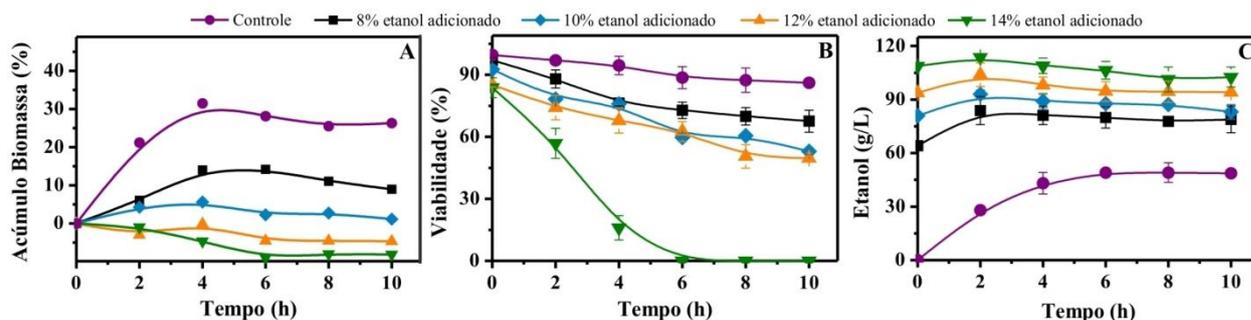
**Figura 23** – Crescimento da linhagem 195B de *P. kudriavzevii*, linhagem IQAr45-1 de *S. cerevisiae* e linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* em meio YPD contendo etanol (0-12,0%, v/v) a 30°C e 40°C.

#### 4.4.2. Efeito do etanol externo sobre a fermentação

A maioria de leveduras não-*Saccharomyces* não são tolerantes a concentrações de etanol superiores a 5-7% (v/v) e isto explica a sua perda de viabilidade quando a fermentação avança além desta quantidade de etanol acumulado (FLEET, 2003). Além disso, o etanol produzido durante um ciclo curto de fermentação nos processos industriais atinge valores na faixa de 7-11%, v/v (AMORIM *et al.*, 2011). Considerando-se o exposto, decidiu-se estudar o efeito do etanol adicionado ao meio YPD sobre a cultura mista de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii*.

A adição de concentrações maiores que 12% (v/v) de etanol ao meio (equivalente a 94,7 g/L) inibem drasticamente a produção de biomassa como mostrado na Figura 23. Por outro lado, a viabilidade foi afetada na faixa de 10% a 12% de etanol adicionado, sendo que com 14% ocorre uma perda completa de viabilidade após 6 h de fermentação (Figura 24B). Observou-se também que não houve produção de etanol pelas células da cultura mista quando concentrações acima de 12% são adicionadas no início da fermentação e que não houve evaporação de etanol a 42°C (Figura 24C). Já o experimento controle (sem adição de etanol) apresentou uma viabilidade de 90% quando a produção de etanol pelas células de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* foi máxima (46 g/L equivalente a 6,2 %, v/v ou), com um rendimento

teórico de 95% após 6 h de fermentação a 42°C. Um trabalho recente reportou uma linhagem de *P. kudriavzevii* capaz de produzir 8.2% (v/v) de etanol a 42°C, fermentando 150 g/l de glicose em meio YPD com um rendimento de 85% (KWON *et al.*, 2011), contudo o tempo de fermentação foi muito maior (48 h) àquele utilizado neste trabalho (8 h).



**Figura 24** – Efeito do etanol adicionado sobre a fermentação de meio YPD contendo 10% (m/v) glicose usando a cultura mista de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v) a 42°C: (-●-) controle sem adição de etanol, (-■-) adição de 8% (v/v) etanol, (-◆-) adição de 10% (v/v) etanol, (-▲-) adição de 12% (v/v) etanol, (-▼-) adição 14% (v/v) etanol.

