



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PRODUÇÃO DE ETANOL EM MEIO SINTÉTICO
COM RECUPERAÇÃO DE FERMENTO ENTRE
BATELADAS SUCESSIVAS**

Meline Rezende Moraes

ARARAQUARA

2009

MELINE REZENDE MORAIS

**Produção de etanol em meio sintético com
recuperação de fermento entre
bateladas sucessivas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
da Universidade Estadual Paulista, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Cecília Laluce

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

ARARAQUARA

2009

Dados curriculares

Meline Rezende Moraes

1. Dados pessoais

Filiação: Mauro Marques Moraes e Maria das Graças Rezende Moraes

Nascimento: 28 de outubro de 1982 – Juruaia-MG, Brasil

Documento de Identidade: 11.870.649 / SSP-MG

Cadastro de Pessoa Física: 055.564.336-07

Endereço Pessoal: Rua Tiradentes, 608 – Centro

CEP: 37805-000 – Juruaia-MG

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n – 14800-900 – Araraquara-SP

Profissão: Biomédica

Formação acadêmica

2007 – 2009: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Título: Parâmetros de fermentação e estabilidade genética de leveduras em ciclos sucessivos de fermentação. Orientador: Cecília Lalue, instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2002 – 2005: Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica (Biomedicina), Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, São Paulo, Brasil.

2. Atuação profissional

2006 - 2007: Hospital Monsenhor Genésio, HMG, Juruaia/MG, Brasil como responsável técnica pelo laboratório de análises clínica, no período de janeiro de 2006 a fevereiro de 2007.

Atividades de pesquisa

3.1. Trabalhos apresentados em congressos

JUNIOR, M. M.; FRIOL, P. G.; MORAIS, M. R. Di SANTO, R. J.; BERNARDI, A. C. A. “Infecção Hospitalar Relacionada ao Uso de Cateter em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)”. IV Jornada de Biomedicina, UNIARA Araraquara (SP), no período de 10 a 12 de Novembro de 2004.

3.2. Trabalhos e Resumos Publicados

Laluce, C.; TOGNOLLI, J.O.; OLIVEIRA, K.F.; SOUZA, C.S.; MORAIS, M.R. Optimization of temperature, sugar concentration and inoculum size to maximize ethanol production without significant decreases in yeast cell viability. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**

JUNIOR, M. M.; FRIOL, P. G.; MORAIS, M. R. Di SANTO, R. J.; BERNARDI, A. C. A. UNIARA- Centro Universitário de Araraquara. “Infecção Hospitalar Relacionada ao Uso de Cateter em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)”. BIOSAÚDE - **Revista do Departamento de Ciências Patológicas – CCB**, Londrina, v. 6, p. 188, nov. 2004. Resumo.

3.3. Participação em eventos

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, SP, 2009.

1ª reunião da “*International Academy of sensory Analysis*”, no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), São Paulo-SP.

VI Congresso Londrinense de Biologia aplicada à Saúde, I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina e Instituto de Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Social, Londrina, 2004.

Aperfeiçoamento de Nível Superior em “Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar” pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas-MG, 2006.

Mini-curso: “Teste de Ames-monitoramento do risco de mutagênese ocupacional e ambiental”, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a VI Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

V Jornada Biomédica, e VI Semana Biomédica de Araraquara, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara-SP, 2005.

Mini-curso: “Automação em Hematologia”, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a VI Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

Palestra “Hemocultura”, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a VI Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Análise Laboratorial Microbiológica”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Diagnóstico Laboratorial de Infecções Virais”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Interferência de Medicamentos no Diagnóstico Clínico”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Hiperlipemias Importância do Diagnóstico Laboratorial”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Projeto SEST SENAT, realizando atividades de orientação para a prevenção das parasitoses, Araraquara-SP, 2005.

Palestra: “Efeitos do Iogurte de Soja de Araraquara sobre Modelos Tumoriais em Buenos Aires”, realizada no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara-SP, 2005.

I Jornada Multidisciplinar- Tema Diabetes, promovida pela UNIARA – UNIVIDA, Araraquara-SP, 2005.

Mini-curso: “Células Tronco: Aspectos Básicos e Métodos de Obtenção”, durante o VI Congresso Londrinense de Biologia aplicada à Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Londrina-PR, 2004.

IV Jornada de Biomedicina, realizado no Centro Universitário de Araraquara-UNIARA, Araraquara-SP, 2004.

Mini-Curso: “Câncer e Marcadores Tumoriais”, Araraquara-SP, 2004.

Mini-Curso: “Eletrocardiograma”, Araraquara-SP, 2004..

Mini-Curso: “Controle de Infecção Hospitalar”, Araraquara-SP, 2004.

IV Semana da Biomedicina e III Jornada de Biomedicina, realizada no Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, Araraquara-SP, 2003.

Mini-curso: “Suporte Básico de Vida no Laboratório Clínico-1º Socorros”, realizada no Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, durante a IV Semana da Biomedicina, Araraquara -SP, 2003.

Projeto “Olho Diabético”, realizado pela Secretaria Municipal de Saúde de Araraquara em parceria com o Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara -SP, 2003.

Curso de “Como Vender Mais e Melhor”, ministrado pelo SEBRAE (MG), Juruiaia-MG, 2003.

