

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESEMPENHO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS EM
PROCESSO FERMENTATIVO.

Álvaro Luís Púglia

Tecnólogo em Produção de Açúcar e Alcool

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESEMPENHO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS EM
PROCESSO FERMENTATIVO.

Álvaro Luís Púglio

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Mio de 2006

P978p Púglia, Álvaro Luís
Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo
xiii, 42 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientador: Márcia Justino Rossini Mutton
Banca examinadora: Marcos Antonio de Castro e Souza, Clóvis Parazzi

Bibliografia

1. leveduras 2. ó-amilos es 3. *Saccharomyces diastaticus*.
2. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.13:633.73

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ÁLVARO LUIS PUGLIA, nascido em Catanduva aos 19 de junho de 1962, filho de Álvaro Puglia e Lídia Catóia Puglia, Graduado em Tecnólogo em Produção de açúcar e álcool pela Universidade Metodista de Piracicaba, Licenciado em Ciências com Habilitação em Química pela Universidade Norte Paulista de São José do Rio Preto, Especialização em Química Aplicada pela Universidade de Franca, Especialização em Gestão Industrial pela Fundação Getulio Vargas e Licenciado em Pedagogia pela Faculdade S'ao Luis de Jaboticabal.

*Dedico esta à minha família,
pelos momentos que estive distante*

AGRADECIMENTOS

O trabalho em questão não poderia deixar de conter esta página que considero uma das mais especiais. Tenho muito que agradecer a várias pessoas que muito se empenharam para me fazer chegar até aqui, possibilitando a concretização deste trabalho, em especial:

- ∞ Primeiramente tenho que agradecer à minha professora orientadora, **Dra. Márcia Justino Rossini Mutton** que com muita paciência, me ensinou os passos e me indicou por onde caminhar.
- ∞ À Usina Catanduva pela oportunidade de realização das experimentações, e aos gerentes, supervisores e aos operadores do processo, que com sabedoria me mostraram como atuar e reagir com grandeza em meio aos vários problemas que podem surgir diante de cada desafio.
- ∞ Aos meus pais, amigos e irmãos, pela atitude positiva que tiveram ao torcer por mim, esperando que eu atingisse os meus objetivos e realizasse os meus sonhos.
- ∞ A Deus, agradeço sempre, pois sem sua força divina e sua paixão incondicional nenhum de nós chegaria até aqui, ultrapassando os pensamentos negativos e as barreiras impostas pela vida.
- ∞ Aos Profs. Drs. Marco Antonio de Castro e Souza e Clóvis Parazzi, pelas contribuições.
- ∞ Aos colegas Leonardo L. Madaleno e David Banzatto pelo apoio na elaboração e construção deste trabalho e pela amizade que passamos juntos
- ∞ Aos colegas Gisele, Eduardo, Flávia, Sérgio, pela colaboração durante todos esses anos no laboratório de microbiologia.
- ∞ Expresso minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Matéria-prima	03
2.1.1 Cana-de-açúcar	03
2.1.2 Amido	04
2.2 Hidrólise enzimática do amido	05
2.2.1 α -amilases	06
2.2.2 α -D- glicosidases.....	06
2.2.3. Exo-1,4- α -D- glicanases	06
2.2.4 Ciclomaltodextrina-D-glicosidases	06
2.2.5 Glicoamilases	06
2.2.6 Pululanases	07
2.2.7 Isoamilases.....	07
2.2.8 α -amilases	07
2.2.9 Aplicação da enzima α -amilase Termamyl 120 mL para produção de açúcar	08
2.3 Fermentação.....	08
2.3.1. Hidrólise do amido por microrganismos.....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Microrganismos utilizados	13
3.2 Matéria-prima	13
3.3 Tratamentos	13
3.4 Meio de cultura	14
3.4.1 Manutenção das leveduras.....	14
3.4.2 Meio para produção das amilases	15
3.5 Preparo do fermento.....	15
3.6 Preparo do mosto de alimentação.....	15
3.7 Curva de calibração do amido.....	16
3.8 Condução da fermentação	16

3.9 Análises microbiológicas.....	17
3.10 Análises do mosto e do vinho.....	17
3.11 Delineamento estatístico	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS	38

DESEMPENHO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS EM PROCESSO FERMENTATIVO

RESUMO: A cana-de-açúcar é uma cultura importante para a economia do país, devido à sua alta eficiência na produção e acúmulo de sacarose. Entretanto, com a utilização crescente de cana crua tem se observado aumento de impurezas vegetais nos carregamentos, tais como folhas e pontas, ricas em amido, que interferem negativamente na produção de açúcar e álcool. Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho de leveduras com atividade amilolítica na produção do álcool. Os testes foram feitos com três linhagens de leveduras amilolíticas, J07, J32 e *Saccharomyces diastaticus*, em combinação com uma levedura alcoogênica (*Saccharomyces cerevisiae* – CAT-01) em mosto preparado de caldo de cana da variedade SP81-3250, que apresentava elevado teor de amido. No vinho foram realizadas análises de açúcares redutores totais, teor alcoólico, glicerol, acidez sulfúrica e viabilidade celular. Os resultados revelaram que a combinação da CAT-01 com a linhagem J07 incrementou a produção de álcool. A levedura selvagem J32 não se constituiu boa fermentadora, podendo ser utilizada em combinação com outras linhagens de leveduras fermentadoras.

PERFORMANCE OF NATIVE YEASTS WITH POTENTIAL FOR AMYLOLYTIC ENZYME PRODUCTION IN FERMENTATION PROCESS

SUMMARY: Sugarcane is a very important crop to the economy of Brazil, because of its high efficiency in producing and accumulating sucrose. However, the rising rate of green cane harvest has resulted in higher levels of plant impurities as leaves and tops, which are rich in starch and affect both sugar and ethanol production. This work was carried out to evaluate the performance of amylolytic yeasts for ethanol production. The amylolytic strains J07 and J32, both isolated from the fermentation process, and *Saccharomyces diastaticus* were used in combination with *Saccharomyces cerevisiae* in a high-starch must from the sugarcane variety SP81-3250. The levels of total reducing sugars, ethanol, glycerol, sulfuric acidity and cell viability were determined. Results showed that the combination of *S. cerevisiae* with J07 increases ethanol production. The native yeast J32 has shown to be not good for fermentation, and for this reason must be used in combination with high fermentation yield strains.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar destinada ao processo industrial no Brasil apresenta baixos teores de amido. Entretanto, com a utilização crescente de cana colhida sem queima prévia, manual ou mecanicamente, tem se observado incremento dos teores de impurezas vegetais, comprometendo a qualidade da matéria-prima. Neste caso verifica-se maior heterogeneidade do carregamento, com maior relação ponta/colmos maduros, ou seja, mais palmito e cartucho. Deve-se entender como ponteiros (pontas) os entrenós imaturos, o cartucho contendo o meristema apical e parte das folhas, que em condição normal é da ordem de 10 a 15%. Segundo STUPIELLO (2000), as pontas apresentam composição variável em função do estágio de maturação, com pureza variando de 35 a 70%, quando o colmo apresenta pureza de 83 a 90%. Neste caso, as pontas, em condição de baixa maturação, apresentam elevados teores de açúcares redutores, aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polissacarídeos totais, além de menores teores de sacarose.

A utilização de cana com elevados teores de pontas deverá interferir no processo produtivo destinado à produção de etanol, uma vez que os compostos fenólicos, presentes em até seis vezes mais concentrados nas pontas, atuam como inibidores das leveduras fermentadoras, reduzindo a viabilidade e o brotamento das células (RAVANELI, 2005). Por outro lado, as substâncias amiláceas requerem a sacarificação prévia do amido a fim de converter todo polissacarídeo em glicose. No processo enzimático de sacarificação, destacam-se as enzimas alfa-amilase de origem bacteriana e glicoamilase de origem fungica, que hidrolisam o amido, convertendo toda a cadeia em açúcares fermentescíveis. O principal agente da fermentação industrial, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é incapaz de utilizar diretamente o amido para produção de etanol necessitando de uma etapa previa de sacarificação para que o carboidrato possa ser fermentado. Entretanto, deve-se destacar que algumas linhagens de leveduras apresentam atividade amilolítica significativa, como a *Saccharomyces diastaticus*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de linhagens de leveduras com atividades amilolíticas, na degradação do amido presente no

mosto do caldo de cana, quando em processo normal de produção de álcool, tendo em vista viabilizar o incremento da eficiência fermentativa.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. Matéria-prima

2.1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar sempre foi uma cultura importante para a economia agrícola do país, passando por períodos de altos e baixos, acompanhando o desenvolvimento da economia nacional e mundial. Vários fatores interferem no resultado agroindustrial desta atividade, dentre eles a produtividade e qualidade da matéria-prima, além das condições de processamento que permitam aperfeiçoar os rendimentos industriais. Sob esta ótica verifica-se que é imprescindível utilizar matéria-prima de qualidade para que os produtos finais atendam as exigências do mercado. Os cuidados com a produção de açúcar ou álcool, iniciam-se com o processo de colheita, objetivando enviar para a fábrica cana com menor tempo de queimada e/ou de corte, com menores teores de impurezas minerais e vegetais (ROSSETTO, 2005).

A presença de impurezas vegetais como folha verde e seca, nos carregamentos de cana entregue nas usinas de açúcar, tem preocupado não só por se tratar de um material sem qualquer valor tecnológico para o processamento, mas também pelos problemas que podem provocar. Dentre eles o aumento da cor do caldo clarificação e conseqüentemente na cor do açúcar produzido com redução de sua qualidade para o mercado. Outra conseqüência do processamento de matéria-prima de baixa qualidade, com elevados teores de impurezas é o volume do lodo decantado nos classificadores, cujo aumento causa maior recirculação e maior volume do caldo filtrado, com maiores perdas de sacarose e maior utilização dos filtros rotativos a vácuo. (BOVI & SERRA, 2001).

A quantidade e o tipo de impurezas presentes na matéria - prima tem influência sobre diversos parâmetros da composição do caldo de cana, tais como Brix, Pol., açucare redutores e cinzas. As principais impurezas vegetais provêm da própria cana-de-açúcar e podem ser constituídos por folhas secas, cartuchos, palmitos. Também o solo e em alguns casos, ervas daninhas que infestam o canavial sem o devido controle.

A prática da queima do canavial altera a composição à cana crua. As impurezas causam um aumento da fibra industrial e, conseqüentemente, redução na capacidade de moagem e extração (BOVI & SERRA, 2001).

2.1.2. Amido

O amido é um composto encontrado na cana-de-açúcar, concentrando-se principalmente nas pontas e folhas, e atuam como fonte alternativa de reservas de energia para planta. A composição do amido da cana é de aproximadamente 20,05 de amilose e 8,0% de amilopectina. (GODOY, 2004).

O amido é um homopolissacarídeo formado por dois polissacarídeos muito semelhantes, a amilose e a amilopectina, em proporções que variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta. A amilose é formada de cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina apresenta estrutura altamente ramificada, possuindo cadeias de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4 das quais partes ramificações unidas por ligações α -1,6 (LEHNINGER, 2002). Amilose, geralmente, é constituída de 20 a 25 % de peso do amido e tem um tamanho médio de 100 unidades de glicose. O perfil das cadeias da amilopectina, normalmente tem uma distribuição bi modal com longas e curtas cadeias tendo uma média de 40 a 60 e 11 a 25 resíduos de glicose, respectivamente (LEHNINGER, 2002).

O amido é um dos principais produtos da fotossíntese na plantas superiores. A sacarose é translocada na planta para sustentar o crescimento, enquanto o amido é acumulado nos cloroplastos para servir como carboidratos durante os períodos em que a fotossíntese não está ocorrendo (HAMMOND & BURTON, 1983).

A maioria das espécies vegetais acumula uma quantidade suficiente de amido, durante o período de luz para suprir a demanda de energia no período escuro e manter um crescimento eficaz, (HEWITT et al., 1985). O amido acumulado durante o período de luz atinge cerca de 10 a 20% do peso da lâmina foliar seca no final desse período, (UPMEYER & KOLLER, 1973).

Os monossacarídeos são os principais produtos da fotossíntese nas plantas superiores. Da união de duas moléculas obtém-se a sacarose que é translocada na planta para sustentar o crescimento, enquanto o amido é acumulado nos cloroplastos, como carboidratos de reserva durante os períodos em que a fotossíntese não está ocorrendo (HAMMOND & BURTON, 1983).

Atualmente uma das preocupações da indústria Sucroalcooeira está relacionada com a presença de polissacarídeos no caldo de cana, pois eles são responsáveis pela redução na recuperação da fábrica e cristalização do açúcar, aumento da viscosidade dos méis, além de uma série de problemas operacionais. Dentre eles destacam-se a queda no rendimento da fermentação etanólica (AMORIM & OLIVEIRA, 1982; MAGRO, 2005).