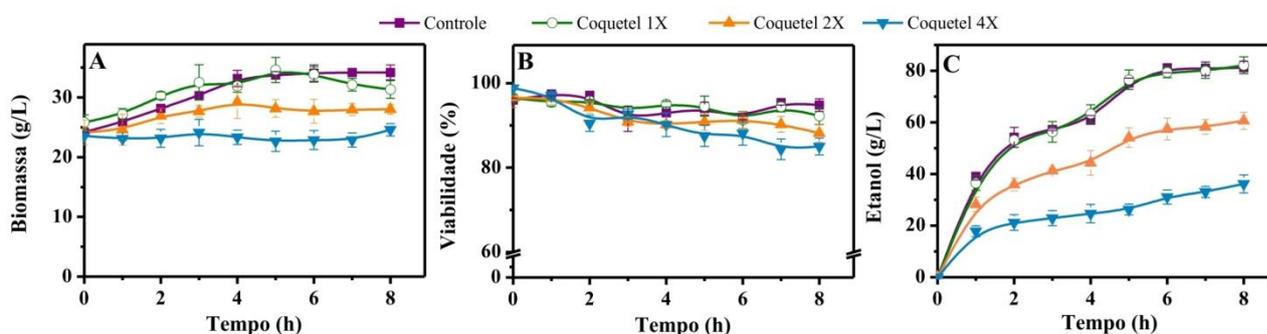
#### 4.4.3. Efeito da adição dos inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos

Durante o pre-tratamento da biomassa lignocelulósica (etanol de segunda geração), açúcares simples e uma ampla gama de inibidores são formados e liberados no meio. Estes inibidores, que podem ser organizados em três grupos principais: ácidos fracos, furanos e fenóis, afetam o desempenho da levedura, reduzindo a produção de etanol durante a etapa de fermentação (ALMEIDA *et al.*, 2007). Portanto, é fundamental o uso de linhagens com capacidade de tolerar estes inibidores resultantes da hidrólise. Hou-Rui *et al.* (2008), estudaram o uso da linhagem *P. kudriavzevii* CCTCC M 2006098 como agente destoxicante de um hidrolisado ácido lignocelulósico. Os autores demonstraram a capacidade desta levedura em metabolizar alguns compostos tóxicos presentes nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar como o ácido acético, furfural e guaiacol.

No presente trabalho decidiu-se estudar a tolerância da cultura mista de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* a um coquetel de inibidores a 34°C. A padronização da concentração dos inibidores contidos neste coquetel foi determinada em um trabalho

anterior neste laboratório (MASIERO, 2011). O coquetel apresentou a mistura dos seguintes inibidores: ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e vanilina.

Na Figura 25 é mostrado que quando o coquetel de inibidores foi adicionado no meio, o acúmulo de biomassa, produção de etanol e viabilidade foram equivalentes ao experimento controle. Porém, quando o coquetel adicionado foi concentrado duas e quatro vezes, a formação de biomassa foi afetada significativamente, indicado um forte efeito negativo sobre o processo de divisão celular. A redução da formação de biomassa foi de 61% para o meio contendo o coquetel concentrado duas vezes e de 89% para o coquetel concentrado quatro vezes, em relação ao experimento controle. Observou-se também uma pequena queda na viabilidade final quando o coquetel foi concentrado até quatro vezes (de 95% para 85% após 8 h de fermentação, Figura 25B). Por fim, a produção de etanol também foi afetada pela presença do coquetel, apresentando uma redução de 25% e 55% quando o coquetel foi concentrado duas e quatro vezes, respectivamente. Assim, o aumento da concentração do coquetel de inibidores acima de quatro vezes inibiu consideravelmente tanto o crescimento celular quanto a produção de etanol a 34°C. Segundo Almeida *et al.* (2007) os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar contem em média 4,4 g/L de ácido acético, 1,4 g/L de ácido fórmico, 1,9 g/L de furfural e 0,7 g/L de fenóis totais. Estas concentrações estão próximas às concentrações utilizadas no coquetel concentrado quatro vezes, onde observou-se inibição das células da co-cultura. Conforme descrito por Hou-Rui *et al.* (2008), a levedura *P. kudriavzevii* mostra tolerância a alguns inibidores, porém quando estes são colocados juntos no coquetel parecem ter um efeito significativo no metabolismo da levedura.