*“Há uma ponte meio quebrada, e muito velha, sobre o rio que se avista de minha janela e foi
dali que joguei uma pequena pedra sobre as águas.
Formou-se um círculo seguido de outro maior e muitos outros, sendo que o último atingiu a
margem oposta.
Agora, sei que o meu gesto pode alcançar distâncias muito maiores do que a minha força”.*
(Maria Lúcia Simões)

Ao MESTRE da Vida.
Ao MESTRE do Amor e da Sabedoria.
Aquele cujo falar é muitíssimo Suave, Doce e Agradável para mim.
Ao meu Amado JESUS CRISTO.
OFEREÇO

Aos meus pais, Mauro e Maria das Graças,
pelo exemplo de vida, pelo incentivo nos momentos mais difíceis,
por mostrarem sempre o caminho da verdade,
por tantas vezes que abdicaram de vossos sonhos para realizar os meus,
por todas as alegrias que proporcionaram-me,
pelo amor incondicional e apoio na realização deste trabalho.

E aos meus irmãos Marcel e Mauro, pela amizade, generosidade
e companheirismo em todas as situações.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Há muitas pessoas a quem deveria expressar os meus agradecimentos, mas com poucas palavras vou tentar falar de todos que mais contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A DEUS por ter me dado a vida, a quem confio o meu futuro.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cecília Lalue, por sua amizade e confiança que possibilitou a oportunidade de iniciar este trabalho; pela orientação, apoio e por todos os conhecimentos científicos transmitidos no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, pela confiança e oportunidade da realização deste mestrado, e pela sua colaboração na orientação.

Aos colegas de laboratório, Karen, Crisla, Gedaias, Daniel, Sandro, Jéssica, Maria Olívia e Leonardo, pelo convívio e crescimentos durante esses dois anos de aprendizado, pelos ensinamentos e conversas e até mesmos pelas brincadeiras.

Ao técnico do laboratório Fernando Delfino, pela amizade, paciência, confiança e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnológica Química, e da Seção de Pós-Graduação, pela atenção e paciência.

Em especial aos meus amigos de Araraquara como Messias, Andréia, Tarcia, Suzana, Waleska, Lauene e Daniela pela amizade e cumplicidade. Que Deus lhes guiem sempre, dando-lhes coragem e mostrando a Sua vontade.

Aos meus amigos de Juruaia Mateus, Rogério, Marcelo, Rogéria, Andréia, Marina, Lídia, Nayara, Luciana, Fábila, aos meus primos que também são grandes amigos e todos os outros amigos, que em momento algum saem de meus pensamentos e minhas lembranças. Mesmo estando perto ou longe todos vocês são muito especiais em minha vida!

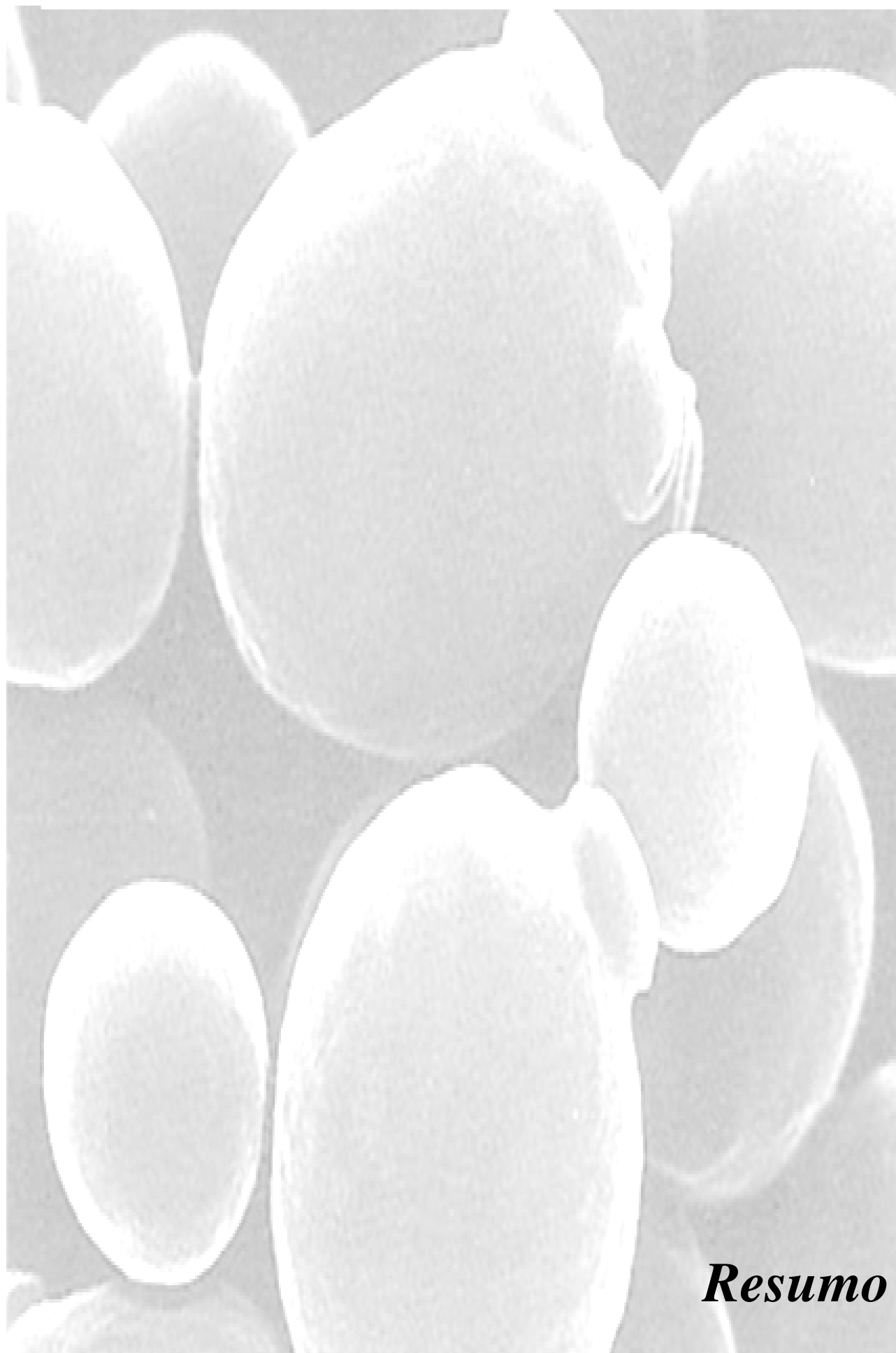
A toda minha família (Morais e Rezende), pois cada um de vocês são muito especiais para mim, em especial aos Rezende, que me dão força para vencer e superar todos os obstáculos da vida.