De acordo com MAGRO (2005) as matérias amiláceas e feculentas são fermentadas após uma hidrólise, denominada sacarificação, através da qual o amido infermentescível é transformado em açúcares fermentescíveis. O amido pode ser facilmente hidrolisado usando enzimas amilolíticas. Essa enzima pode ser economicamente produzida por microrganismos (NIGAM & SINGH, 1995).

2.2. Hidrólise enzimática do amido

As enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos que compõem o grânulo de amido, amilose e amilopectina, são denominadas amilopectinas ou amiloses. Dependendo da ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: endoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectinas, e as exoamilases que hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas.

Para que ocorra uma conversão eficiente das macromoléculas do amido o composto de baixo peso molecular, é necessária a ação coordenada de muitas enzimas cujas especificidades são descritas a seguir (TÉO, 2005):

2.2.1 α -amilases

São exo-enzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir de extremidade não redutora da molécula liberando maltose, não sendo capazes de hidrolisar ligações α 1,6 dos substratos ramificados.

2.2.2 α -D-glicosidasas

São extensamente distribuídas entre os microorganismos, incluído fungo e, leveduras e bactérias. Estas enzimas são exo-hidrolases que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e/ou α 1,6 de dissacarídeos de cadeia curta, geralmente formando pela ação de outras amilases.

2.2.3 Exo-1,4- α -D-glicanases

São exoamilases que ao invés de liberar sucessivas unidades de maltose, como é o caso da α -amilase, liberam, por exemplo, maltohexose como os maiores produtos da ação da enzima sobre o amido.

2.2.4 Ciclomaltodextrina-D-glicosiltransferases

As enzimas exoamilases capazes de hidrolisar amido por uma série de complexas reações, a oligossacarídeos cíclicos não redutores (ciclodextrina).

2.2.5 Glicoamilases

São exoamilases que produzem α -D-glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio através da hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 removendo sucessivas unidades de glicose. As glicoamilase hidrolisam também ligações α -1,6, mas com uma velocidade muito menor. Também

chamadas de enzimas de sacarificação, são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubações por longos períodos.

2.2.6 Pululanases

São enzimas desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α ou β -amilase. O produto dessa hidrólise corresponde às maltotrioses. Dentro dessa categoria, estão também as isopululanases, que são enzimas que quebram as ligações glicosídicas α -1,4 do pululano, mas que não tem nenhuma atividade sobre o amido, o produto da ação dessas enzimas é a isopanose.

2.2.7 Isoamilases

Hidrolisam as ligações α -1,6 da amilopectina, glicogênio e polissacarídeos, mas não hidrolisa as ligações α -1,6 do pululano.

2.2.8 α -amilases

Corresponde a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando malto-olissacarídeos. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato:

α -amilases sacarificantes que hidrolisam 50 a 60 % de substrato e as liqueficientes, que hidrolisam cerca de 30 a 40 % do substrato.

2.2.9 Aplicação da enzima α -amilase Termamyl 120 L para produção de açúcar

De uma maneira geral as variedades de cana cultivadas no Brasil apresentam baixos teores de amido. Durante o processamento da cana crua há tendência de aumentar os teores de amido no caldo em virtude da presença de impurezas vegetais (folhas e pontas) na cana. Cerca de 50 % do amido presente no caldo é removida no processo, porém o restante passa, aparecendo quantidade significativa no produto final, comprometendo sua qualidade. Há recomendações para que se determine o teor de amido no caldo misto e xarope objetivando a identificação da qualidade da matéria-prima recebida e destinada ao processamento. Entretanto, para eliminação do amido, recomenda-se a aplicação de enzimas α -amilases, que pelo custo elevado, devem ser utilizadas de forma bem controlada, sendo a dosagem de 30 a 60g por tonelada de açúcar (COPERSUCAR, 2000).

2.3. Fermentação

Fermentação no sentido mais amplo possível pode ser definida como todos os processos no qual microrganismos capitalizam a conversão de uma dada substância em um determinado produto com aplicação direta de microrganismos (leveduras) em meios naturais ou sintéticos (ALVES, 2000).

As reações realizadas pelos microrganismos vivos são, na sua grande maioria, catalisadas enzimaticamente, tornando a velocidade das mesmas compatíveis com as exigências metabólicas. As leveduras produzem as invertases que catalisam a hidrólise da sacarose até glicose e frutose, resultando em mistura equimolecular destes açúcares que são absorvidos pelas células (ASSÊNCIO, 2002).

A fermentação do amido a etanol envolve três etapas: liquefação; sacarificação enzimática, representando um aumento no custo do produto final, (LALUCE & MATTON, 1984).

A técnica de fermentação associativa, usando uma levedura amilolítica e outra produtora de álcool, mostrou resultados favoráveis, na degradação do amido, (MACCARI JR. et al.,1996). Cerca de 90 linhagens de levedura estudadas apenas *Schwanniomyces castellii* e *Endomycopsis fibuligera* foram capazes de fermentar o amido solúvel para produção de álcool, em concentrações de até 150 gramas por litro, (FRELOT et al., 1984).

Além das leveduras, a fermentação pode ser eficientemente conduzida pelas bactérias *Zymomonas mobilis* e *Thermoanaerobacter ethanolicus* (ROITMAN et al., 1988).

Atualmente, vem se estudando linhagem levedura, visando o aumento da produção de glicoamilase para a hidrólise do amido na fermentação e aumento de produção de etanol (GUEDES et al., 1994).

2.3.1 Hidrólise do amido por microrganismos

A hidrólise do amido pode ser realizada pelas vias químicas ou enzimáticas, sendo o processo enzimático o mais vantajoso. Por esta razão, diferentes microrganismos com propriedades amilolíticas têm sido estudados. A hidrólise microbiana pode ser feita usando fungos com propriedades amilolíticas, (CARIOCA & ARORA, 1984).

A crescente demanda para a produção de etanol combustível e SCP (single cell protein) como alimento, do excesso da colheita de plantações ricas em amido e lixo industrial tem chamado a atenção para o potencial de leveduras amilolíticas para a bioconversão do amido em etanol e SCP em apenas uma etapa. Mais de 150 espécies de leveduras podem degradar o amido (Mc CANN & BARNETT, 1986). Leveduras capazes de assimilar amido produzem pelo menos dois tipos de amilases: alfa-amilase e glucoamilase. Alfa-amilase é responsável pela hidrólise de ligações alfa-1,4-D-glucosídicas e liberação de grupos redutores com alfa configuração. Em contraste a glucoamilase hidrolisam resíduos de alfa-1,4-D-glucose terminais de α -D-glucan α -D-glucose é produzida (MODENA et al, 1986). Em adição as ligações alfa-1,4-D-

glucosídicas, a glucoamilase produzida pelo fungo filamentosos, *Aspergillus awamori*, pode também hidrolisar ligações alfa-1,6, quando a ligação adjacente é seguida de uma ligação alfa-1,4. (NUNBERG et al, 1984).

A Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTASE) pode ser aplicada na hidrólise de amido, na formação de α -amilase, são enzimas importantes na sacarificação de amido e, tem sido observado que a combinação de ambas promove acréscimo na produção de açúcares livres (DEL RIO & MORETT, 1997).

A enzima CGTASE pode ser aplicada na hidrólise de amido para obtenção de sacarídeos fosfatados, que são capazes de reagir com minerais como cálcio, magnésio e ferro para formar complexos, que previnem a insolubilização destes minerais na alimentação animal (TO-O et al., 1997).

A α -ciclodextrina a partir de amido hidrolisado pela fermentação, proporciona eliminação da glicose e maltose, enquanto que o etanol aumentou a produção. Uma solução 10% (p/v) de amido de mandioca, liquefeita com α -amilase foi incubada com a enzima CGTASE usando: somente etanol (1% a 5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (12% p/v), mais nutrientes. As condições de reação foram: 38°C, pH 6,0 e 3,3 mL/L de CGTase. A produção de alfa - CD diminuiu com o aumento no equivalente de dextrose sendo que a máxima produção foi obtida para DE (dextrose) igual a 3,54. Este efeito inibitório é menor quando se utiliza a fermentação e ciclização simultâneas. (LIMA, 1975).

Além disso, a excreção de enzimas aminolíticas, traz como vantagens a redução de custo, permitindo que as etapas de sacarificação (hidrólise do amido em glicose) e fermentação sejam realizadas concomitantemente, melhorando a eficiência de conversão do amido (TUBB, 1986).

Após a celulose, o amido é o polissacarídeo mais utilizado comercialmente. Constitui a principal fonte de carboidratos na dieta humana. Está sendo utilizado como matéria-prima na produção de proteína microbiana, cerveja e etanol. (SOLOMON et al., 1978).

Cerca de 100 espécies de leveduras são capazes de hidrolisar o amido e a degradação destes em oligossacarídeo depende de amilases extracelulares produzidas

(SILLS et al., 1984). Esta característica está associada com a produção de pelo menos dois tipos de amilases, α -amilase e a glucoamilase. Poucas são as leveduras que possuem ambas as enzimas. Dentre estas, estão relacionadas espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Schwanniomyces* e recentemente, *Lipomyces*, (SPENCER-MARTIN & VAN UDEN, 1985).

A associação de leveduras produtoras de amilases e as leveduras capazes de produzirem etanol, ou a utilização de leveduras que possuem estas duas propriedades irá minimizar o custo da produção de etanol eliminando-se assim, a etapa de sacarificação. (LALUCE & MATTON, 1984).

Leveduras capazes de degradar o amido produzem pelo menos dois tipos de amilases: α -amilase e glucoamilases que hidrolisam resíduos de α -1,4-D-glucose terminais de β -D-glucan e β -D-glucose (MODENA et al., 1986). De acordo com NUNBERG, et al (1984), deve-se considerar também que a produção de glucoamilases produzidas por fungos filamentosos, como o *Aspergillus awamori*, podem hidrolisar ligações α -1,6 quando adjacente e seguida de ligação α -1,4-D-glicosídicas.

Por outro lado, de acordo com LALUCE & MATTON (1984), a degradação do amido para a produção de etanol não foi significativa quando se utilizou linhagens de leveduras amilolíticas. Considerando que o amido constitui uma abundante fonte de energia renovável, a obtenção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de produzir etanol a partir do amido é de grande relevância tecnológica (BIROL et al., 1998). Neste contexto, várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* já foram estudadas objetivando avaliar o tempo de fermentação (ABUD, 1991).

A *Saccharomyces cerevisiae* tem rápido crescimento celular, alta tolerância a etanol, é uma eficiente produção de etanol, é constituída por 48% de proteínas de qualidade e tem sido associada por séculos à produção de bebidas e alimentos. Sob esta ótica, a decisão mais correta parece ser a introdução de genes codificadores das enzimas amilolíticas para as linhagens industriais de *S. cerevisiae*. (GUEDES et al., 1994).

A degradação do amido por microrganismos pode ser feita por fungos com propriedade amilolíticas, tais como (*Amylomyces rouxii*, *Aspergillus oryzae*,

Chlamidomucor oryzae, *Rhizopus japonicus*), comumente associados com leveduras que fermentam os açúcares (LIMA, 1975).

A necessidade do uso de dois organismos, segundo DE MOT et al., (1985), está vinculada ao fato das leveduras apresentarem grande capacidade para hidrolisar o amido e serem pouco tolerantes ao álcool. Para superar esta limitação das leveduras alcoogênicas, novas técnicas têm sido propostas. Segundo WILSON et al., (1982), deve-se combinar microrganismos com atividade amilolítica e de metabolização da glicose até a produção de álcool. Dentre os diversos microrganismos estudados destacam-se *Schwanniomyces*, (levedura amilolítica) e leveduras alcoogênicas, (BOZE et al., 1987).

SILLS et al., (1984), observaram que em altas concentrações de amido a metabolização apresentou menor rendimento, quando se utilizou a levedura do gênero *Endomycopsis fibuligera*.

Segundo MACCARI JR. et al., (1996) a utilização da levedura *Schwanniomyces castelli*, proporcionou boa hidrólise do amido de batata, além de excelente crescimento celular e produção de etanol. Os estudos para otimização das condições de cultivo mostraram que estes parâmetros estão relacionados à condição do meio, além da associação de fatores com o rendimento.

De acordo com LALUCE & MATTON (1984), a linhagem *Saccharomyces diastaticus* é indicada para a conversão de amido a etanol, em combinação com levedura fermentadora. Simultaneamente à sacarificação do amido pela levedura amilolítica ou bolor, alia-se a metabolização dos açúcares quando efetivamente combinadas com leveduras fermentadoras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Tecnologia do Açúcar e do Alcool – Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal e Laboratório da Usina Catanduva S/A, Grupo Virgolino de Oliveira, durante a safra 2005/2006.

3.1 Microrganismos utilizados

As leveduras utilizadas para o desenvolvimento desta pesquisa constaram de uma linhagem de *Saccharomyces diastaticus* codificada como SD (ATCC 13007) levedura amilolítica definida como padrão, obtida da coleção da Fundação André Tosello, Campinas SP; uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* codificada como CAT-01, utilizada na Usina Catanduva S/A Açúcar e Alcool e duas linhagens de leveduras selvagens pertencentes à coleção do laboratório de Tecnologia do Açúcar e Alcool - Microbiologia das fermentações da FCA/UNESP, codificadas como J07 e J32, avaliadas como leveduras amilolíticas segundo TÉO (2005).