**Figura 25** – Efeito da adição dos inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos sobre a fermentação de meloço a 34°C utilizando 24 g/L do inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* (proporção inicial 1:3, m/v): controle sem adição de inibidores (-■-), coquetel de inibidores 1X (-○-), coquetel de inibidores 2X (-▲-) e coquetel de inibidores 4X (-▼-).

Kwon *et al.* (2011) estudaram os efeitos da adição de alguns inibidores, tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural e vanilina ao meio YPD inoculado com a linhagem IPE100 de *P. kudriavzevii* a 42°C. De acordo com os autores, a produção de etanol foi afetada pela adição de furfural em concentrações maiores a 2 g/L, enquanto que o 5-HMF foi menos inibitório, pois níveis significativos de etanol foram obtidos até com 4 g/L. Já a adição de 0,25-2,0 g/L de vanilina ao meio reduziu em 65% a produção de etanol após 54 horas. Estes inibidores foram adicionados separadamente no meio, já no presente trabalho, utilizou-se uma mistura dos inibidores. Apesar disto, a co-cultura de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* foi capaz de produzir altas concentrações de etanol quando inoculadas em um meio contendo os principais inibidores da fermentação.

## ***Conclusões***

---

Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho indicam que é possível fermentar melaço de cana-de-açúcar a elevadas temperaturas com retenção da viabilidade celular usando um inóculo misto de leveduras.

Em um trabalho anterior, uma linhagem da levedura *P. kudriavzevii* foi isolada de um reator operando em sistema contínuo a temperaturas maiores que 40°C. Nos últimos anos, esta levedura tem sido caracterizada em vários trabalhos como sendo uma levedura termotolerante, porém produzindo etanol a partir de açúcares simples (glicose e frutose). Confirmando estes resultados, o presente trabalho demonstra que a levedura *P. kudriavzevii* não secreta invertase, inviabilizando o consumo de sacarose pela mesma. Frente a este problema e com base em estudos realizados em um trabalho anterior, decidiu-se realizar fermentações mistas utilizando a levedura *S. cerevisiae* e a levedura *P. kudriavzevii* para a produção de etanol a partir de melaço a 42°C. Sabe-se que a levedura *S. cerevisiae* apresenta um alto rendimento na conversão dos açúcares em etanol em condições ótimas de temperatura (30-34°C), porém quando esta é submetida a temperaturas maiores que 40°C, a viabilidade celular começa cair drasticamente após 4 horas de fermentação em um processo de batelada alimentada em escala de laboratório (500 mL).

Os experimentos realizados neste trabalho demonstraram a existência de um sinergismo entre as leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii*. Assim, nas primeiras horas de fermentação a levedura *S. cerevisiae* produz invertase suficiente para hidrolisar a sacarose contida no melaço, deixando os açúcares prontos para serem consumidos e convertidos a etanol pela termotolerante *P. kudriavzevii*.

O inóculo misto destas duas leveduras produziu  $78,76 \pm 2,87$  g/L ( $9,98 \pm 0,36\%$ , v/v), equivalente a uma produtividade de  $9,85 \pm 0,38$  g/L/h e rendimento teórico de 90,67% em 8 horas de fermentação a 42°C. As condições de fermentação foram padronizadas como segue: 24 g/L inóculo misto (proporção inicial 1:3, m/v), concentração de açúcar no meio 257 g/L sem suplementação e alimentado durante as primeiras 4 horas.

O inóculo misto também foi usado em ensaios que tinham por objetivo simular o funcionamento de uma usina industrial de produção de etanol, onde as células de leveduras são recicladas após cada batelada de fermentação. Desta forma, foi possível reutilizar as células da cultura mista durante 5 ciclos consecutivos de fermentação tanto a 40°C quanto a 42°C sem perdas significativas na formação de biomassa, no fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e viabilidade celular.

