

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/09/2018.

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

Efeitos da adição de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de culturas estoques ao creme de levedura industrial durante fermentações sucessivas de melaço

BRUNA ZAVATI ZAVITOSKI

Dissertação de mestrado
2016



Instituto de Química

BRUNA ZAVATI ZAVITOSKI

Efeitos da adição de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de culturas estoques
ao creme de levedura industrial durante fermentações sucessivas de melaço

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cecilia Laluce

ARARAQUARA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Z11e Zavitoski, Bruna Zavati
Efeitos da adição de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de culturas estoque ao creme de levedura industrial durante fermentações sucessivas de melaço / Bruna Zavati Zavitoski. – Araraquara : [s.n.], 2016
55 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cecília Lalue

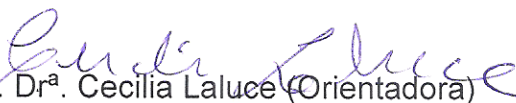
1. Fermentação. 2. Melaço. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Microrganismos. 5. Etanol. I. Título.

BRUNA ZAVATI ZAVITOSKI

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

Araraquara, 22 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Cecília Laluece (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof^a. Dr^a. Kelly Johana Dussan Medina
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof^a. Dr^a. Edwil Aparecida de Lucca Gattas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Bruna Zavati Zavitoski

Nome em citações bibliográficas: ZAVITOSKI, B. Z.

Nacionalidade: Brasileira

Sexo: Feminino

Nascimento: 20/08/1993 – Araraquara – SP

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisto Degni nº 55

Quitandinha – Araraquara

14800-900, SP – Brasil

Endereço eletrônico: brunazzavitoski@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 – atual Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química – UNESP

Título: Efeitos da adição linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de culturas estoques ao creme de levedura industrial durante fermentações sucessivas de melaço

Orientadora: Cecilia Lalluce

Bolsista CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2011 – 2013 Graduação em Biocombustíveis.

Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil.

Título: Isolamento, seleção e cultivo de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel.

Orientador: Jean Carlos Rodrigues da Silva

Formação complementar

2014 – 2014 Refino de Petróleo e Controle Ambiental. (Carga horária: 24h).
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos – SP, Brasil.

- | | |
|--------------------|--|
| 2014 – 2014 | O controle de qualidade dos combustíveis no Brasil. (Carga horária: 4h). Instituto Federal de Ciências e Tecnologia de SP, IFSP, Matão – SP, Brasil. |
| 2012 – 2012 | Métodos de extração de lipídeos de microalga. (Carga horária: 4h). XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, ALAM, Santos – SP, Brasil. |
| 2011 – 2011 | Planejamento Fatorial à Síntese de Biodiesel. (Carga horária: 20h). Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Matão – SP, Brasil. |

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP

2014 – Atual Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda em Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva.

2. Instituto Federal de São Paulo - Campus Matão, IFSP - Matão, Brasil.

2013 – 2013 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica. Regime: Dedicação exclusiva.

2012 – 2012 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica. Regime: Dedicação exclusiva.

Áreas de atuação

1. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia Industrial e de Fermentação.
2. Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica dos Microrganismos.
3. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microalgas.
4. Ciências Exatas e da Terra / Química / Biocombustíveis.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Razoavelmente, Lê Bem.

Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Português Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

LALUCE, C.; LEITE, G. R.; **ZAVITOSKI, B. Z.**; ZAMAI, T. T.; VENTURA, R. Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. In: Ian O'Hara; Sagadevan Mundree. (Org.). **Sugarcane-based Biofuels and Bioproducts**. 1ed. New York: Wiley-Blackwell, 2016, p. 53-86.

Resumo publicado em anais de eventos

ZAVITOSKI, B. Z.; SOUZA, G. G. O.; CESTARI, A.; CHRISTIANI, G.; SOUSA, S. R.; Silva, J.C.R. Análise da utilização de vinhaça no cultivo de *Chlorella* sp. Visando à produção de biodiesel. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.

ZAVITOSKI, B. Z.; CHARTUNE, L. P.; LEITE, G. R.; CESTARI, A.; CHRISTIANI, G.; SOUSA, S. R.; da SILVA, J. C. R. Isolamento e caracterização de microalgas de um lago de água doce como fonte potencial para a produção de biodiesel. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos/SP.

Participação em eventos

2º Workshop em Biocombustíveis do PRH 44: Desafio Tecnológicos da Produção de Biocombustíveis: Como Superá-los?. 2016.

1º Workshop em Biocombustíveis do PRH 44: Tendências Crescentes e Decrescentes do Mercado. 2015.