3.2 Matéria-prima

Utilizou-se como matéria-prima para o processo fermentativo, mostos obtidos a partir da extração do caldo dos colmos da variedade de cana-de-açúcar SP81-3250, colhidos mecanicamente, sem queima prévia da palhada, com elevados teores de impurezas vegetais. A colheita dos colmos ocorreu durante os meses de maio e junho/2005, em carregamentos provenientes de fazendas de produção da Usina Catanduva S/A.

3.3 Tratamentos

Utilizaram-se 14 tratamentos, com duas repetições cada, envolvendo as fermentações com inoculos simples e com inoculos compostos, conforme combinações descritas a seguir (Quadro 1):

Quadro 1 - Combinações de linhagens de levedura para estabelecimento dos tratamentos.

ORDEM	TRATAMENTOS
1	CAT -01 sem enzima α -amilase (S/E)
2	J07
3	J32
4	SD
5	CAT-01 + J07
6	CAT-01 + J32
7	CAT-01 + SD
8	J07 + J32
9	J07 + SD
10	SD + J32
11	SD + J07 + J32
12	CAT-01 + J07 + SD
13	CAT-01 + SD + J32
14	CAT -01 com enzima α -amilase (C/E)

3.4 Meios de cultura

3.4.1 Manutenção das leveduras

As linhagens de leveduras SD, J07 e J32 foram mantidas em meio YM (0,3g de extrato de levedura, 0,3g de extrato de malte, 0,5g de peptona, 1,0g de dextrose e 2,0g de ágar em 100 mL de água). O meio foi distribuído em tubos de ensaio (7 mL/tubo) e esterilizado por 15 minutos a temperatura de 121°C. Os microrganismos foram cultivados no meio de cultura sólido e inclinado, durante dois dias a 30°C, acrescentando-se a seguir glicerol (óleo mineral estéril), conservando-se em geladeira (5°C).

A levedura CAT-01 era mantida na forma liofilizada em refrigerador, sendo diluída antes do emprego na fermentação.

3.4.2 Meio para produção das amilases

Para produção das enzimas pelas leveduras o meio utilizado foi o YPS composto por 1,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de peptona e 2,0 g de amido solúvel em 100 mL de água.

3.5 Preparo do fermento

As leveduras isoladas foram reativadas e cultivadas em 100 mL de meio YM (Yeast extract and Malt extract – Difco, USA: 3,0 g de extrato de levedura, 3,0 g de extrato de malte, 5,0 g de peptona, 10,0 g de dextrose por litro de meio) por 24 horas a 30°C em incubadora com agitação a 100 rpm. A massa de células foi então transferida para 500 mL de YM e incubadas novamente nas mesmas condições. Após este período transferiu-se os inoculos para erlenmeyers de 500 mL, acrescentando-se caldo de cana a 5,18° Brix, até obter uma quantidade de células equivalentes a $1,0 \times 10^8$ células/mL para iniciar a fermentação.

3.6 Preparo do mosto de alimentação

O mosto de alimentação utilizado para os experimentos foi preparado em cuba de 20 litros através da diluição do caldo de cana com água destilada, sendo esterilizado em autoclave a 121°C, sob pressão de uma atmosfera por 15 minutos, obtendo uma concentração de 5,18 % Brix, acidez sulfúrica 0,367g/L, pH 5,6 e 4,883 % de açúcar

reductor total (ART). Após 30 minutos realizava-se a adição de amido solúvel quando a temperatura estava em 90°C, padronizando-se 1153 ppm %Brix de amido.

3.7 Curva de calibração do amido

Para construção da curva de calibração de amido procedeu-se a aplicação de 50 miligramas da enzima alfa-amilase, realizando-se uma varredura, construindo uma curva de concentrações com enzima em: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 miligramas por litro de mosto com uma concentração de amido em 1083 mg/L, obtendo assim uma curva indicando consumo do amido quando aplicou 50 miligramas de enzima alfa-amilase Termamyl 120L.

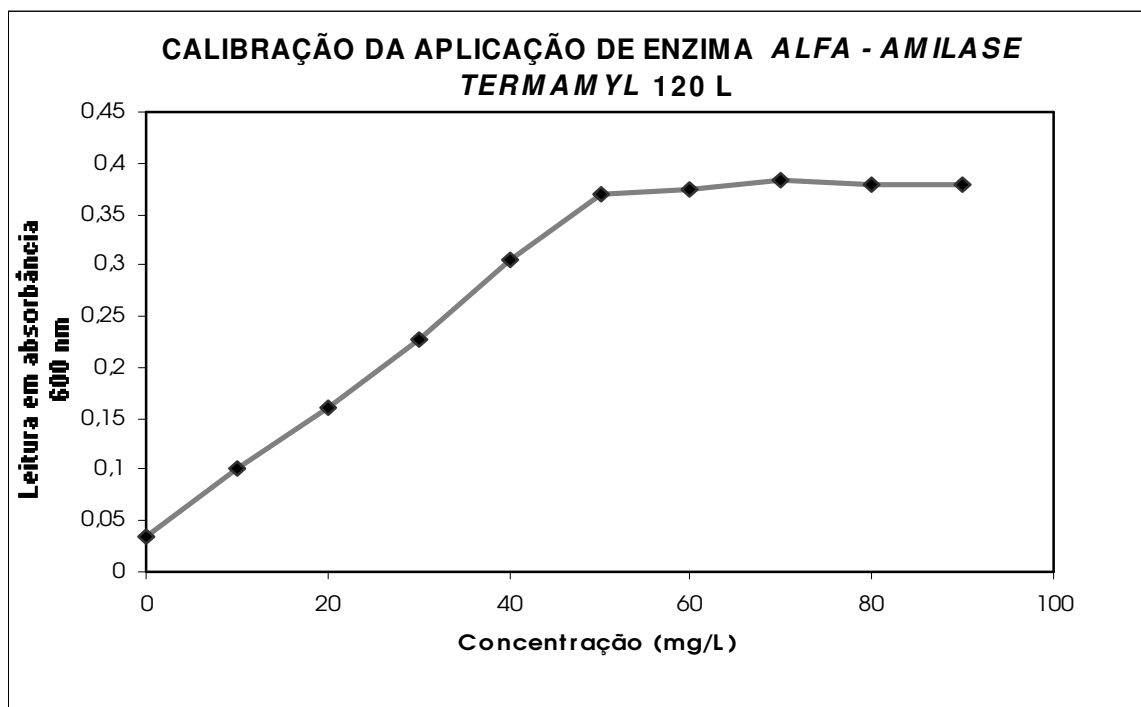


Gráfico 1. Representação gráfica das concentrações para a aplicação da enzima alfa-amilase na degradação do amido em mosto de alimentação em fermentação do álcool.

3.8 Condução da fermentação

Para fermentação, utilizou-se 300 mL mosto esterilizado, a 5,18° Brix, a temperatura de 32° C, ao qual foi inoculado $1,0 \times 10^8$ células/mL, sendo o frasco protegido com tampa de alumínio perfurada. A evolução do processo fermentativo foi acompanhada através da pesagem dos erlenmeyer a cada hora para estimar a perda de peso causado pela eliminação do CO₂ produzido. Após sete horas de fermentação, os frascos foram retirados da estufa e transferido para a bancada do laboratório onde permaneceram até atingirem temperatura ambiente para iniciar a pesagem final (vinho). Após o término da fermentação, o vinho bruto foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos, para separação da fração líquida (vinho delevurado) e fermento (massa de células).

Para os tratamentos com o emprego da linhagem CAT-01 na presença da enzima, retirou-se uma alíquota para a adição de 50mg/L da enzima α -amilase Termamyl® 120 L, Type L. para a degradação do amido adicionado, além do existente no próprio caldo preparado.

3.9 Análises microbiológicas

Para realização das análises microbiológicas retirava-se uma amostra do vinho no início (40 minutos após a inoculação do fermento) e final do processo fermentativo. A contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Metileno Rhinger como corante (LEE et al., 1981). O parâmetro microbiológico avaliado foi a viabilidade das células de leveduras.

3.10 Análises do mosto e do vinho

- a) pH do mosto e do vinho: determinado através de leitura direta em pHmetro digital.
- b) Acidez sulfúrica no mosto e no vinho: através da titulação do caldo ou do vinho em agitação com NaOH padrão 0,1N, expressa em g H₂SO₄/L, conforme (SILVA et al., 2003).
- c) Açúcares Redutores Totais do mosto e do vinho (g/100 mL): determinado segundo

método de Somogy & Nelson, adaptado por SILVA et al.(2003).

d) Concentração de Amido no mosto e no vinho (ppm % Brix): determinada segundo SILVA et al.(2003).

e) Teor de glicerol no vinho (mg/L): segundo método proposto por SILVA et al., (2003).

f) Determinação do CO₂ desprendido: através da diferença de peso entre o peso inicial de fermentação do erlenmeyer e o peso final.

g) Teor alcoólico no vinho (mg/L): determinado em densímetro digital segundo SILVA et al. (2003).

h) Rendimento fermentativo: calculado por estequiometria, considerando-se a produção de 64,75 mL, a partir de 100 gramas de ART. Objetivando a redução dos erros de medidas de volume optou-se por determinar as pesagens dos mostos, para posterior conversão desses pesos em volume, através de cálculo das massas com a respectiva densidade

3.11 Delineamento Estatístico

Para instalação do ensaio, empregou-se o delineamento em Blocos Casualizados com 14 tratamentos, em duas repetições. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do cálculo de médias, análises de variância e teste de Tukey, (BANZATO & KRONKA, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da análise de variância e Teste F para comparação entre os tratamentos avaliados estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Verifica-se que houve diferença significativa ao nível de 1% entre as combinações das linhagens de leveduras com e sem atividades amilolíticas para desprendimento de CO₂, Açúcares Redutores Totais (% ART), Amido consumido (ppm%Brix), Teor Alcoólico(%), pH, Acidez Sulfúrica (g/L) (Tabela 1). Procedimento semelhante foi observado para Glicerol (%), Viabilidade Inicial e Final (%), Desprendimento de CO₂ (%) e Rendimento fermentativo (%) (Tabela 2) do vinho, indicando que as leveduras apresentaram comportamento diferente entre as combinações avaliadas.

Tabela 1. Análise de variância de ART consumido, Amido Consumido, Teor alcoólico, pH e Acidez Sulfúrica do vinho.

ESTIRPE DE FERMENTO	VINHO				
	ART CONSUMIDO (%)	AMIDO CONSUMIDO (ppm%Brix)	TEOR ALCOÓLICO (%)	pH	ACIDEZ (g/L)
CAT—01 S/E	4,751	293,3	2,69	4,06	0,539
J07	3,948	573,5	2,43	4,14	0,439
J32	3,170	565,7	1,89	4,18	0,384
SD	2,924	559,4	1,78	4,19	0,279
CAT + J07	4,347	548,7	2,78	4,20	0,256
CAT + J32	3,868	462,2	2,48	4,15	0,358
CAT + SD	3,822	465,2	2,46	4,14	0,395
J07 + 32	3,550	602,6	2,20	4,19	0,329
J07 + SD	3,374	584,4	2,15	4,18	0,337
SD + J32	2,994	612,3	1,86	4,18	0,330
CAT + J07 + J32	4,090	496,9	2,57	4,22	0,275
CAT + J07 + SD	3,860	482,2	2,41	4,10	0,413
CAT + SD + J32	3,200	503,1	2,29	4,09	0,385
CAT + C/E	4,743	445,6	2,73	4,08	0,448
Teste F	2.566,47**	1.627,08**	556,94**	30,57**	34,08**
DMS (5%)	0,039	11,8	0,08	0,0517	0,074
CV (%)	0,42	0,57	0,83	0,31	5,05

*significativo a 5% ; ** significativo a 1%; ^{ns} não significativo

Tabela 2 Análise de variância de Glicerol, Viabilidade Inicial e Final, CO₂ Desprendido, e Rendimento Fermentativo do vinho.

VINHO					
ESTIRPE DE FERMENTO	GLICEROL (%)	VIABILIDADE INICIAL (%)	VIABILIDADE FINAL (%)	CO ₂ DESPRENDIDO (%)	R. FERMENTATIVO
CAT—01 S/E	0,0565	96,0	88,80	1,6095	85,22
JO7	0,0625	96,2	89,61	1,4943	76,30
J32	0,0795	96,4	91,27	1,2724	59,94
SD	0,0820	96,3	91,58	1,2427	56,51
CAT + JO7	0,0475	95,8	88,75	1,6832	87,07
CAT + J32	0,0575	96,0	89,10	1,5049	78,03
CAT + SD	0,0555	96,0	89,60	1,4932	77,79
JO7 + 32	0,0650	96,4	91,15	1,3865	69,23
JO7 + SD	0,0680	96,5	90,35	1,3405	67,92
SD + J32	0,0805	96,3	91,76	1,2677	58,69
CAT + JO7 + J32	0,0565	95,8	89,12	1,5402	81,02
CAT + JO7 + SD	0,0575	95,9	88,31	1,4705	75,94
CAT + SD + J32	0,0615	96,2	90,04	1,4301	72,28
CAT + C/E	0,0555	96,5	88,67	1,6140	86,47
Teste F	119,12**	0,88 ^{ns}	10,11**	70,97**	41,41**
DMS (5%)	0,0055	19,1088	2,09	0,0910	9,04
CV (%)	2,20	5,09	0,58	1,57	3,08

*significativo a 5% ; ** significativo a 1%; ^{ns} não significativo.