Estes resultados representam uma inovação tecnológica para o setor sucroalcooleiro, uma vez que a utilização da co-cultura de *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* aumentaram a produção de etanol em condições de estresse. Entretanto, ensaios em escala piloto são necessários para a validação deste processo utilizando volumes maiores de fermentação.

Apesar da levedura *P. kudriavzevii* ser uma levedura pouco estudada a nível molecular, existem alguns trabalhos relatando a inserção de genes nela para conferir uma determinada função. Esta parece ser uma alternativa a seguir desde o ponto de vista biotecnológico para solucionar o problema do consumo de sacarose por *P. kudriavzevii*. Provavelmente a inserção do gene responsável pela síntese de invertase garantiria o consumo de sacarose e a produção de etanol a elevadas temperaturas em culturas puras de *P. kudriavzevii*. Esta seria uma proposta muito promissora para dar continuidade às pesquisas realizadas até hoje com a levedura *P. kudriavzevii*.

## ***Referências***

---

## Referências

- ABDEL-BANAT, B. M. A. et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, p. 861-867, 2010.
- ABERNATHY, D. G.; SPEDDING, G.; STARCHER, B. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. **J. Inst. Brew.**, v. 115, p. 122-127, 2009.
- AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Occurrence of function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 30-39, 2006.
- ALBERS, E. et al. Influences of the nitrogen sources on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3181-95, 1996.
- ALDIGUIER, A. S. et al. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, p. 217-222, 2004.
- ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; DEQUIN, S. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Lett.**, v. 498, p. 98-103, 2001.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, p. 340-349, 2007.
- ALMEIDA, M. J.; PAIS, C. S. Characterization of yeast population from traditional corn and rye bread doughs. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, n. 3, p. 154-158, 1996.
- AMORIM, H. V. et al. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M. et al. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. Cap. 5, p. 39-46.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.
- ANDRIETTA, S. R.; ATECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-16, 2006.
- ARGUESO, J. L. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Res.**, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechn. Adv.**, v. 28, p. 89-105, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Appl. Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org>>. Acesso em: 04 set. 2013.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1141 p.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Cap. 5, p. 85-100.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 19-25, 2005.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 10, p. 205-218.

CASEY, G. D.; DOBSON, A. D. W. Molecular detection of *Candida Krusei* contamination in fruit juice using citrate synthase gene cs1 and potential role for this gene in the adaptive response to acetic acid. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 13-22, 2003.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.**, v. 100, p. 43-53, 2003.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M. et al. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six variety of grape must. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 21, p. 149-155, 2004.

CORADELLO, L. F. C. **Condições de propagação e armazenamento da levedura IQAr/45-1 para a produção de etanol combustível**. 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

DE BARI, I. et al. Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **New Biotechnol.**, v. 30, p. 591-597, 2013.

DHALIWAL, S. S. et al. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 5968-5975, 2011.

DINH, T. N. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. **PLoS ONE**, v. 3, p. 1-7, 2008.

DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 177-182, 2006.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. L. Use of sugarcane molasses “B” as an alternative for ethanol production with wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 35, p. 605-614, 2012.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 86, p.11-22, 2003.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 979-995, 2008.

FLEET, G. H. Yeast spoilage of foods and beverages. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. London: Elsevier, 2011. v. 1, cap. 5, p. 53-63.

GALLARDO, J. C. M. **Produção de etanol a 40-42°C em uma co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis***. 2010.116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

GALLARDO, J. C. M. et al. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 405-411, 2011.

GARCÍA, V. et al. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 42, p. 226-229, 2010.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 3, p. 274-546, 1996.

GOMES, F. C. O. et al. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 2438-2447, 2007.

HALM, M. et al. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of single cells of *Candida Kruzei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 97-103, 2004.