27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Análise da utilização de vinhaça no cultivo de *Chlorella* sp. Visando a produção de biodiesel. 2013. (Congresso).

4º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. Análise da utilização de vinhaça no cultivo de microalgas visando à produção de biodiesel. 2013. (Congresso).

Jornada de Ciência e Tecnologia - IFSP Campus Matão. Análise da utilização de vinhaça no cultivo de *Chlorella* sp. Visando a produção de biodiesel. 2013. (Outra).

2º Fórum Mundial de Educação Profissional e Tecnológica. 2012. (Congresso).

3º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. Cultivo de microalgas de um lago de água doce como matéria-prima para a produção de biodiesel. 2012. (Congresso).

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM). Isolamento, seleção e cultivo de microalgas de um lago de água doce da cidade de Matão/SP como matéria-prima para a produção de biodiesel. 2012. (Congresso).

II Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. 2011. (Congresso).

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado torcendo pelo meu sucesso, em especial aos meus pais Armando e Cristina e minha irmã Mariana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização desse trabalho, que me apoiaram, me aconselharam e que torceram por mim. Obrigada! Em especial:

A professora Cecilia Laluce pela orientação, pela oportunidade de realizar este trabalho.

A minha família pelo apoio e amor em todos os momentos, por compreenderem minha ausência quando necessário.

As pessoas pela qual passaram pelo nosso laboratório, em especial a Thamires e Chadia, pela amizade construída, desabafos, lanchinhos e por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu companheiro de laboratório e de vida Guilherme Rodrigues Leite, pelo amor, carinho, por aturar meus momentos de desespero, me ajudar a não desistir estando sempre ao meu lado.

As minhas amigas queridas Gabrielle Calera, Cristiane Moura, Larissa Cardozo, Gabriela Santana e Amanda Baptista que me acompanharam e apoiaram por esses anos, desde a graduação até aqui, obrigada pela companhia, pela ajuda, pelos momentos, por estarem sempre comigo. Obrigada pelas comemorações, conversas, almoços, café. Certamente vocês tornaram essa trajetória mais fácil.

A minha amiga Milena Alves, que pediu um agradecimento só para ela, por me ajudar a cumprir com todos meus experimentos me acordando todas as manhãs. Obrigada pela companhia no ônibus, pelos nossos cafés da manhã, almoços, jantares. Obrigada por disser coisa positivas quanto parecida que nada estava dando certo.

A banca examinadora pelas contribuições para finalização desse trabalho.

A usina Santa Cruz, pelo material cedido, pela disponibilidade em me receber sempre que necessário em especial ao técnico de laboratório João Victor Prada.

A seção de pós-graduação, pela atenção e paciência.

A equipe da biblioteca por toda atenção e ajuda.

A CAPES pela bolsa concedida.

“É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê.”
Los Hermanos

RESUMO

A levedura mais utilizada nos processos fermentativos é a *Saccharomyces cerevisiae*, por apresentar uma grande eficiência de conversão dos açúcares em etanol, permitindo assim a produção de etanol combustível em larga escala, porém essas leveduras não predominam durante toda a safra, sendo substituídas por leveduras não – *Saccharomyces*. Durante o processo fermentativo fatores como estresse alcoólico, térmico, ácido, nutricional e osmótico causam prejuízo ao processo. Na busca por um microrganismo capaz de fermentar em condições de estresse a levedura híbrida, *S. cerevisiae* IQAr/45-1 (PI 0806141-6) construída no Laboratório de Unidades das Leveduras Industriais do Instituto de Química – UNESP, apresenta características de rápida fermentação e resistência ao estresse térmico. Sendo assim o objetivo principal do presente trabalho é testar a capacidade de fermentar da levedura IQAr/45-1 quando inoculada junto ao creme de levedura industrial, que contém leveduras *Saccharomyces* e não – *Saccharomyces* avaliando sua capacidade de melhorar a fermentação. Fermentações de 5 ciclos sucessivos com reuso de células foram conduzidas utilizando um fluxo de alimentação 0,39 mL/min, por 3 horas com melaço 20 % (ART) e foram realizadas a 35 °C e 40 °C, durante 10 horas, utilizando como inóculo creme de levedura industrial com adição da levedura IQAr/45-1 na proporção de 3:1. Durante a fermentação foi analisado a concentração celular, viabilidade e ART. Após as análises observou-se quando adicionado a levedura IQAr/45-1 ao creme de levedura a 40 °C houve um aumento no consumo de açúcar.

Palavras-chave: Produção de etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, levedura híbrida, fermentação mista.