Considerando-se a ação da enzima alfa amilase sobre os teores de amido presentes no mosto esperava-se obter ação mais eficiente quando empregada em combinação com a linhagem CAT, melhorando o processo fermentativo. Entretanto, verificou-se desempenho semelhante da CAT com o sem o emprego da enzima, indicando que esta não foi eficiente sob as condições em que o estudo foi realizado. Em paralelo, pode-se observar que as linhagens JO7 e J32 confirmaram a habilidade amilolítica conforme relatado por TÊO (2005).

Observa-se na Figura 2 que o fermento CAT S/E, CAT+JO7 e CAT+C/E foram os inóculos que apresentaram maior desprendimento de gás carbônico (CO₂), diferindo significativamente da *Saccharomyces diastaticus* (SD) e J32, isolada ou em combinação. Este fato confirma que o desprendimento de CO₂ da JO7 pode ser elevado

quando em combinação com a CAT. A linhagem J07 hidrolisa o amido, liberando os açúcares na forma de glicose disponibilizando-os para que levedura fermentadora (CAT) sintetize etanol, com liberação de CO₂. O desprendimento de CO₂ pelas leveduras amilolíticas é menor, considerando-se que esta produção resulta da

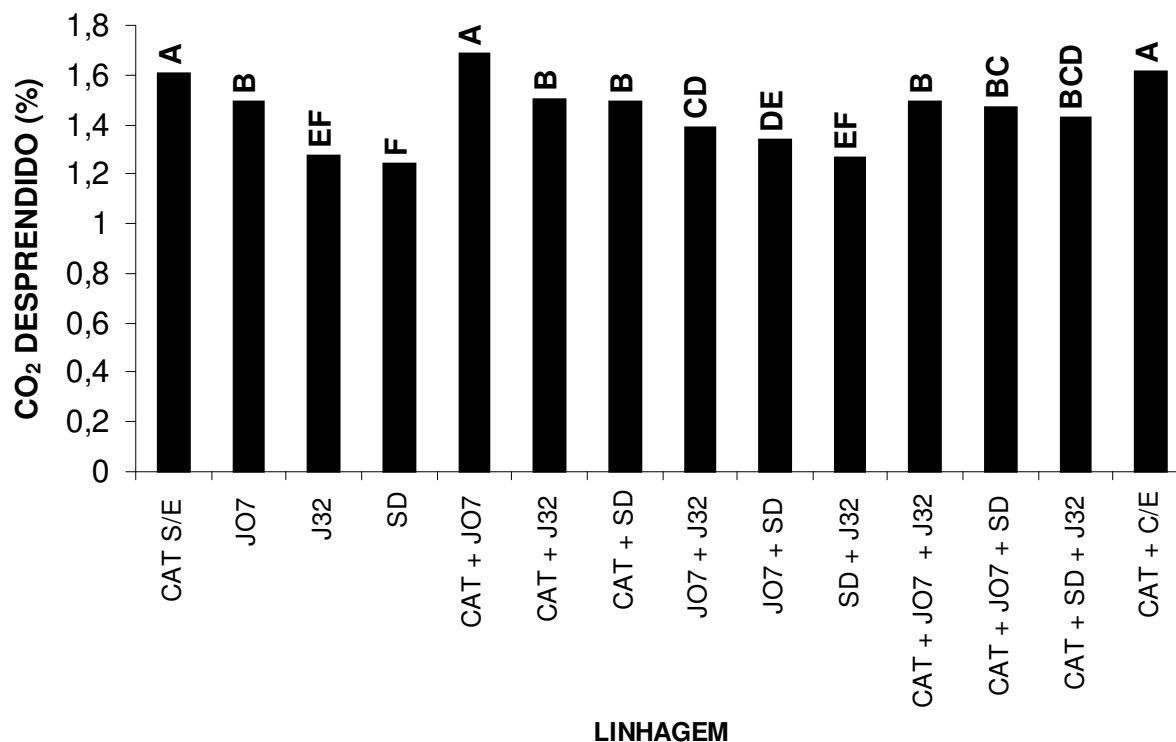


Figura 2. Representação das médias observadas para Desprendimento de CO₂ nos tratamentos. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

metabolização dos açúcares durante o processo fermentativo. Assim, as linhagens com atividades amilolíticas, que não possuem características fermentadoras, apresentam menor desprendimento de CO₂ quando comparadas com as alcoolgênicas (ALTERTHUM et al. 1984).

A Figura 3.1 confirma que o desprendimento de CO₂ é proporcional ao rendimento fermentativo. Assim, quanto maior o desprendimento de CO₂ mais elevado poderá ser o rendimento da fermentação. Além disso, a Figura 3.2 indica que o desprendimento de CO₂ não está relacionado com o consumo de amido.

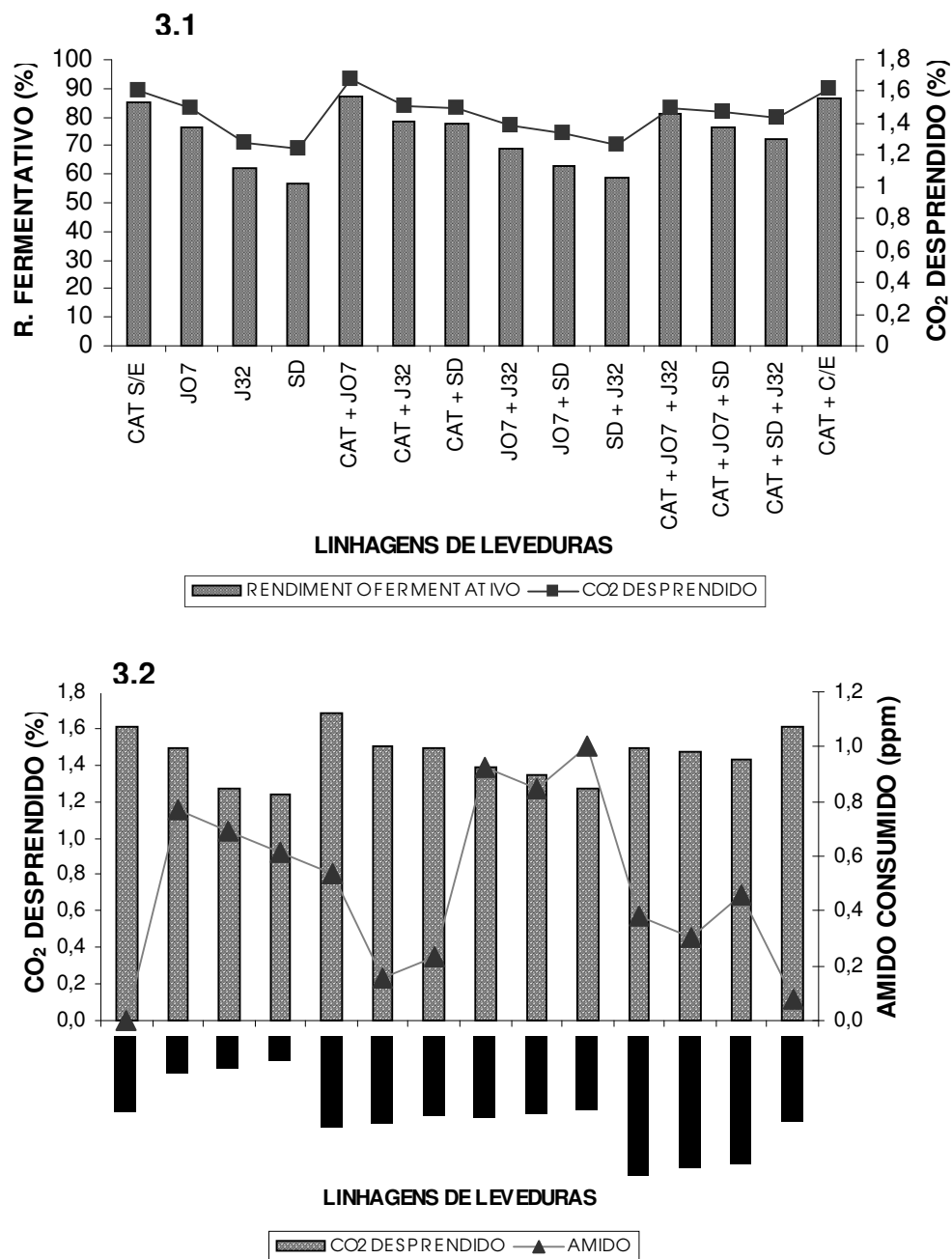


Figura 3. Representação gráfica das médias observadas para Desprendimento de CO₂ x Rendimento Fermentativo (3.1) e Desprendimento de CO₂ x Amido Consumido (3.2).

Na Figura 3.2 verifica-se que os fermentos SD e J32 não apresentaram elevada intensidade no desprendimento de gás carbônico, porém o fermento J07 obteve um resultado diferenciado das demais leveduras com atividade amilolítica.

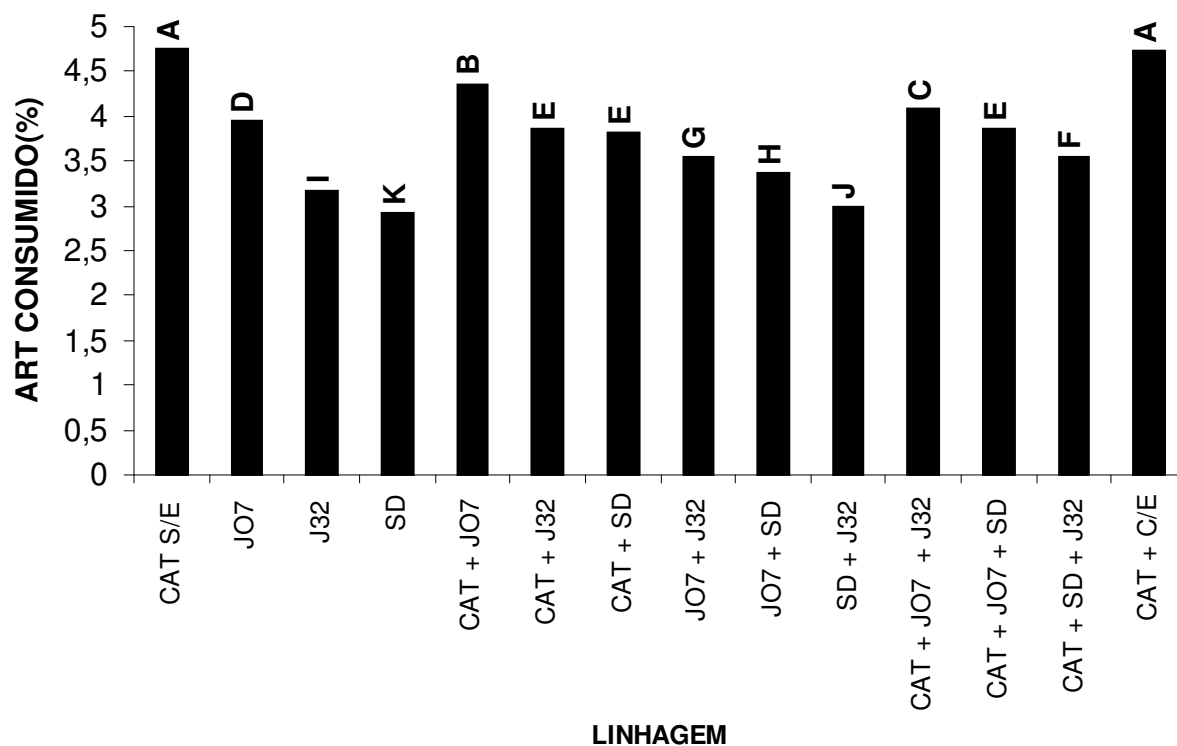


Figura 4. Representação das médias observadas para ART Consumido nos tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

Observa-se na Figura 4 que o fermento SD foi o inóculo que consumiu menor quantidade ART em relação às demais, enquanto a CAT (sem e com enzima) apresentou o maior consumo. A utilização de leveduras amilolíticas interferiu negativamente no consumo de ART da linhagem CAT. Contudo, a levedura J07 + CAT apresentou maior consumo de ART dos que os demais tratamentos com leveduras amilolíticas. O uso da enzima não interferiu no consumo de ART da linhagem CAT, entretanto, ABOUZIED & REDDY (1986) observou-se que o tratamento de mosto com adição de enzima amilolítica aumentou a quantidade de ART consumido.