- HAYFORD, A. E.; JAKOBSEN, M. Characterization of *Candida Krusei* strains from spontaneously fermented maize dough by profile of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **J. Appl. Microbiol.**, v. 87, p. 29-40, 1999.
- HISAMATSU, M. et al. Isolation and identification of novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions. **J. Appl. Glycosci.**, v. 53, p. 111-113, 2006.
- HOU-RUI, Z. et al. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 152, n. 2, p. 199-212, 2008.
- INGLEDEW, W. M. et al. **The alcohol textbook**. 5th. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. 552 p.
- ISONO, N. et al. M. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 113, p. 76-78, 2012.
- JADAV, J. S. S. et al. *Candida krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. **Can. J. Microbiol.**, v. 58, p. 937-952, 2012.
- JEON, B. Y. et al. Development of a serial bioreactor system for direct ethanol production from starch using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, v. 12, p. 586-576, 2007.
- JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 33, p. 139-155, 1996.
- JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. London: Elsevier, 2011. v. 1, cap. 3, p. 21-44.
- KIM, D-H.; HONG, Y-A. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, p. 1633-1638, 2008.
- KIM, J. et al. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1563-1569, 1996.
- KITAGAWA, T. et al. Construction of a beta-glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 1841-1853, 2010.
- KUDRIAVZEV, V. I. **Die systematik der hefen**. Berlin: Akademie-Verlag, 1960. 355 p.
- KUMAR, S. et al. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 1483-1489, 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts**: a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 939-954, 2008.

KURTZMAN, C. P.; SMILEY, M. J.; JOHNSON C. J. Emendation of the genus *Issatchenkia* Kudriavzev and comparison of species by deoxyribonucleic acid reassociation, mating reaction and ascospore ultrastructure. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30, n. 2, p. 503-513, 1980.

KWON, Y. et al. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 8099-8104, 2011.

LACHANCE, M. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 151-160, 1995.

LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 37, p. 528-536, 1991.

LALUCE, C. et al. A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia**: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 7, p. 166-195.

LAOPAIBOON, L. et al. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p.1497-1501, 2007.

LEE, J. et al. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnol. Adv.**, v. 17, p. 29-48, 1999.

LEE, J-H. et al. Screening of thermotolerant yeast for use as microbial feed additive. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.12, p. 162-165, 2002.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LIMITONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 3367-3374, 2007.

LIU, Y. P. et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 1736-1742, 2008.

LOPES, M. L. et al. Interaction between yeast and acetic acid bacteria in industrial fermentation for ethanol production: a case study. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEAST, 11th 2004, Rio de Janeiro. **Abstracts....** [S. I.]: International Commission on Yeast, 2004, p. 183.

LUCENA, B. T. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 298-306, 2010.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 532-5, 2004.

MASIERO, M. O. C. **Avaliação da tolerância de leveduras a um coquetel de inibidores que simule um hidrolisado de bagaço de cana quando adicionado a um meio sintético.** 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MUKHTAR, K. et al. Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 1-5, 2010.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. **Biotechnol. Adv.**, v. 28, p. 817-830, 2010.

NAKAYAMA, S. et al. *Candida krusei* produces ethanol without production of succinic acid; a potential advantage for ethanol recovery by evaporation membrane separation. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 706-714, 2008.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NAUDIN, O.; BOUDAREL, M. J.; RAMIREZ, A. Measurement of yeast invertase during alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v. 8, p. 591-592, 1986.

N'GUESSAN, F. K. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures for the alcoholic fermentation of *tchapalo*, a traditional sorghum beer. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 693-699, 2010.

OBEROI, H. S. et al. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 557-566, 2012.

ORTIZ-ZAMORA, O. et al. Isolation and selection of ethanol-resistant and osmotolerant yeasts from regional agricultural sources in Mexico. **J. Food Process. Eng.**, v. 32, p. 775-786, 2009.