Aos meus irmãos pelo amor, apoio e incentivo a todos momentos.

Aos meus pais, pelo amor, por terem me educado e me ensinado os valores da vida. Obrigada pela dedicação e paciência! Amo vocês!

A CAPES pela bolsa concedida a mim e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

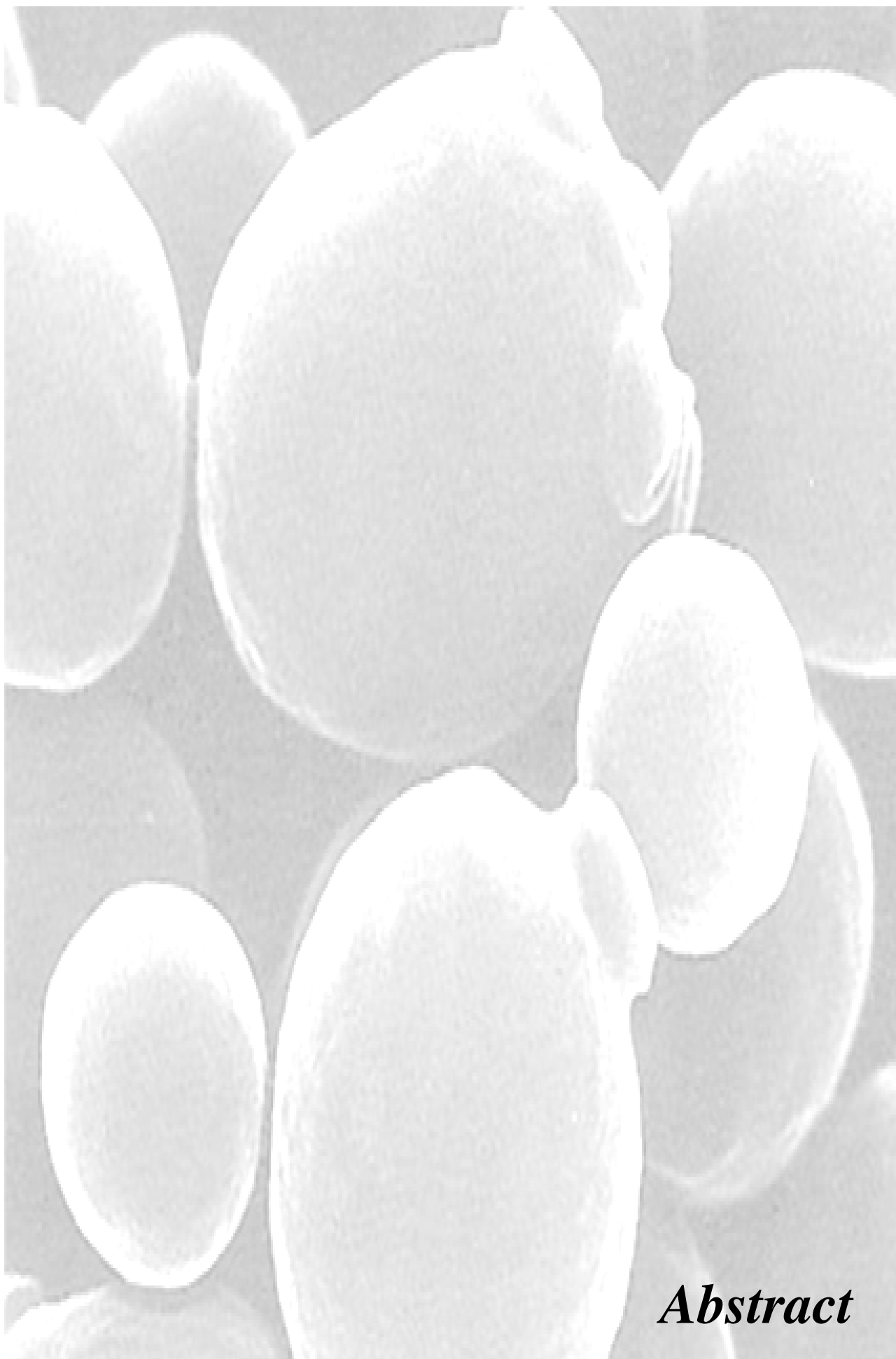
Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de cursar o mestrado.