ABSTRACT

The most frequently used yeast in fermentation processes is the *Saccharomyces cerevisiae*, to present with high conversion efficiency of ethanol into sugar, thereby allowing the production of fuel ethanol in large scale. These yeasts cells don't remain throughout the harvesting season, being replaced by non – *Saccharomyces* yeasts. During fermentation, factors such as stress alcohol, heat, acid, nutritional and osmotic cause damage to the process. In search of a microorganism capable of fermenting sugar solutions under stress conditions, the hybrid yeast *Saccharomyce cerevisiae* IQAr-45/1(Patent deposit n° BR200806141-A2) was built the in the laboratory of industrial yeasts in the Chemistry Institute of institute of Chemistry at UNESP. The new yeast presents rapid fermentation characteristics and resistance to thermal stress. Thus, the main objective of this study is to test the ability of fermenting the yeast IQAr/45-1 to improve fermentation, when inoculated with industrial yeast cream, containing *Saccharomyces* yeast and non – *Saccharomyces* yeasts. Five successive cycles of fermentation was conducted using a feed flow 0.39 ml/min of 20% (TRS) molasses by 3 hours during 10 hours at temperatures ranging from 35 °C to 40 °C. Inoculum was constituted by industrial yeast cream containing added yeast IQAr/45-1 at proportion 3:1. Cell concentration, viability and TRS were determined. After analysis it was noted when added to yeast IQAr/45-1 to the yeast cream at 40 ° C, there is an increased sugar consumption.

Keywords: Ethanol production, *Saccharomyces cerevisiae*, hybrid yeast, Co-fermentations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção mundial de etanol combustível por país.....	19
Figura 2 - Processo contínuo de fermentação.....	22
Figura 3 - Processo de batelada alimentada.....	23
Figura 4 - Etapas realizadas para estocagem das amostras de creme de levedura industrial.....	30
Figura 5 - Reator utilizado nos ensaios de fermentação em batelada alimentada. Erlenmeyer de 250 mL vedado com rolha de borracha contendo três furos, sendo essas para alimentação, amostrador e saída de CO ₂	35
Figura 6 - Diluição seriada realizada para plaqueamento	37
Figura 7 - Levedura semelhante à <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A) e levedura selvagem (B) encontradas no creme de levedura industrial.....	39
Figura 8 - Plaqueamento do creme de levedura industrial em meios diferenciais, para caracterização da amostra. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C	40
Figura 9 - Análise do aumento da viabilidade em relação ao tempo do creme de levedura industrial quando revitalizado utilizando melaço 6 % a 35 °C.....	42
Figura 10 - Plaqueamento do creme de levedura após da estocagem (A) e revitalização (B).....	43
Figura 11 - Consumo dos açúcares redutores totais em fermentação do creme de levedura industrial em diferentes condições: (■) 35 °C e 20 % ART; (●) 40 °C e 20 % ART	44
Figura 12 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 35 °C, utilizando ART de 20 % no melaço, alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial em uma concentração de 1 x 10 ⁸ cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◄) ciclo 5.	45
Figura 13 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 40 °C, utilizando ART de 20 % no melaço, alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial em uma concentração de 1 x 10 ⁸ cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◄) ciclo 5.	46
Figura 14 - Fermentações utilizando diferentes proporções da levedura creme de levedura: IQAr/45-1. (■) 2:1; (●) 3:1.	47
Figura 15 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 35 °C, utilizando ART de 20 % no melaço e alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial e levedura IQAr/45-1 (3:1) em uma concentração de 1 x 10 ⁸ cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo: (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◄) ciclo 5.	48
Figura 16 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 40 °C, utilizando	

ART de 20 % no melaço e alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial e levedura IQAr/45-1 (3:1) em uma concentração de 1×10^8 cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo: (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◄) ciclo 5.49

Figura 17 - Avaliação das medidas dos parâmetros ao fim de cada ciclo: concentração celular, viabilidade e ART das fermentações de 5 ciclos sucessivos à 35 °C e 40 °C utilizando ART de 20 % no melaço, alimentação com fluxo de 0,39 mL/min durante 3 h, sendo: (■) inóculo creme de levedura, temperatura 35 °C; (●) creme de levedura + IQAr/45-1 (3:1), temperatura 35 °C; (▲) creme de levedura + IQAr/45-1 (3:1), temperatura 40 °C; (▼) creme de levedura, temperatura 40 °C.50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
g	grama
mL	mililitro
mg/L	miligrama por litro
g/L	grama por litro
m/v	massa por volume
nm	nanômetro
µm	micrometro
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
<i>g</i>	gravidade
ATP	adenosina tri fosfato
ART	açúcar redutor total
YPD	extrato de levedura, peptona e glicose
WLN	<i>Wallerstein Laboratory Nutrient</i>
UFC	unidade formadora de colônia
min	minuto
KCl	cloreto de potássio
CaCl ₂ ·6H ₂ O	cloreto de cálcio hexahidratado
CaCl ₂	cloreto de cálcio
NaCl	cloreto de sódio
FeCl ₃	cloreto férrico
MgSO ₄	sulfato de magnésio