OSORIO-CADAVID, E. et al. Detection and identification of wild yeasts in *Champús*, a fermented Colombian maize beverage. **Food Microbiol.**, v. 25, p. 771-777, 2008.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochem.**, v. 12, p. 19, 1977.

OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 65, p. 213-218, 2001.

PELCZAR, M. J.; CHANE, C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1996. v. 1.

PRETORIUS, I. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v.1, p. 675-729, 2000.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Statistics**. 2011. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>>. Acesso em: 13 maio 2013.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANDHU, S. K. et al. Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. **Ann. Microbiol.**, v. 62, p. 655-666, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. 540 p.

SCHNEPER, L.; DÜVEL, K.; BROACH, J. R. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 624-630, 2004.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, G.; FINK, G. R. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1991. v. 194, p. 21-37.

SILVA, L. A. F. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SILVA FILHO, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13-23, 2005.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; TONDEE, T. Melanoidin decolorization mechanism and some properties of *Issatchenkia orientalis* No.SF9-246. **African J. Biotechnol.**, v. 10, p. 9683-9693, 2011.

SOUZA, C. S. et al. A strategy to compare yeast strains and improve cell survival in ethanol production processes above 30°C. In: MENDES VILAS, A. (Ed.). **Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology**. Badjoz: Formatex, 2007. v. 1, p. 410-417.

SREE, N. K. et al. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresour. Technol.**, v. 72, p. 43-46, 2000.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. **J. Ferment. Bioengin.**, v. 79, p. 449-452, 1995.

TECLU, D. et al. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **J. Hazard. Mater.**, v. 161, p. 1157-1165, 2009.

THALAGALA, T. A. T. P. et al. Study on ethanol fermentation using D-Glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121. **J. Appl. Glycosci.**, v. 56, p. 7-11, 2009.

TOIVARI, M. et al. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresour. Technol.**, v. 133, p. 555-562, 2013.

TORIJA, M. J. et al. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, p. 47- 53, 2003.

TRUMBLY, R. J. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 15-21, 1992.

VANDIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 199-224, 1986.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 1998. 362 p.

WANAPU, C.; SRIPROMRAK, A.; MUAENJANG, T. Ethanol production by thermotolerant *Issatchenkia* spp. S1. In: EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 14th, 2009, Barcelona. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier, 2009. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B8JG4-4X0HHNB-MF&\\_user=972052&\\_coverDate=09%2F30%2F2009](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B8JG4-4X0HHNB-MF&_user=972052&_coverDate=09%2F30%2F2009)>. Acesso em: 19 fev. 2011.

WARD, O. P.; SINGH, A. Bioethanol technology: development and perspectives. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 53-80, 2002.

WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 482-487, 1999.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 30, p. 148-194, 1984.

YUANGSAARD, N. et al. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 577-588, 2013.

ZECH, M.; GORISCH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible inactivation by components of industrial molasses media. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 41-46, 1995.

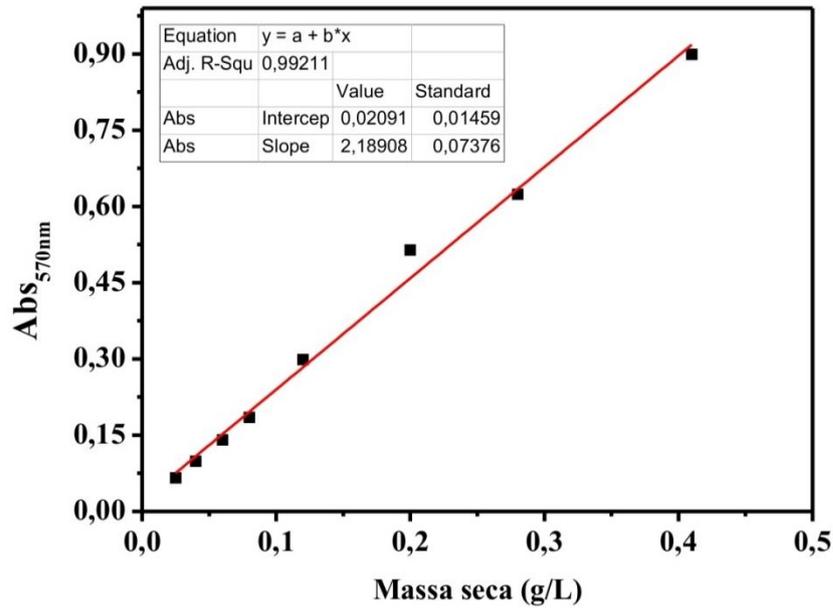
ZHANG, H-R. et al. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 152, p. 199-212, 2008.