Resumo

O estabelecimento de condições para a realização de fermentações em meio sintético em escala de laboratório é uma pesquisa relevante que permite estudar alterações metabólicas e genéticas das leveduras durante os ciclos sucessivos de fermentação. A composição da matéria-prima industrial apresenta alterações constantes e os dados industriais são obtidos sem a precisão e reprodutibilidade dos dados obtidos em pesquisas científicas. Em uma sequência longa de bateladas repetidas com o reuso de células, a recuperação das células mortas ou a simples perda celular da viabilidade, causadas por morte celular, ou a simples perda de viabilidade causada pelas condições do processo não podem ser ignoradas. Um excesso de biomassa no final do processo indica que a população de leveduras passou por renovação celular. Fermentações descontínuas alimentadas por pulsos decrescentes de sacarose foram utilizadas no presente trabalho. Como o inóculo usado foi muito alto, o crescimento celular foi menor durante a fermentação. O volume final de trabalho dentro do reator, contendo inicialmente todos os componentes exceto sacarose e leite de levedura, atingiu um aumento de 25% no seu depois de 4 horas de alimentação. Devido aos inóculos altos utilizados, um tratamento para recuperação do leite de levedura foi necessário entre os ciclos de fermentação a fim de minimizar as perdas em biomassa e viabilidade. Dados obtidos mostraram que uma redução no tamanho do inóculo levou a perdas em viabilidade. Depois da adição de cada pulso de sacarose, um reajuste do pH do meio para 4,5 foi necessário. Uma solução de água contendo sacarose e extrato de levedo nos permitiu revitalizar o leite de levedura com ganhos em biomassa e viabilidade durante 15 horas de incubação à 30°C antes do ciclo de fermentação seguinte. Entre os ciclos de fermentação, perdas dramáticas em viabilidade foram observadas quando uma quantia de 200 g.L⁻¹ de sacarose foi adicionada em relação ao volume final do meio dentro do reator, mas somente variações foram observadas quando 156 g.L⁻¹ de sacarose foi adicionada durante fermentações sucessivas usando-se a linhagem de laboratório IQAr/45-1 e a levedura industrial BG1. A linhagem da levedura IQAr/45-1 mostrou resultado semelhantes aos obtidos com a levedura BG1 em fermentações a 34°C. Perdas em viabilidades observadas à 37°C foram minimizadas pela suplementação do meio mínimo com nutrientes, pois o meio mínimo mostrou- deficiência nutricional para fermentações com altas densidades de células.

Palavra Chave: *Saccharomyces cerevisiae*, etanol, temperatura, revitalização, concentração de açúcar e inóculo



Abstract

The establishment of conditions to carry out fermentations in synthetic medium at laboratory scale is a very relevant research that will allow us to study metabolic and genetic alterations during the successive cycles of fermentation. The composition of the raw industrial materials show constant alterations and the industrial data are generally obtained without the precision and reproducibility of the data obtained in scientific research. In a long sequence of repeated batch processes with cell reuse, the recuperation of dead cells or the simple loss of viability caused programmed cell death or simply loss of viability caused by process conditions can not be ignored. Biomass excess at the end of the process indicates that the yeast population went through a cell renewal. Discontinuous fermentations fed by decreasing pulses of sucrose were used in the present work. As inoculum was very high, the growth was low during the fermentation. The volume inside the reactor, containing initially all medium components except sucrose and yeast cream, reached a 25% increase in its working volume after 5 hours feeding. Due to high inoculums used, a treatment for the yeast cream recuperation was required between the fermentation cycles in order to minimize the losses in biomass and viability. Data obtained showed that a decrease in the inoculums size leads to drops in viability. After the addition of each sucrose pulse, a pH readjustment to 4.5 was required. A water solution containing sucrose and yeast extract allowed us to revitalize the yeast cream with gains in biomass and viability during 15 hour incubation at 30°C before the next fermentation cycle. Between the fermentation cycles, dramatic drops in viability were observed when an amount of 200 g.L⁻¹ sucrose was added in relation to the final volume of medium inside the reactor, but only discrete variations were observed when 156 g.L⁻¹ sucrose was added during consecutive fermentations with the laboratory strain IQAr/45-1 and the industrial strain BG1. The yeast strain IQAr/45-1 showed similar results in fermentations at 34°C and 37°C. Drops in viability observed at 37°C might be minimized by raising the nutrients of the minimal medium that showed itself to be nutritional deficient for fermentations at high cell densities.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, temperature, yeast cream revitalization, sugar concentration and inoculum size.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART = açúcar redutores totais (g.L^{-1})