A Figura 4.1 indica que quanto maior o consumo de ART mais elevado foi o rendimento fermentativo. Semelhante ao desprendimento de CO₂, o aumento do ART consumido não indica que o amido foi hidrolisado (Figura 4.2). A utilização da mistura CAT + J07 apresenta maior concentração de etanol, pois a linhagem J07 hidrolisa o amido enquanto que a CAT realiza a fermentação (Figura 4.3). LALUCE & MATTON, (1984) verificaram que o uso de linhagens amilolíticas foi um método efetivo para aumentar a metabolização do amido, sendo que a fermentação associativa poderia aumentar em 30% a produção de etanol (WILSON et al., 1982).

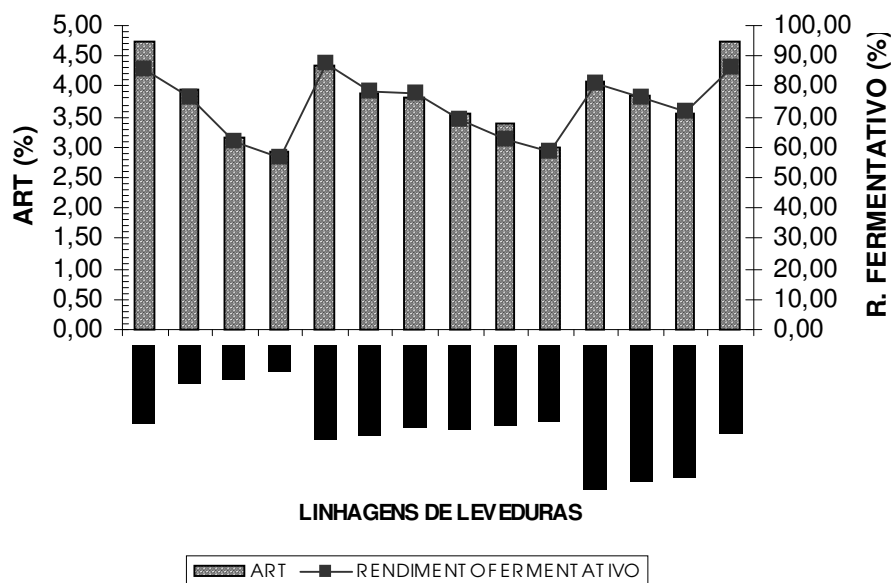


Figura 4.1. Representação das médias observadas para ART x Rendimento Fermentativo.

Observou-se que a combinação entre as leveduras amilolíticas SD, J07, J32, foram as que mais degradaram o amido, diferindo-se significativamente da linhagem CAT (Figura 5). Do mesmo modo observado anteriormente, a levedura J07 degradou elevada concentração de amido comparado com a utilização da enzima, o que contribuiu para o aumento do rendimento fermentativo quando a levedura amilolítica (J07) foi associada com a CAT (Figura 5.1).

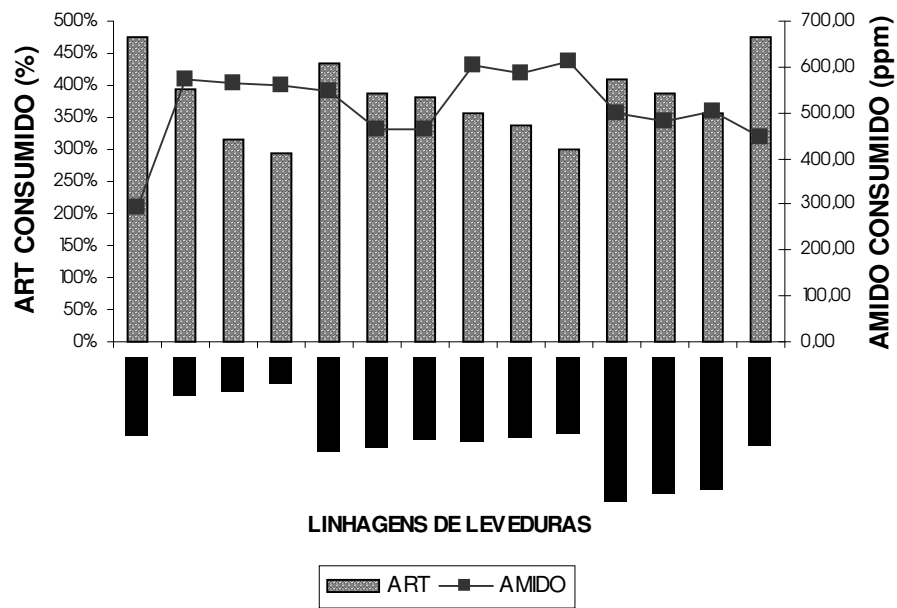


Figura 4.2. Representação das médias observadas para Consumo de ART x Amido Consumido.

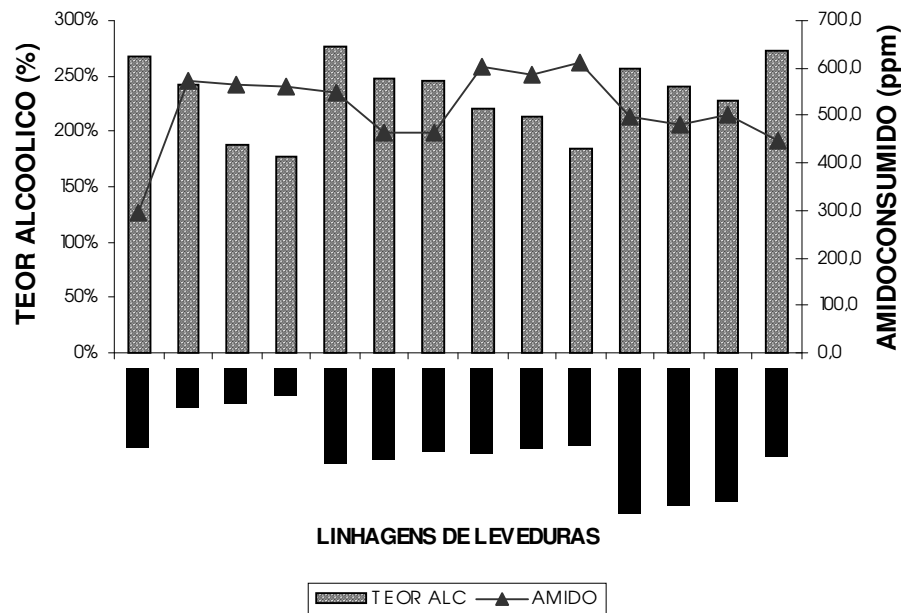


Figura 4.3. Representação das médias observadas para Teor Alcoólico x Amido Consumido.

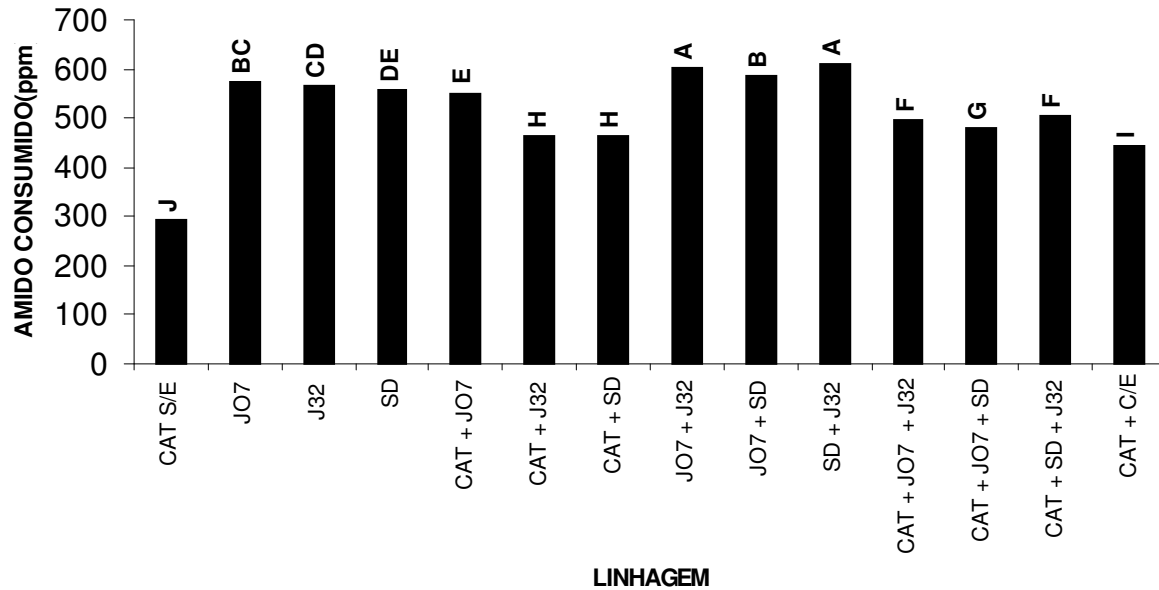


Figura 5. Representação das médias observadas para Amido Consumido nos tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

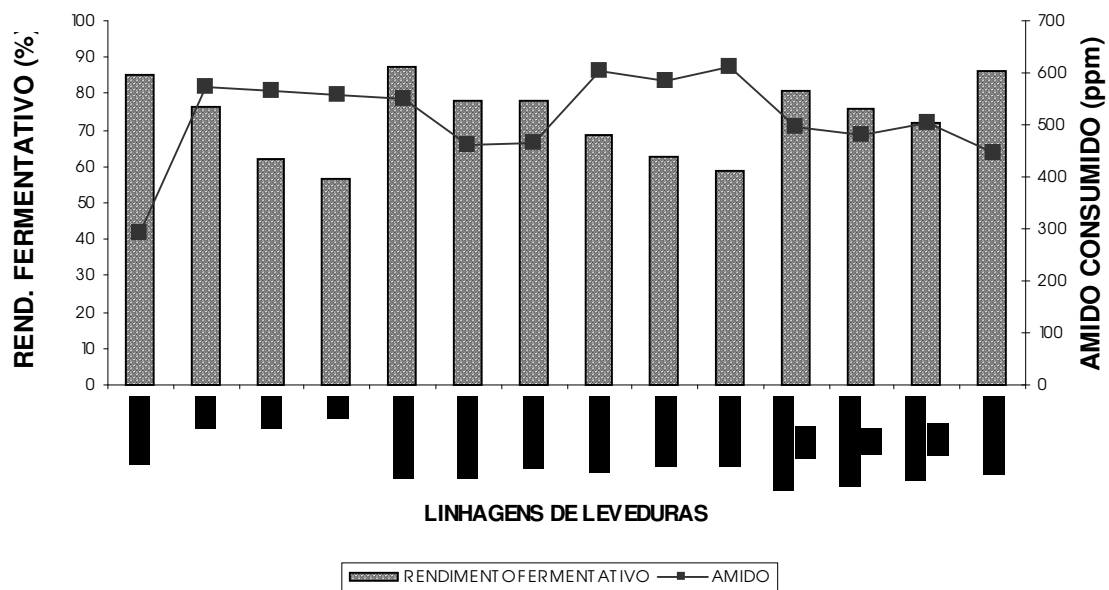


Figura 5.1. Representação da comparação entre o resultado do Rendimento Fermentativo x Amido Consumido no final da fermentação.

De acordo com a Figura 6, pode-se observar que o teor alcoólico foi significativamente maior quando se utilizou levedura fermentativa (CAT) com a amilolítica (J07) não diferindo do tratamento com a utilização de enzima (CAT+C/E). Observou também maior síntese de etanol e menor porcentagem de amido residual na combinação de *Saccharomyces cerevisiae* (fermentadora) e *Saccharomyces diastaticus* (SD - amilolítica).