ZHANG, Z. Batch fermentation and fermentor design. In: INGLEDEW, W. M. et al. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. Cap. 17, p. 229-257.

## ***Apêndice***

---

## APÊNDICE A – Curvas de calibração

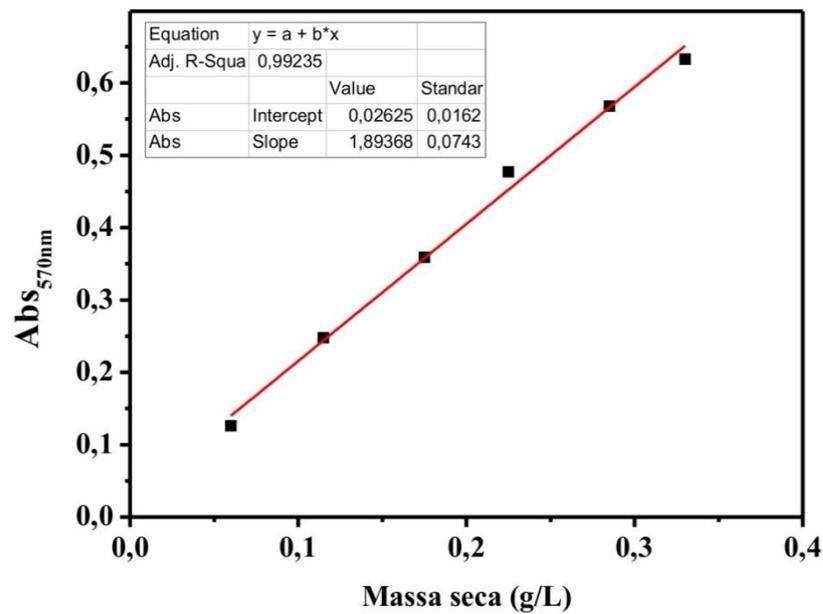


**Figura 1** - Curva de calibração para determinação de biomassa da linhagem 195B da levedura *Pichia kudriavzevii*. A equação da reta  $y = a + b.x$  mostrou o seguinte: coeficiente angular  $b=2,189$ ; intercepto da reta  $a=0,021$  e fator de correlação ( $R^2=0,992$ ) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = 0,021 + 2,189 \cdot massa$$