ATP = adenosina trifosfato

DAP = di-amônio fosfato

NAP⁺ = nicotinamida adenosina dinucleotideo

YPD = extrato de levedura, peptona e glicose

RPM = rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do metabolismo da produção do etanol (PRETORIUS, 2000).....	27
Figura 2 – Representação esquemática dos componentes celulares de uma levedura <i>S. cerevisiae</i> (adaptado de PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN, 1991 apud PRETOTIUS, 2000)	31
Figura 3 – Ilustra o ciclo sexual da levedura <i>S. cerevisiae</i> (adaptado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , disponível em: http://www.padre.kutno.pl/index.php?vin=Saccharomyces_cerevisiae).....	34
Figura 4 – Diversidade de áreas que envolvem as leveduras na aplicação industrial e biotecnológica (adaptado de WALKER, 1998)	37
Figura 5 – Filamentação de cepas da levedura <i>S. cerevisiae</i> em resposta ao jejum nutricional e ao estresse do meio, tal como presença de butanol e álcool isoamílico: a) leveduras normais (controle); b) leveduras agrupadas; c) leveduras filamentadas devido a presença de álcool isoamílico e, d) leveduras filamentadas devido a presença de butanol (adaptado de CECCATO-ANTONINI, 2008)	39
Figura 6 – A célula de levedura detecta os vários tipos de estresses e são desencadeadas respostas específicas e gerais e estas condições de estresse impostas à célula. Estas respostas resultam em alterações tanto ao nível enzimático como ao nível da expressão genética e levam à aquisição de tolerância ao estresse imposto. O controle do estresse tem um papel fundamental na regulação do crescimento celular (MAGER; HONMANN, 1997 apud PINHEIRO, 2004)	41
Figura 7 – Variação do volume nos reatores em função do tempo de alimentação com solução concentrada de sacarose: adição de 5 pulsos de volumes decrescentes (10mL no tempo zero, 6 mL, 4 mL, 3 mL e 2 mL) de uma solução concentrada de sacarose (800 g.L ⁻¹) totalizando um tempo de alimentação de 2 horas (parte A); adição de 5 pulsos de volumes decrescentes (12,3 mL no tempo zero, 7,4 mL – 4,9 mL – 3,7 mL e 2,5 mL) de uma solução concentrada de sacarose (650 g.L ⁻¹) totalizando um tempo de alimentação de 4 horas (Parte B)	54
Figura 8 – Curvas de tempo de reativação ou revitalização da levedura IQAr/45-1 em meio constituído por água de torneira estéril contendo 10 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L ⁻¹ de sacarose a 30°C. A curva em preto (■) indica a viabilidade e a em vermelho (●) indica a biomassa	66

- Figura 9** – Variações em viabilidade (A) e brotos viáveis (B) durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células reativadas da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada com ajuste de pH após cada pulso de sacarose. As curvas em preto (■) indicam valores iniciais e as vermelhas (●) indicam os valores no final dos ciclos de fermentação. Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, e alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca) 69
- Figura 10** – Efeitos de reativação entre ciclos sucessivos de fermentação com sacarose 200 g.L^{-1} sobre a viabilidade (A) e quantidade de biomassa (B) da levedura IQAr/45-1 durante a estocagem por 15 horas a 30°C sendo que as curvas em azul (■) indicam valores iniciais de reativação; e as curvas em rosa (●) indicam valores finais do repouso. 71
- Figura 11** – Variações em biomassa (A) e proteína total (B) durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada com ajuste de pH após cada pulso de sacarose. As curvas em preto (■) indicam valores iniciais e as vermelhas (●) indicam valores no final dos ciclos de fermentação. Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, e alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca) 72
- Figura 12** – Variações em etanol (A) e açúcar residual (B) durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada com ajuste de pH após cada pulso de sacarose. As curvas em preto (■) indicam valores iniciais e as vermelhas (●) indicam valores no final dos ciclos de fermentação. Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, e alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca) 72
- Figura 13** – Efeito das concentrações de sacarose (● 200 g.L^{-1} ; ▲ 180 g.L^{-1} ; ■ 156 g.L^{-1} , em relação ao volume final do meio) sobre as curvas de tempo das variações em viabilidade (parte A) e biomassa (parte B). Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca), e ajuste de pH após cada pulso 74
- Figura 14** – Efeito das concentrações de sacarose (● 200 g.L^{-1} ; ▲ 180 g.L^{-1} ; ■ 156 g.L^{-1} , em relação ao volume final do meio) sobre as curvas de tempo das variações em açúcar residual (parte A) e etanol (parte B). Condições de

fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca), e ajuste de pH após cada pulso 74

Figura 15 – Ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada por pulsos de sacarose adicionada até um total de 156 g.L^{-1} e seus efeitos sobre os valores iniciais (■) e finais (●) relacionados com: viabilidade (A), brotamento (B), biomassa (C), proteína total (D), açúcar residual (E) e etanol (F). Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca), e ajuste de pH após cada pulso 77

Figura 16 – Ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da levedura industrial BG1 em batelada alimentada por pulsos de sacarose adicionada até um total de 156 g.L^{-1} e seus efeitos sobre os valores iniciais (■) e finais (●) relacionados com: viabilidade (A), brotamento (B), biomassa (C), proteína total (D), açúcar residual (E) e etanol (F). Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca), e ajuste de pH após cada pulso 79

Figura 17 - Efeitos de reativações sucessivas do leite de levedura sobre a viabilidade e biomassa das leveduras IQAr/45-1 (“A” e “C”) e BG1 (“B” e “D”) durante a estocagem por 15 horas a 30°C sendo: (■) e (■) = valores iniciais do repouso; (●) e (●) = valores finais do repouso 82

Figura 18 – Ciclos sucessivos de fermentação a 37°C com reutilização de células da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada por pulsos de sacarose adicionada até um total de 156 g.L^{-1} e seus efeitos sobre os valores iniciais (■) e finais (●) relacionados com: viabilidade (A), brotamento (B), biomassa (C), proteína total (D), etanol (E) e açúcar residual total-ART (F). Condições de fermentação em cada ciclo: adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L^{-1} , massa seca), e ajuste de pH após cada pulso 84

Figura 19 - Efeitos de reativações entre ciclos sucessivos de fermentação a 37°C e adição de 156 g.L^{-1} de sacarose sobre a viabilidade (A) e quantidade de biomassa (B) da levedura IQAr/45-1 durante a estocagem do leite de levedura por 15 horas a 30°C , sendo: (■) valores iniciais do repouso; (●) valores finais do repouso 85

Figura 20 – As curvas de viabilidade (■) e biomassa (●) em função do tempo de fermentação com a levedura IQAr/45-1 em batelada simples a 34°C em meio

sintético contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose, foram realizadas da seguinte forma:
em mini-reator (A) e Erlenmeyers agitados (B) 86