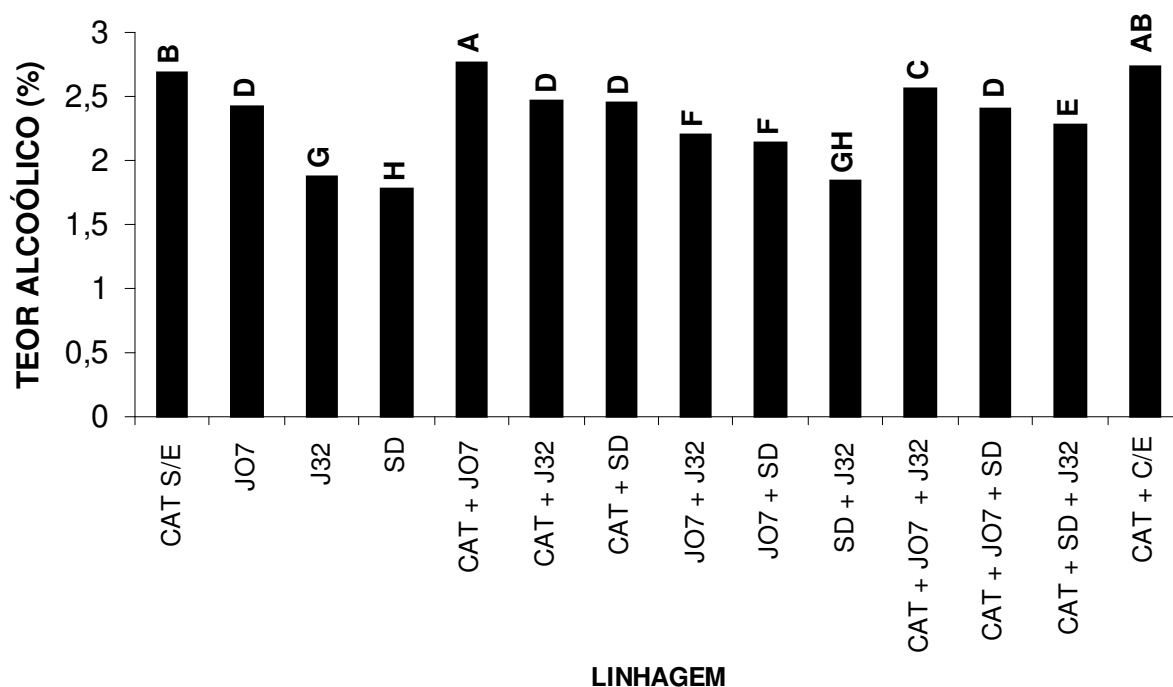


Figura 6. Representação das médias observadas para Teor Alcoólico (%) para os tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

Os resultados apresentados na Figura 7 indicam que nos tratamentos, em que foram utilizadas linhagens amilolíticas, houve aumento do pH (Figura 7A) enquanto que a acidez sulfúrica observada foi menor (Figura 7B). A mistura CAT+J07 apresentou menores quantidades de ácidos e mostrou pH elevado no vinho em relação aos demais tratamentos. Este comportamento foi confirmado por JANACEK, (1980) que observou

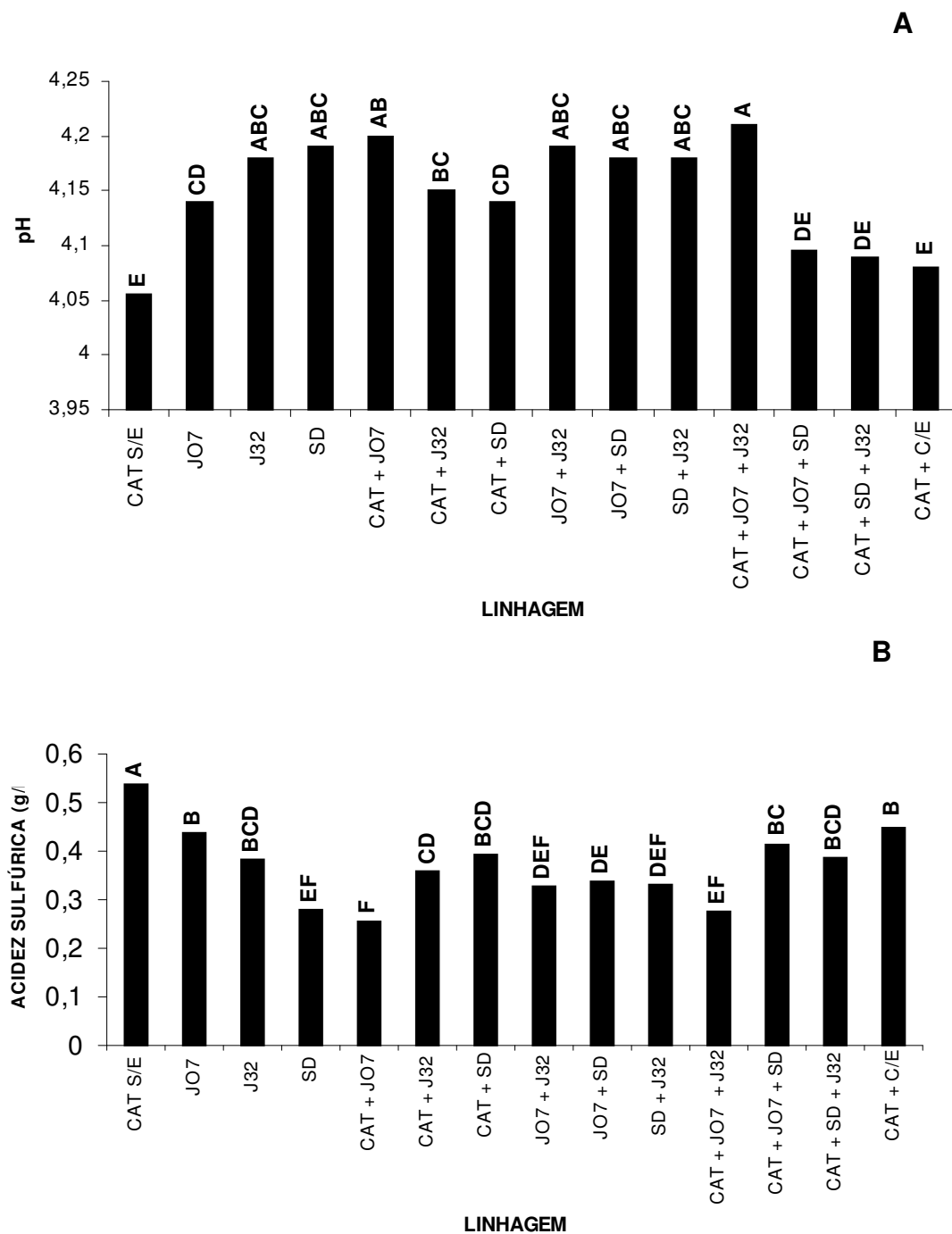


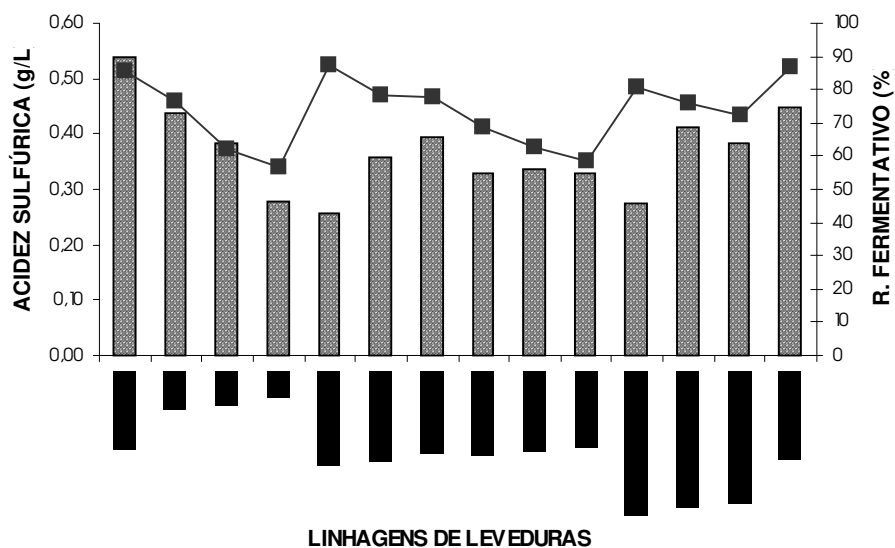
Figura 7. Representação das médias observadas para Acidez Sulfúrica (g/L) nos tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

que a liberação de íons H^+ juntamente com ácidos orgânicos levou ao abaixamento do pH do meio de suspensão de células. Quando o meio foi suplementado com glicose, ocorreu intensificação no abaixamento do pH demonstrando haver estreita correlação entre a glicólise e a liberação de íons H^+ , fato esse verificado no presente estudo.

Considerando-se o comportamento da acidez sulfúrica com o rendimento fermentativo (Figura 8.1) tem-se que o incremento da acidez relacionou-se de modo direto com o desenvolvimento do processo fermentativo. Esse fato era esperado pelo processo natural da metabolização dos açúcares, independentemente deste ser oriundo da hidrólise do amido (Figura 8.2). Na Figura 8.1, a linhagem fermentadora foi a que produziu maiores teores de ácidos, enquanto as amilolíticas liberaram menores quantidades de ácidos. Segundo ALVES et al (2000) e BASSO et al (1997), a acidez relaciona-se com o consumo de glicose na fermentação e conseqüente produção de etanol, confirmando os resultados obtidos.

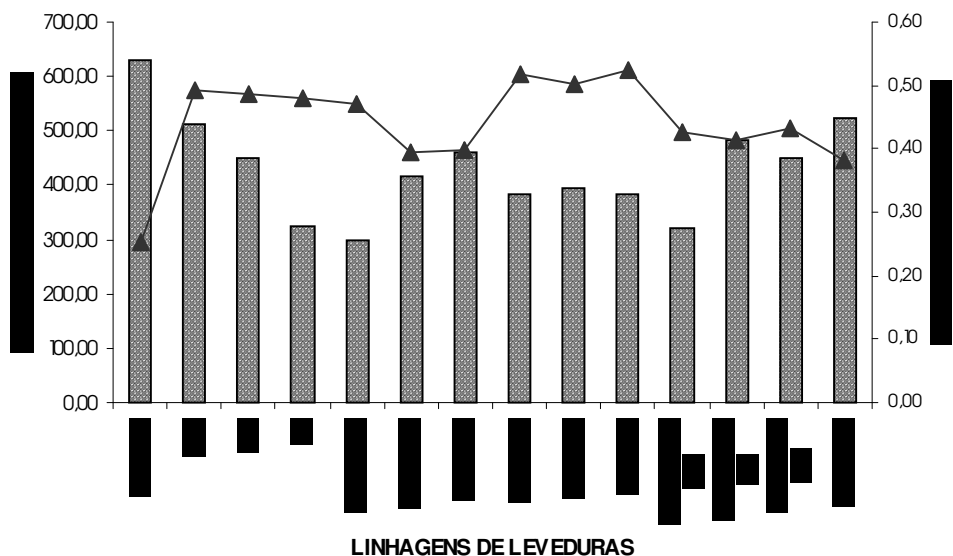
Cabe ainda ressaltar que o uso do tratamento JO7+CAT, proporcionou ainda outro benefício: a qualidade fisiológica do ambiente para a fermentação, considerando-se os teores de ácidos presentes. Verificou-se que a produção de ácidos foi significativamente reduzida sem prejudicar o rendimento fermentativo, além de possibilitar viabilidade de 89% das células ao final da fermentação (Figura 11B), semelhantemente ao observado para os tratamentos com e sem enzima amilolítica.

Verifica-se na Figura 9, que a combinação (CAT+J07) resultou na produção de menor concentração de glicerol em relação aos demais tratamentos, enquanto que as leveduras amilolíticas J32, SD e combinadas (J32+SD) produziram as maiores concentrações de glicerol. A Figura 10.1 apresentou correlação negativa entre teores de glicerol e rendimento fermentativo. Este comportamento apresentado pelas linhagens amilolíticas deve ser resultante do efeito protetor conferido pelo glicerol às células quando submetidas a condições estressantes, como meios com elevadas concentrações de glicose e/ou etanol.



8.1

ACIDEZ — RENDIMENTO FERMENTATIVO



8.2

ACIDEZ — AMIDO

Figura 8. Representação das médias observadas para Acidez Sulfúrica x Rendimento Fermentativo (6.1) e Amido Consumido e Acidez Sulfúrica (6.2).

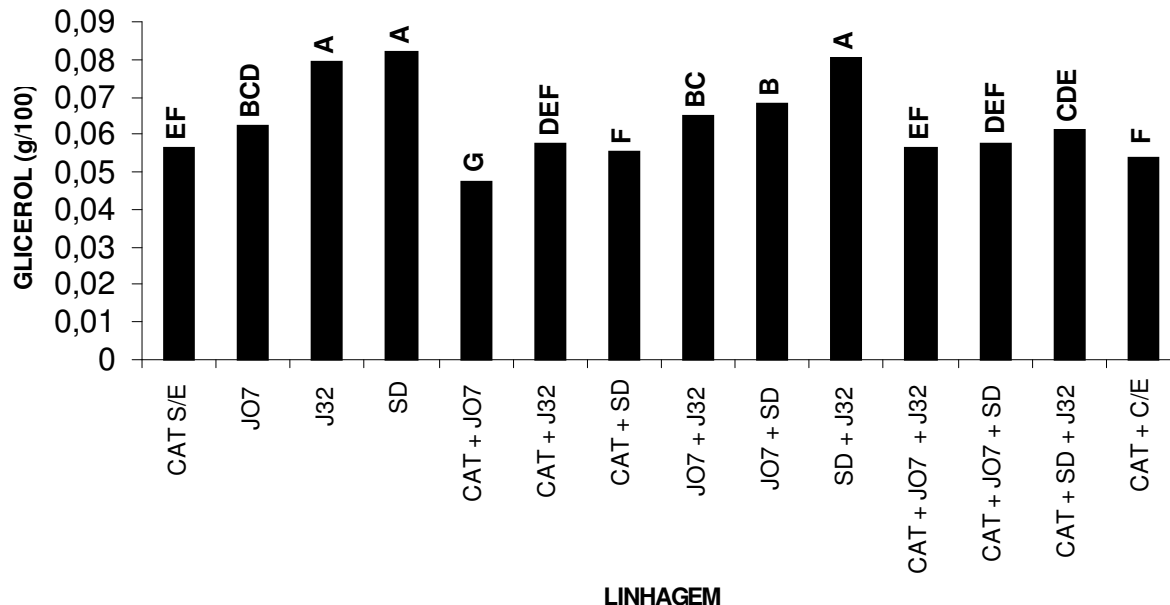


Figura 9. Representação das médias observadas para Glicerol (g/100) para os tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

O crescimento de células está relacionado com a formação de glicerol que é sintetizado na glicólise dependendo da quantidade de NADH_2 do meio. É possível constatar as variações do balanço de redox dos componentes celulares, sendo que quanto maior é a concentração de NADH_2 mais elevada é a formação do glicerol. Além disso, a formação deste triálcool está associada à síntese do ácido succínico. A maior quantidade de ácidos induz a síntese de álcoois superiores (VALENTINA 1987), depreciando a qualidade do álcool.