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs - 0,021}{2,189}$$

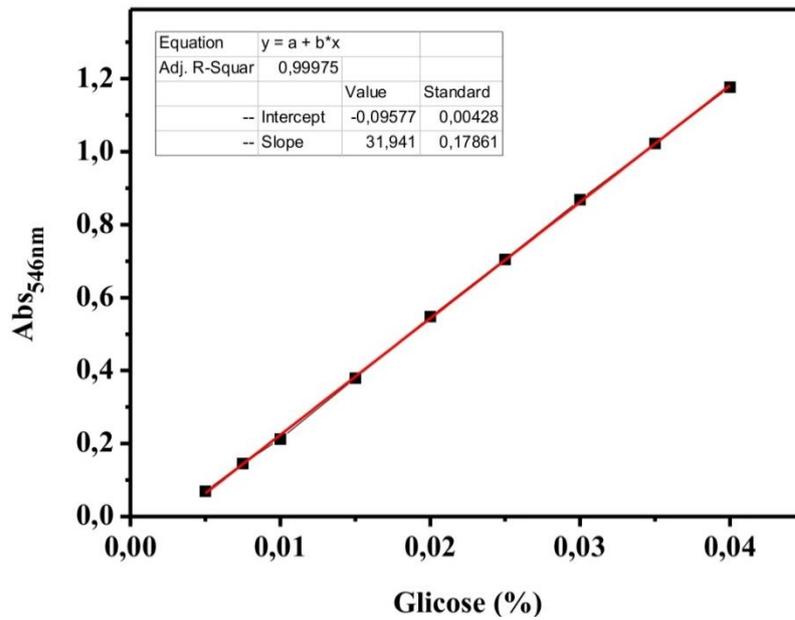


**Figura 2** - Curva de calibração para análise de biomassa da linhagem IQAr/45-1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A equação da reta  $y = a + b.x$  mostrou o seguinte: coeficiente angular  $b=1,894$ ; intercepto da reta  $a=0,026$  e fator de correlação ( $R^2=0,992$ ) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = 0,021 + 2,189 \cdot massa$$

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs - 0,026}{1,894}$$

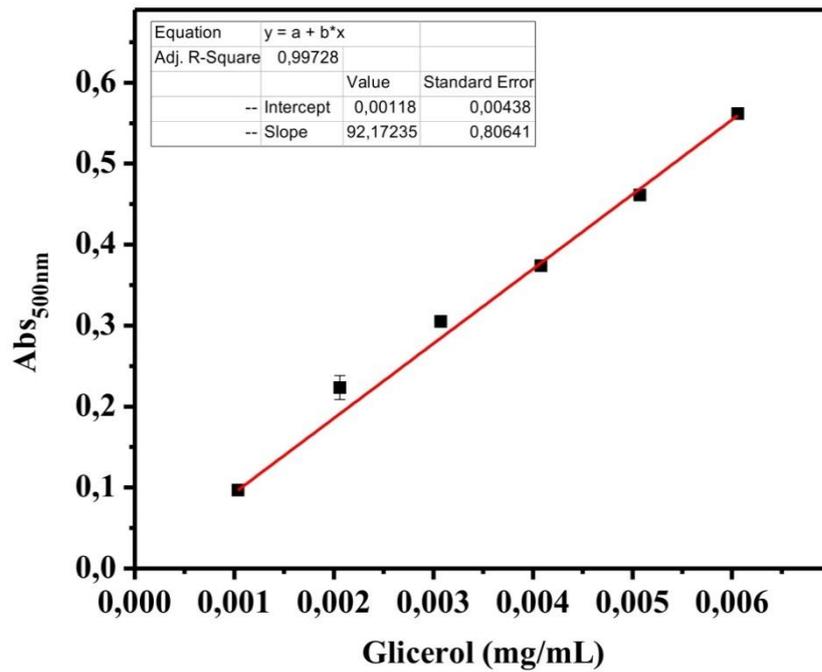


**Figura 3** - Curva padrão de calibração de glicose 0,2% (m/v) para dosagens de açúcares redutores totais pelo método DNS (MILLER, 1959). A equação da reta  $y = a + b.x$  mostrou o seguinte: coeficiente angular  $b=31,941$ , intercepto da reta  $a= -0,096$  e fator de correlação ( $R^2=0,999$ ) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = -0,096 + 31,941.glic$$

$$\% Glic = \left( \frac{Abs + 0,096}{31,941} \right)$$



**Figura 4** - Curva padrão de calibração de glicerol 0,208 mg/mL para dosagens de glicerol interno e externo pelo kit enzimático. A equação da reta  $y = a + b \cdot x$  mostrou o seguinte: coeficiente angular  $b=92,172$ , intercepto da reta  $a= -0,001$  e fator de correlação ( $R^2=0,997$ ) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = 0,001 + 92,172 \cdot glicerol$$

$$glicerol (mg/mL) = \frac{Abs - 0,001}{92,172}$$