Figura 21 – Curvas de tempo de biomassa e viabilidade obtidas com a levedura IQAr/45-1 em MS controle (A) e MS 2 vezes concentrado (B) após as seguintes suplementações: as curvas em preto (■) indicam o experimento controle (MS); as em vermelho (●) indicam a adição de ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹); as em azuis (▲) indicam adição de ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹) e DAP (1%); as curvas em azul escuro (■) indicam o MS contendo solução de sais [2x]; as curvas em rosa (●) indicam o meio MS contendo solução de sais [2x] e ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹); as em verde (▲) indicam o MS contendo solução de sais [2x] , ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹) e DAP (1%). **Condições das fermentações:** batelada simples, utilizando 200 g.L⁻¹ de sacarose adicionada e inóculo de 33 g.L⁻¹, a 34°C 92

Figura 22 (Anexo 1)- Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura IQAr/45-1 com valores de absorbância. O coeficiente de correlação para a reta ($y = a + b \cdot x$) foi de 0,9966, o coeficiente angular a foi de 2,44503 e o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,409 para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22. As células foram propagadas em meio sintético (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1998) contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose e enriquecido com 20 g.L⁻¹ de extrato de levedura 106

Figura 23 (Anexo 2)- Curva de solução de glicose 0,2% para a dosagem do açúcar residual pelo método de 3,5 DNS (MILLER, 1959). A regressão linear da curva $y = a + b \cdot x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 15,89474$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,99904$) e fator de conversão de absorbância em concentração de açúcares redutores ($F = 0,063$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22), destinada a correlacionar a concentração de glicose e absorbância dos hidrolisados 107

Figura 24 (Anexo 3)- Curva-padrão de solução de soro albumina bovina para a dosagem do de proteína total pelo método do Biureto (ROBYT; WHITE, 1987). A regressão linear da curva $y = a + b \cdot x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 0,08725$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,998$) e fator de conversão de absorbância em concentração de proteína ($F = 0,115$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22) 108

Figura 25 (Anexo 4)- Curva-padrão de solução de glicose para a dosagem de trealose. A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorbância em concentração de trealose ($F = 0,485$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas leveduras importantes do ponto de vista biotecnológico e suas aplicações industriais (Walker, 1998)	35
Tabela 2 - Composição das soluções estoque utilizadas no preparo do meio sintético descrito por Thomas, Hynes, Ingledew (1998)	51
Tabela 3 - Variações em quantidade de inóculo e intervalo de tempo entre os pulsos de alimentação sobre as variáveis e parâmetros do processo durante as fermentações, adicionando-se um total de 200 g.L ⁻¹ de sacarose, em relação ao volume final de meio com reajuste de pH somente após a adição do primeiro pulso	61
Tabela 4 - Comparação do efeito do reajuste do pH do meio apenas após a adição do primeiro pulso de sacarose (experimento controle) e após cada pulso de sacarose adicionado em intervalos de 60 minutos (total de 4 horas de alimentação) usando-se 33 g.L ⁻¹ de inóculo	62
Tabela 5 – Variações em viabilidade e biomassa das células do leite de levedura (25 g.L ⁻¹ , ou 9,5 % v/v) suspensas em água ou meio mínimo contendo sacarose e extrato de levedura a pH 4,0, após 15 horas de incubação com agitação de 125 rpm a 30°C	64
Tabela 6 – Variações em viabilidade e biomassa das células do leite de levedura (25 g.L ⁻¹ , ou 9,5 % em v.v ⁻¹) com o tempo de tratamento de reativação das células à 4° C e a 30°C em água de torneira contendo sacarose e extrato de levedura a pH 4,0 e/ou água pura	67
Tabela 7 – Variação em proteína total e trealose das células do leite de levedura (25 g.L ⁻¹ , ou 9,5 % em v.v ⁻¹) com o tempo de tratamento de reativação das células à 4°C e a 30°C em água de torneira contendo sacarose e extrato de levedura a pH 4,0 e/ou água pura	68
Tabela 8 – Efeitos das diferentes concentrações de sacarose adicionada a bateladas alimentadas únicas por pulsos de sacarose em intervalos de 60 minutos (total de 4 horas) e com pH reajustado para 4,5 após cada pulso	74
Tabela 9 - Comparação das variáveis de fermentação entre as leveduras IQAr/45-1 e a levedura industrial BG1.....	81
Tabela 11 - Comparações ente as variáveis das fermentações com a levedura IQAr/45-1 a 34°C e 37°C	83