A Figura 10.2 mostra que a quantidade de glicerol não está relacionada com a quantidade de amido consumido, porém ao aumento de glicose no meio. Verificou-se que *S. diastaticus* hidrolisou amido liberando glicose, o que induziu a formação de maiores teores de glicerol. D'AMORE & STEWART. (1987) observaram o aumento da quantidade de glicose de 10% para 20% que contribuiu para a maior síntese de glicerol, de 0,34% para 1,01%. Por outro lado, a associação CAT+J07 permitiu a utilização de

glicose do amido sem o aumento da concentração de glicerol observada nos demais tratamentos com leveduras e enzima amilolíticas.

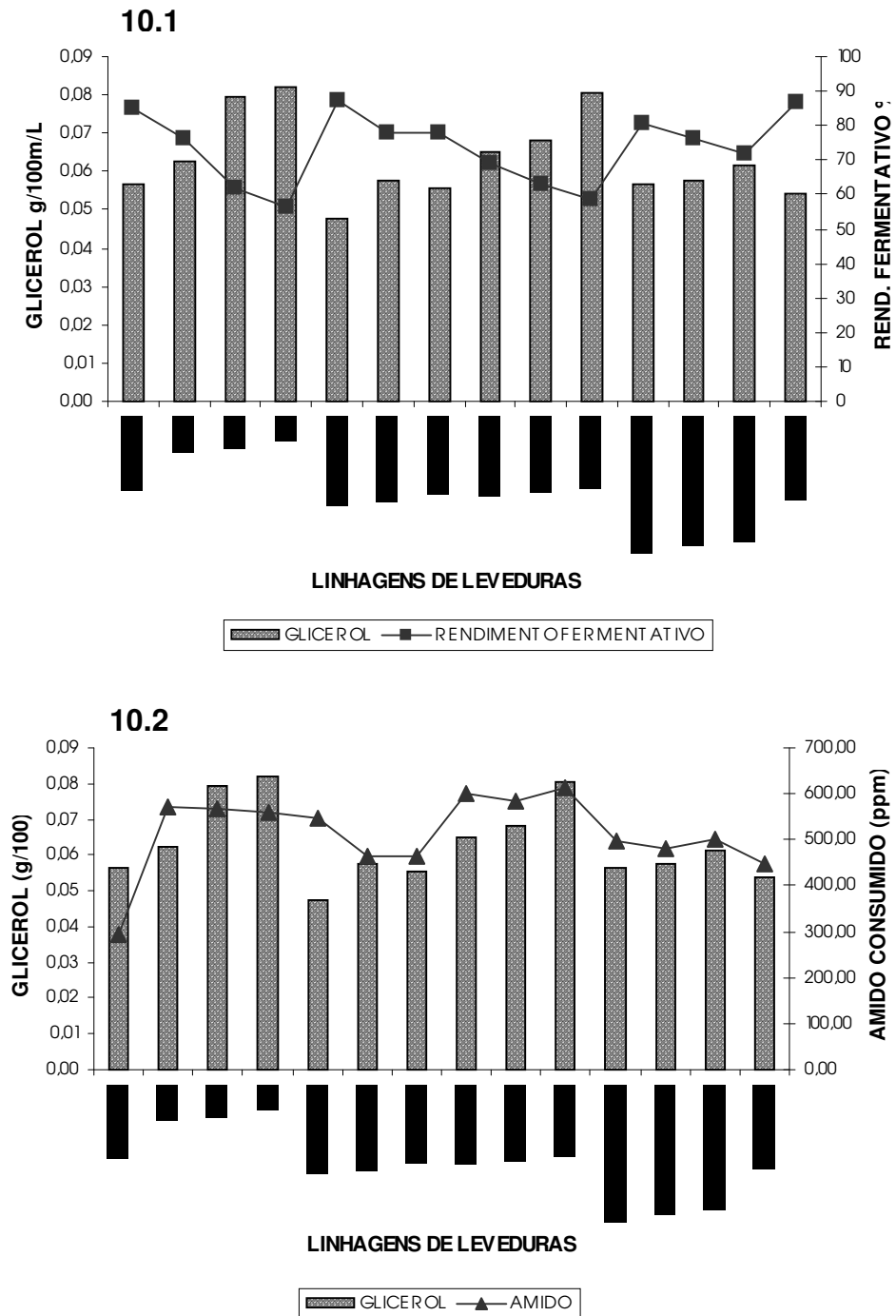


Figura 10. Representação das médias observadas para Glicerol x Amido Consumido.

Na Figura 11A verifica-se que a viabilidade inicial das células de leveduras era semelhante para todos os tratamentos. Não obstante, verificou-se queda natural da viabilidade (Figura 11B) para a levedura fermentadora (CAT) isoladamente ou em associação (CAT+J07, CAT+J07+SD e CAT+C/E). O rendimento fermentativo (Figura 12.1) foi elevado comparado aos demais tratamentos. De acordo com CHERUBIN (2003) quanto maior é a quantidade de álcool produzido menor pode ser a viabilidade final das leveduras. O álcool, embora sintetizado na fermentação pela levedura, exerce forte efeito tóxico sobre as células.

A manutenção da viabilidade é uma característica desejada na busca de linhagens adaptadas às condições industriais de produção de etanol. A viabilidade final, comumente encontrada nas indústrias brasileiras, é da ordem de 84 a 85% (AMORIM & OLIVEIRA, 1982). Sendo assim, a viabilidade do tratamento CAT+J07 neste estudo se manteve adequada e semelhante ao CAT+C/E, porém menor que a SD, J32 e outros tratamentos. A Figura 12.2 mostra que a taxa de consumo de amido não está relacionado com a viabilidade das leveduras.

O rendimento fermentativo observado no tratamento CAT+J07 foi semelhante ao apresentado com a enzima Termamy[®] e superior aos demais (Figura 13). O elevado rendimento fermentativo indicou o melhor aproveitamento da glicose proveniente do amido, semelhantemente ao observado por LALUCE & MATTON, (1984), que constataram que a metabolização do amido para etanol pode ser realizada efetivamente por cocultura de *S. diastaticus* e *S. cerevisiae* com eficiência na fermentação.

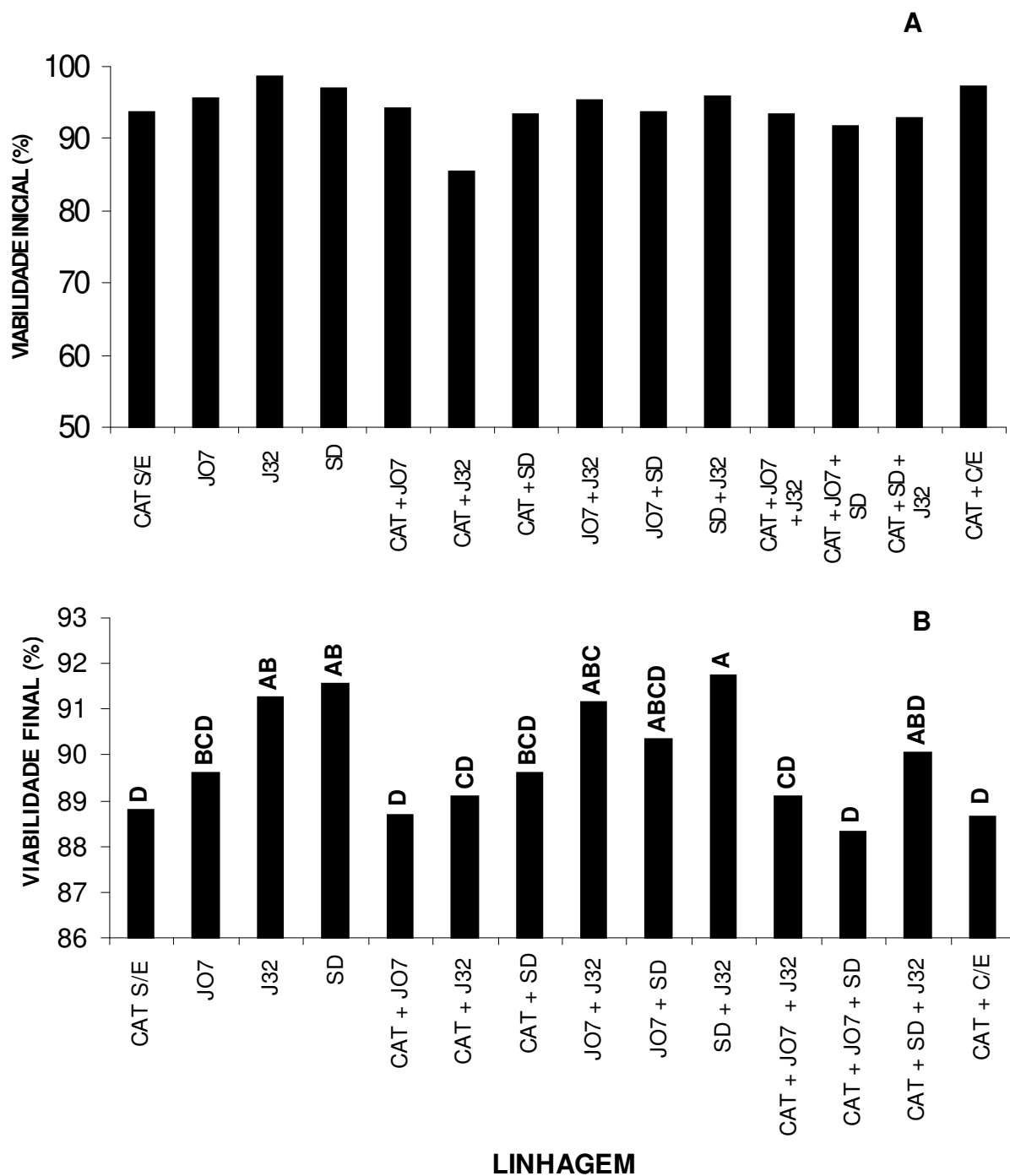


Figura 11. Representação das médias observadas para Viabilidade Inicial (A) e Final (B) para os tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