MnSO_4	sulfato de manganês
NaOH	hidróxido de sódio
NaHCO_3	bicarbonato de sódio
KH_2PO_4	fosfato de potássio monobásico
$\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	tartarato de potássio tetrahidratado
HCl	ácido clorídrico
H_2SO_4	ácido sulfúrico
CAT-1	levedura isolada da usina Catanduva
SA-1	levedura isolada da usina Santa Adélia
BG-1	levedura isolada da usina Barra Grande
PE-2	levedura isolada da usina da Pedra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Etanol - cenário mundial	19
2.2 Matéria-prima.....	20
2.3 Produção de etanol	21
2.3.2 Processo contínuo	22
2.3.3 Processo de batelada alimentada.....	22
2.3.4 Condições gerais de fermentação	23
2.4 Leveduras	24
2.5 Fermentação alcoólica	25
2.6 Microrganismos presentes no processo fermentativo	25
2.7 Fermentação mista	26
2.8 Atual potencial do etanol.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Leveduras	29
4.2 Creme de levedura.....	29
4.3 Melaço de cana-de-açúcar.....	30
4.3.1 Clarificação do melaço de cana-de-açúcar	30
4.4 Meio diferenciais	31
4.4.1 Meio YPD.....	31
4.4.2 Meio Nagai.....	31
4.4.3 Meio WLN	32
4.4.4 Meio N1	32
4.5 Ensaio de Fermentação	33
4.5.1 Revitalização do creme de levedura industrial.....	33
4.5.2. Propagação IQAr/45-1	34
4.5.3 Fermentação em batelada alimentada.....	34

4.5.4 Ciclos sucessivos de fermentação com reuso de células	35
4.5.5 Co-fermentação em batelada alimentada do creme de levedura industrial associado a levedura IQAr/45-1	35
4.6 Ensaios analíticos e microbiológicos.....	36
4.6.1 pH	36
4.6.2 Contagem de células totais.....	36
4.6.3 Viabilidade celular	36
4.6.4 Plaqueamento em meios diferenciais	37
4.6.5 Açúcares redutores totais	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1 Creme de levedura.....	39
5.2 Revitalização do creme de levedura	41
5.3 Caracterização do creme de levedura industrial após degelo e revitalização ..	42
5.4 Fermentação do creme de levedura industrial	43
5.5 Ciclos sucessivos de fermentação com reuso das células	44
5.6 Co-fermentação em batelada alimentada com creme de levedura industrial associado a levedura de IQAr/45-1.....	46
5.7 Comparação entre fermentações utilizando creme de levedura como inóculo e co-fermentação (creme de levedura industrial com adição da levedura IQAr/45-1)	49
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da demanda por combustíveis, preocupações com o aquecimento global e esgotamento dos combustíveis fósseis levou a busca por fontes renováveis de energia que sejam eficientes e sustentáveis. Nesse contexto, o etanol vem se consolidando como substituto economicamente viável aos combustíveis fósseis. O Brasil foi o pioneiro na implantação desse biocombustível e atualmente é o segundo maior produtor mundial (BAYENS, 2015).

Em escala industrial a produção de etanol se dá via fermentação. Leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* iniciam o processo de fermentação onde convertem os açúcares presentes no mosto em etanol. No Brasil, a principal matéria-prima utilizada é a cana-de-açúcar (BASSO, 2008).

O processo fermentativo é um processo estressante para as leveduras. Os principais fatores são, altas temperaturas, alta concentração de açúcares, presença de ácidos orgânicos (ácido láctico), altas concentrações de etanol, estes fatores causam efeito inibitório sobre as leveduras, comprometendo assim a produção de etanol (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

Não há relatos na literatura de um microrganismo que apresente resistência a todos esses principais fatores, por isso é de suma importância a busca por novos microrganismos que possam melhorar o desempenho do processo fermentativo, consequentemente o rendimento nas usinas.

6 CONCLUSÕES

O creme de levedura industrial pode ser estocado em ultra freezer (-80 °C), mas requer revitalização após o degelo.

A revitalização consistiu em incubar a amostra de creme de levedura industrial em meio contendo melaço 6 % por 7 horas. Após a revitalização o creme de levedura apresenta 80 % de leveduras *Saccharomyces* e 20 % de leveduras selvagens, mesmas características que quando foi estocado.