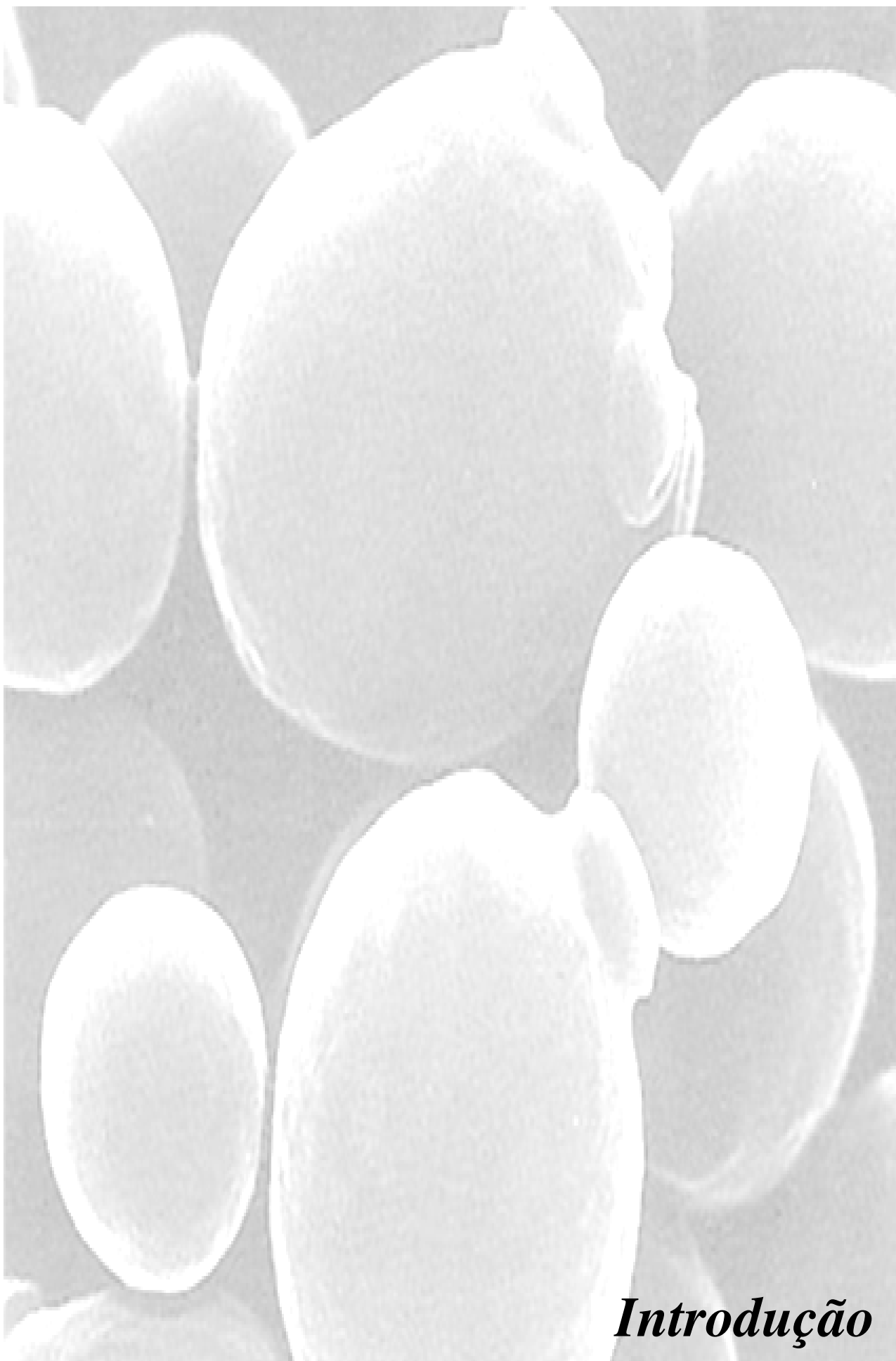
Tabela 12 - Efeito da alteração na concentração das fontes de nitrogênio, fosfato e magnésio do meio MS sobre a viabilidade e biomassa em processo de batelada simples após 12 horas de fermentação em Erlenmeyers agitado	88
Tabela 13 – Efeito da alteração na concentração das soluções usadas no preparo do meio mínimo (MS) sobre a viabilidade e biomassa após 8 horas de fermentação em Erlenmeyers agitado contendo 200 g.L ⁻¹ de sacarose adicionada	90
Tabela 14 - Efeito da suplementação do meio MS com sulfato de zinco e DAP sobre a viabilidade e biomassa após 8 horas de fermentação em processo de batelada simples realizada Erlenmeyers, com adição de 200 g.L ⁻¹ de sacarose	91
Tabela 15 – Efeito da suplementação do meio sintético com sulfato de zinco e DAP sobre as medidas e parâmetros do processo, em batelada alimentada por pulsos de sacarose a 34°C	94

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract	12
Introdução	25
1.1 -Etanol: importância e papel na economia brasileira	28
1.2 – Leveduras e Aplicações	30
1.2.1 - Citologia	30
1.2.2 - Metabolismo	32
1.2.3 – Reprodução	33
1.2.4 – Uso de leveduras em processos industriais	34
1.2.5- Relevância das leveduras em processos industriais	36
1.3 – Populações Microbianas heterogêneas em Fermentações Industriais	38
1.4 – Situações de estresse em Processo de Produção de Etanol	39
1.4.1-Estresse Térmico	41
1.4.2-Estresse Etanólico	42
1.4.3-Estresse Osmótico	42
1.5 – Tipos de Processos de Produção de Etanol	45
1.5.1 – Mecanismos de Regulação da Fermentação Alcoólica	46
Objetivo	47
Materiais e Métodos	49
3.1 – Leveduras	50
3.2 – Técnicas de Cultivo	50
3.2.1 – Meio usado na de Fermentação	50
3.2.2 – Propagação do inóculo e obtenção do leite de levedura	51
3.2.3 – Ativação do leite de levedura entre um ciclo de fermentação e o seguinte ..	52
3.2.4 – Sistema de fermentação	52
3.2.4.1 – Estratégias aplicadas ao processo de fermentações em batelada simples agitadas Erlenmeyers	52