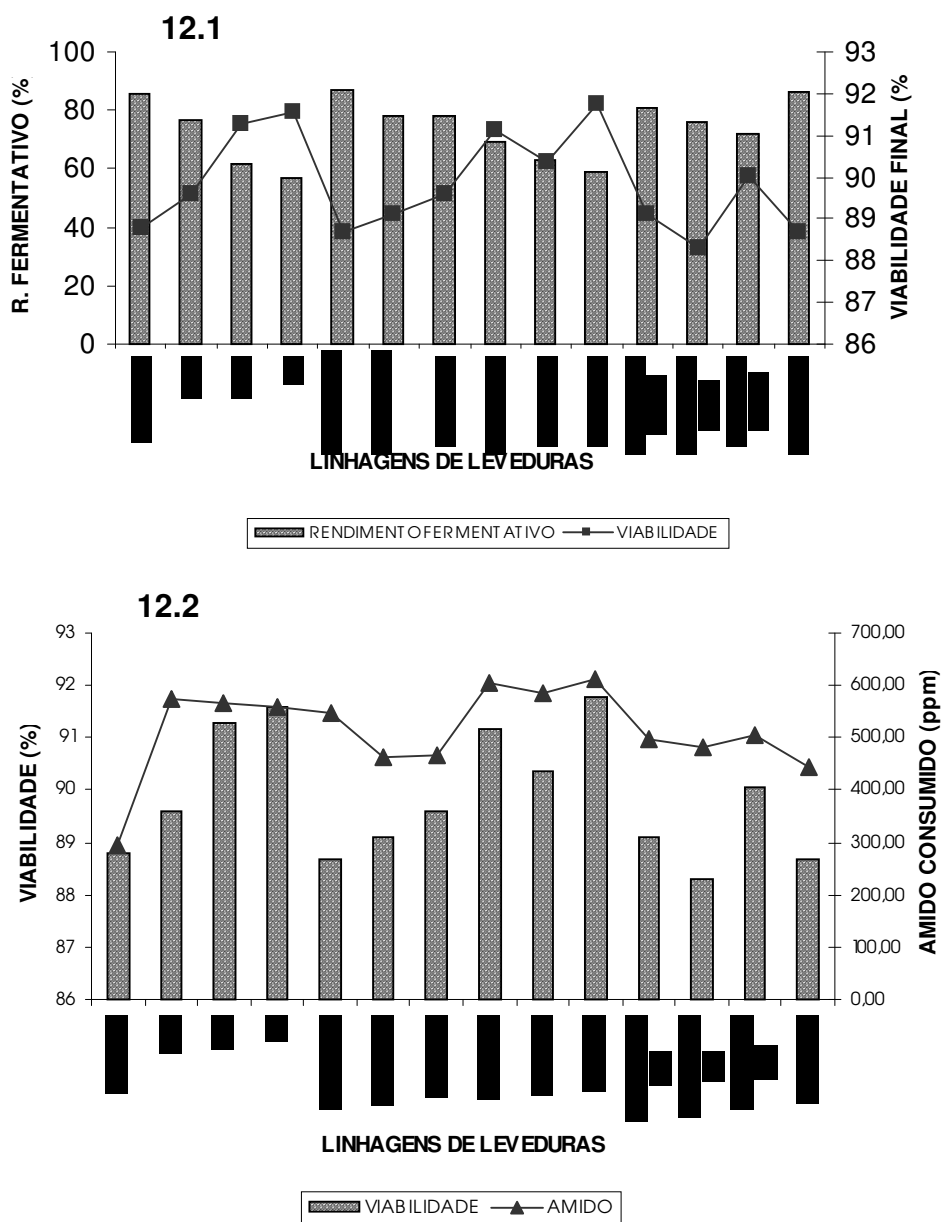


Figura 12. Representação das médias observadas para Rendimento Fermentativo x Viabilidade (12.1) e Viabilidade x Amido Consumido (12.2).

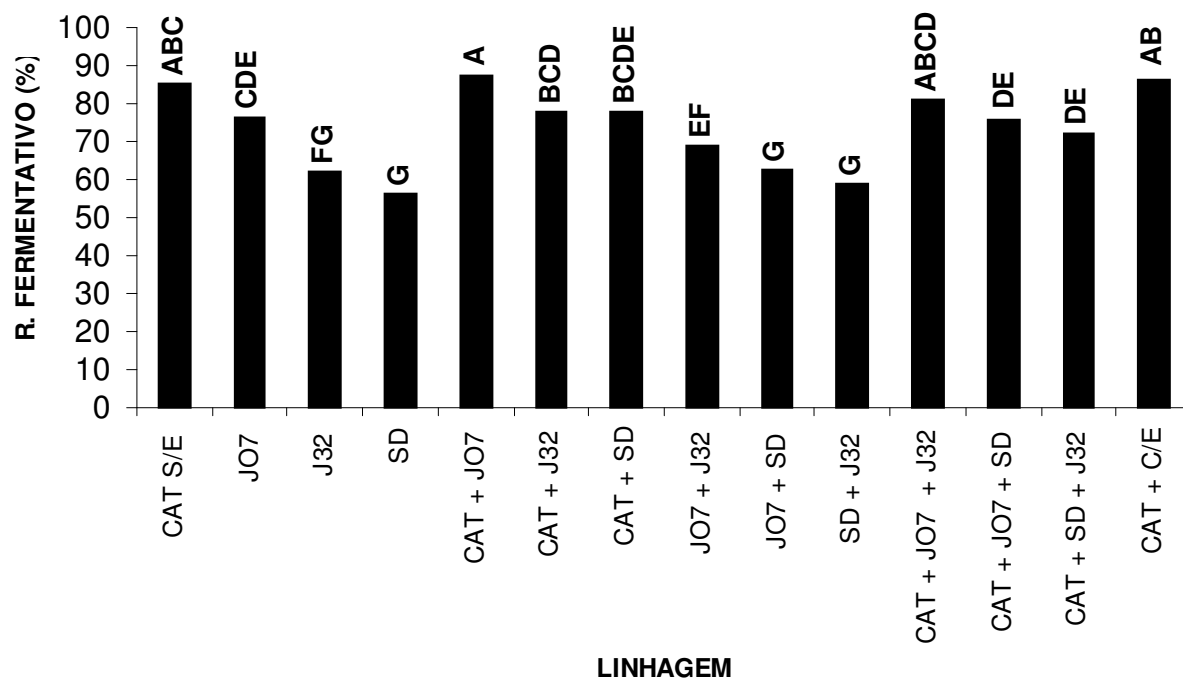


Figura 13. Representação das médias observadas para Rendimento Fermentativo (%) nos tratamentos efetuados. Mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (5%).

5. CONCLUSÕES

As leveduras J07 e J32 confirmaram as habilidades de sintetizar enzimas amilolíticas, não se destacando na produção de etanol.

As leveduras CAT-01+J07 apresentaram resultados semelhantes aos da monocultura de CAT-01, com a aplicação da enzima Termamyl® 120mL.

A levedura CAT-01 em combinação com outras linhagens de leveduras amilolíticas, poderão ser empregadas pelas unidades produtoras álcool, visando incrementar a produção.

6. REFERÊNCIAS

- ABOUZIED, M. M.; REDDY, C. A. Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 52, n. 5, p.1055-1059, 1986.
- ABUD, A. K. S. **Estudo do comportamento cinético e da estabilidade de sacarificação e fermentação alcoólica de Farinha de Mandioca**. 1991. 190 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1991.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, D. M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB: açúcar álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 42-46, 1984.
- ALVES, D. M. G **Respostas fisiológicas de duas linhagens de saccharomyces cerevisiae frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. 2000. 118 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”. Rio Claro, 2000.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. **Infecção na fermentação: como evitá-la**. **Açúcar & Álcool**, São Paulo, v. 2,n. 5, p.12-18, 1982.
- ASSÊNCIO, D. C. **Manual de ciência molecular**, 1. ed. São Paulo : USP, 2002. 4 p.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4ª. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.
- BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. The antibacterial action of succinct acid produced by yeast during fermentation. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 28, supl. 1, p. 77-82, 1997.
- BIROL, G.; ONSAN, Z. I.; KIRDAR, B.; OLIVER, S. Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grow on starch. **Enzymes and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 5, p. 672-677, 1998.
- BOVI, R.; SERRA G. E. **Folha verdes, folhas secas, fibra do colmo e a clarificação do caldo de cana-de-açúcar**, USP/ESALQ, C.P.; Piracicaba, v.58 n.3, p457-463, Scientia Agricola, 2001.

- BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Influence of culture conditions on the cell yield and amylases biosyntheses in continuous by *Schwanniomyces castelli*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 148, n. 1, p.162-166, 1987.
- CARIOCA, J. O. B; ARORA, H. L. **Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1984. p. 49-331.
- CHERUBIN, R. A. efeito da viabilidade da levedura da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica: 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2003.
- COPERSUCAR. Enzimas alfa amilase. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA INDUSTRIAL, 2000, Piracicaba. **Resumos**, 1 CD – ROM.
- D'AMORE, T. STEWART, G. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme*, v. 9 n. 6 p. 322-330, 1987.
- DE MOT. R. et al. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amilolytic yeasts. **Microbiology and Biotechnology**, Frankfurt, v. 22, n. 1 p.222-226, 1985.
- DEL RIO, G.; MORETT, E. X. Did cyclodextrin glycosyltransferase evolved from alpha-amylase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 416, n. 2, p. 224, 1997.
- FRELOT, D.; MOULIN, G.; GALZY, P. Strain selection for the purpose of alcohol production from starch substrates. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 11, n. 7, p, 704 – 708, 1984.
- GODOY, A. Soluções para redução do amido no açúcar. In: **25ª Reunião Anual Encontros Fermentec**, Águas de São Pedro. Fermentec, p. 07-08, 2004.
- GUEDES, L. S.; FACCIOTTI, M. C. R.; ABOUTBOUL, H.; SCHNIDELL, W.; FARIA, J. B.; SCHENBERG, A. C. G. Síntese de glicoamilase por levedura geneticamente modificada visando a produção de etanol a partir de material amiláceo. **Ciência e Cultura**, São Paulo. v.2, p. 1183-1188, 1994.
- HAMMOND, J. Z.; BURTON, K. S. Leaf starch metabolism during the growth of pepper capsicum annum's plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 71, n.1, p. 61-65, 1983.
- HEWITT, J. D.; CASEY, L. L.; ZOBEL, R. W. Effect of day length and night temperature on starch accumulation and degradation in soybean. **Annals of Botany**, London, v.56, n. 5, p 513-522, 1985.

LALUCE, C.; MATTON, J. R. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrin's to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Colorado, v. 48, n. 1, p.17-25,1984.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, v.11, p 641, 1981.

LEHNINGER, A. G.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica 3ª ed. São Paulo SAVIER, 2002.

LIMA, U. A. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgar Blucher, 1975. cap. 3, p. 48 – 49.

MACCARI JR., A et al. Seleção de levedura amilolítica e alcoogênicas para produção de etanol por fermentação associativa, a partir de refugo de batata. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 11., 1996, São Carlos. **Anais...** v. 2, p 514-519.

MAGRO, J. A. Nova maneira de colher manualmente a cana queimada visando a qualidade, In: 25ª **Reunião Anual Encontros Fermentec**, Águas de São Pedro. Fermentec . p. 08, 2005.

Mc CANN, A. K.; BARNETT, J. A. The utilization of starch by yeast. *Yeasts*, Chichester, v. 2, n. 2, p. 109-115, 1986.

MODENA, D.; VANONI, M.; ENGLARD, S.; MARMUR, J. Biochemical and immunological characterization of the STA 2-encoded extracellular glucoamylase from *Saccharomyces diastaticus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 248, n. 1, p. 138-150, 1986.

NIGAM, P. J.; SINGH, D. **Enzyme and microbial systems involved in starch processing**. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, n. 6, p. 770-778, 1995.

NUNBERG, J. H.; MEADE, J. H.; COLE, G.; LAWYER, F. C.; Mc CABE, P.; SCHWEICKART, V.; TAL, R.; WITTMAN, V. P.; FLATGARD, J.E.; INNIS, M. A. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. **Molecular and Cellular Biology**, Tempe, v. 4, p.2306-2315, 1984.

RAVANELI, G. C., **Efeito da cigarrinha-das-raízes com tratamento químico sobre a qualidade da matéria-prima e fabricação de álcool**. 2005.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias. Jaboticabal, 71f.

ROITMAM; TRAVASSOS, L.; AZEVEDO, J. L **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Editora Manole, 1988. v. 1-2.

ROSSETO, R. Cana-de-açúcar: dos resíduos poluentes à gestão ambientalmente correta de fontes alternativas de nutrientes. In: **26ª Reunião Anual Encontros Fermentec**, Águas de São Pedro. Fermentec. p. 04-05, 2005.

SILLS, A. M.; SAUDER, M. E.; STEWART, G. G. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castelli*. **Journal of the institute of Brewing**, London, v. 90, n. 6, p. 311-314, 1984.

SILVA, L. F.; BERNARDINO, C. D.; RÉ, F. E.; FURTADO, C. H. F.; AMORIM, H. V. **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool**. 3. ed. Piracicaba: Fermentec, 2003. 350 p.

SOLOMON, B. Starch hydrolysis by immobilized enzymes industrial application. 2. ed. In: GHOSE, T. K.; FIECHER, A.; BLAKEBROUGH, N. **Advances in biochemical engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1978. v.10, p. 132.

SPENCER-MARTIN., I.; VAN UDEN, N. Inactivation of archive glucose transport in *Candida wickerhamii* is triggered by exocellular glucose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 277-279, 1985.

STUPIELLO, J. P. Pontas de cana: problema industrial? **STAB** : açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 18, n. 4, p. 12, 2000.

TÉO, D. **Produção e caracterização de amilases de leveduras isoladas da fermentação etanólica**. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias. Jaboticabal, 70f.

TO-O, K.; KAMASAKA, H.; KUSAKA, K.; KURIKI, T.; KOMETANI, T.; OKADA, S. A novel acid phosphatase from *Aspergillus niger* Ku-8 that specifically hydrolyzes C-6 phosphate groups of phosphoryl oligosaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.61, n. 9, p.1512-1517, 1997.

TUBB, R. S. Amylolytic yeast for commercial applications. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 4, n. 1, p.98-104, 1986.

UPMEYER, D. J.; KOLLER, H. R. Diurnal trends in net photosynthetic rate and carbohydrate levels of soybean leaves. **Plant Physiology**, Maryland, v.51, p. 871-874, 1973.

VALENTINA, F. M. **Efeito da remoção de celuloses sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras**. 1987. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

WILSON, J.; KHACHATOURIANS, G. G.; INGLEDEW, W. M. **Schwanniomyces: SCP and Ethanol from starch**. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 4, n. 5, p. 333-338, 1982.