O creme de levedura industrial apresentou maior consumo de açúcar quando fermentado a 35 °C em ciclo único e 5 ciclos sucessivos, quando comparado com a fermentação realizada a 40 °C.

Creme de levedura não apresentou perda de viabilidade, mantendo-se acima de 90 % após 5 ciclos de fermentação com 10 horas de duração a 35 e 40 °C

Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho indicam que a levedura híbrida IQAr/45-1, apresenta potencial para aumentar o consumo de açúcar em uma fermentação mista em altas temperaturas (40 °C), com um efeito sinérgico.

A dosagem do teor de etanol presentes nas amostras das fermentações poderá elucidar melhor as conclusões.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. de et al. **Processo de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**. Piracicaba: Fermentec, 1989. 145 p.
- AMORIM, H. V. de 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. Chap. 5, p. 39-46.
- AMORIM, H. V. de et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? In: BERNARDES, M. A. dos S. (Ed.). **Biofuel production: recent development and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Chap. 4, p. 67-84.
- ARGUESSO, J. L. et al. Perspective: indigenous sugarcane yeast strains as ideal biological platforms for the delivery of next generation biorefining technologies. **International Sugar Journal**, v.112, p. 86-89, 2010.
- BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60-88, 2015.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BANAT, I. M. et al. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part I - yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 809-821, 1998.
- 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. Chap. 5, p. 85-100.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF, v. 3, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_18_12_03_30_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: 26 set. 2016.
- DELGADO, A. A. (Coord.). **Tecnologia do açúcar e das fermentações industriais**. Piracicaba: Esalq, 1975. (Tecnologia dos produtos agropecuários, v. 1).
- DEPARTAMENTO DE TRANSITO NACIONAL. **Frota por UF e tipo de veículo**. Brasília, DF, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.denatran.gov.br/index.php/estatistica/257-frota-2015>>. Acesso em: 17 ago. 2016.
- DIAS, M. O. S. et al. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1206-1216, 2009.

GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. Brazilian alcohol program: an overview. **Energy for Sustainable Development**, v. 1, n. 1, p. 17-22, 1994.

GUADAGNIN, C. Vendido como promessa, etanol de 2ª geração trava em falta de apoio e pesquisa. **Gazeta do Povo**, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.gazetadopovo.com.br/economia/energia-e-sustentabilidade/vendido-como-promessa-etanol-de-2-geracao-trava-em-falta-de-apoio-e-pesquisa-02dj0qh0sy5x6rih5hf147bfr>>. Acesso em: 26 set. 2016.

INGLEDEW, W. M. Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: How does the technology affect yeast? In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 11, p. 135-143.

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, chap. 3, p. 21-44.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol-production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1991.

LALUCE, C. et al. Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. In: O'HARA, I. M.; MUNDREE, S. G. (Ed). **Sugarcane-based biofuels and bioproducts**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016. Chap. 3, p. 53-86.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

MASIERO, M. O. C. **Uso de técnicas simples e da análise genética para determinação de dominância e persistência de leveduras em processos fermentativos**. 2015. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, M. R. **Estudo sobre interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas**. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

NAGAI, S. Diagnostic color differentiation plates hereditary respiration deficiency in yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 86, p. 299-302, 1963.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 979-995, 2008.

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION. Goddard Institute for Space Studies. **GISS surface temperature analysis (GISTEMP)**. New York. Disponível em: <<http://data.giss.nasa.gov/gistemp/>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

NOVACANA. **Distribuição das usinas de etanol no Brasil**. Curitiba, c2016. Disponível em: <<https://www.novacana.com/usina/distribuicao-usinas-etanol-brasil/>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fedbatch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVA NETO, P. et al. Chemical inhibition of the contaminant *Lactobacillus fermentum* from distilleries producing fuel bioethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 441-447, 2014.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524 p.

PIPPO, W.A. et al. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 2: Socio-economic aspects and techno-economic analysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, p. 257-266, 2011.

QUEROL, A. et al. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n. 1/2, p. 3-10, 2003.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Exports and trade**. Washington, DC. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/issues/exports-and-trade/>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

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

SHERMAN, F; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. **Methods Enzymology**, v. 194, p. 21-37, 1991.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.

SOUZA, C. S. et al. Genetic and physiological alterations occurring a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1667-1677, 2007.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. C. Lauce et al. **Levedura geneticamente construída para a produção de etanol combustível em condições de estresse**. PI n.0806141-6 A2, 04 ago. 2008, 21 set. 2010.

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

ZARPELON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação contínua para produção de álcool. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 10, n. 4, p. 23-28, 1992.