3.2.4.2 – Estratégias aplicadas ao processo de fermentação em batelada simples em mini-reatores	52
3.2.4.3 – Estratégias aplicadas ao processo de fermentação em bateladas alimentadas por pulso de sacarose em mini-reatores	53
3.2.5 – Determinação das variáveis dependentes do processo	54
Resultados e Discussões	59
4.1 – Condições para fermentação em altas concentrações de sacarose com meio sintético de alta densidade celular	60
4.1.1 – Efeito do tamanho do inóculo e da estratégia de alimentação	60
4.1.2 – Estratégia de controle do pH durante o processo de fermentação em batelada alimentada	62
4.2 – Estabelecimento de um meio de ativação a ser usado entre ciclos sucessivos de fermentação	63
4.3 – Ciclos sucessivos de fermentação a 34°C intercalados por reativação do leite de levedura: efeito da concentração de sacarose	69
4.3.1 – Ciclos sucessivos de fermentação com 200 g.L ⁻¹ de sacarose em relação ao meio final	69
4.3.2 – Efeito da concentração de açúcar sobre a linhagem IQAr/45-1 em bateladas únicas alimentadas por pulsos	73
4.4 – Comparação entre a levedura IQAr/45-1 e a levedura comercial BG1 durante ciclos sucessivos de fermentação em meio sintético	76
4.4.1 – Curvas de variação em viabilidade, brotamento, biomassa, etanol, proteína total e açúcar residual em função do número de ciclos de fermentação realizadas com a levedura IQAr/45-1 em meio sintético contendo um total de sacarose adicionada de 156 g.L ⁻¹	76
4.4.2 – Curvas de variação em viabilidade, brotamento, biomassa, etanol, proteína total e açúcar residual em função do número de ciclos de fermentação realizados com a levedura comercial BG1 em meio sintético contendo um total de sacarose adicionada de 156 g.L ⁻¹	78
4.4.3 – Curvas de variação de biomassa e viabilidade durante a reativação das células no meio de ativação das leveduras IQAr/45-1 e BG1	81
4.5 – Efeito da elevação da temperatura em ciclos sucessivos de fermentação a 37°C intercalados por reativação do leite de levedura	82

4.5.1– Ciclos sucessivos de fermentação com um total de 156 g.L ⁻¹ de sacarose adicionado ao meio final	82
4.5.2 - Curvas de variação de biomassa e viabilidade durante a reativação das células da levedura IQAr/45-1 no meio de reativação	84
4.6 – Deficiências nutricionais do meio mínimo (MS) em fermentações com altas densidades de células	86
4.6.1 – Efeito sobre a viabilidade e biomassa para a levedura IQAr/45-1 em batelada simples realizada em mini-reatores e Erlenmeyers	86
4.6.2 – Alterações na composição do meio mínimo (MS) em batelada simples realizada em Erlenmeyers	87
4.6.3 – Efeito da suplementação nutricional em batelada alimentada por pulsos de sacarose em mini-reatores	93
Conclusões	95
Referências	98
Anexos	105
Publicação	110



O termo fermentação deriva do verbo latino *fervere* que significa ferver, que foi a aparência resultante da ação das leveduras em extratos de frutos ou em grãos de malte. Este efeito é consequência da liberação do dióxido de carbono durante o catabolismo anaeróbio de açúcares presentes nos extratos. O catabolismo de açúcares é um processo oxidativo que leva a redução do nucleotídeo de piridina ou NAD^+ , o qual devem ser oxidados novamente para que o processo de consumo de açúcares continue. Em condições aeróbias, esta oxidação ocorre via respiração (cadeia respiratória) em que o oxigênio é oceptor final de elétrons. Em anaerobiose, a oxidação dos nucleotídeos de piridina está acoplada à redução de um composto orgânico (di-hidroxiacetona ou acetaldeído), que resulta da via glicolítica. Assim, o termo fermentação alcoólica designa processo de obtenção de energia, no qual os compostos intermediários do metabolismo atuam como doadores e receptores de elétrons (PINHEIRO, 2004) como mostra a **figura 1**. O principal produto da fermentação alcoólica é o etanol.

O etanol é composto por dois átomos de carbono, cinco átomos de hidrogênio e uma hidroxila ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), sendo obtido no Brasil pelo processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou mistura de caldo de cana e melaço. O etanol também pode ser produzido a partir de cereais, tubérculos como beterraba e mandioca, entre outros derivados agrícolas. Toda a bebida alcoólica contém o álcool etílico (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2007). A reação global que ocorre na fermentação a partir do açúcar da cana, sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), está descrita abaixo:



A produção de etanol é muito importante como forma alternativa de energia. Assim, faz-se necessário conhecer as respostas das diversas cepas de leveduras, as formas de estresses aos quais as células são submetidas (alcoólico, térmico, osmótico, jejum nutricional), para que se possa propor o melhor processo e condição a serem utilizadas incluindo vantagens e desvantagens.

Alta produtividade de etanol em curto tempo de fermentação é um fator econômico de alta pertinência em produção de etanol industrial. Porém, isto é dependente do tipo de levedura, tipo de processo (batelada, batelada alimentada ou batelada contínua), densidade celular, temperatura, concentração de açúcar e enriquecimento do meio com os próprios nutrientes, junto com outros fatores que influenciam a atividade microbiana. Estudos relacionados com a produção de etanol foram levados a fundo usando meios complexos e meios sintéticos. Embora ainda não tenha sido implementado em escala industrial devido a razões econômicas, umas das características favoráveis aos meios sintéticos (MS) sobre as matérias-primas ou meios naturais é que estes meios sintéticos são compostos de substâncias químicas puras e em proporções precisamente conhecidas (ZHANG; GREASHAM, 1999). A matéria prima industrial é de composição variável, assim, um meio sintético fornece dados de pesquisa básica de maior credibilidade.

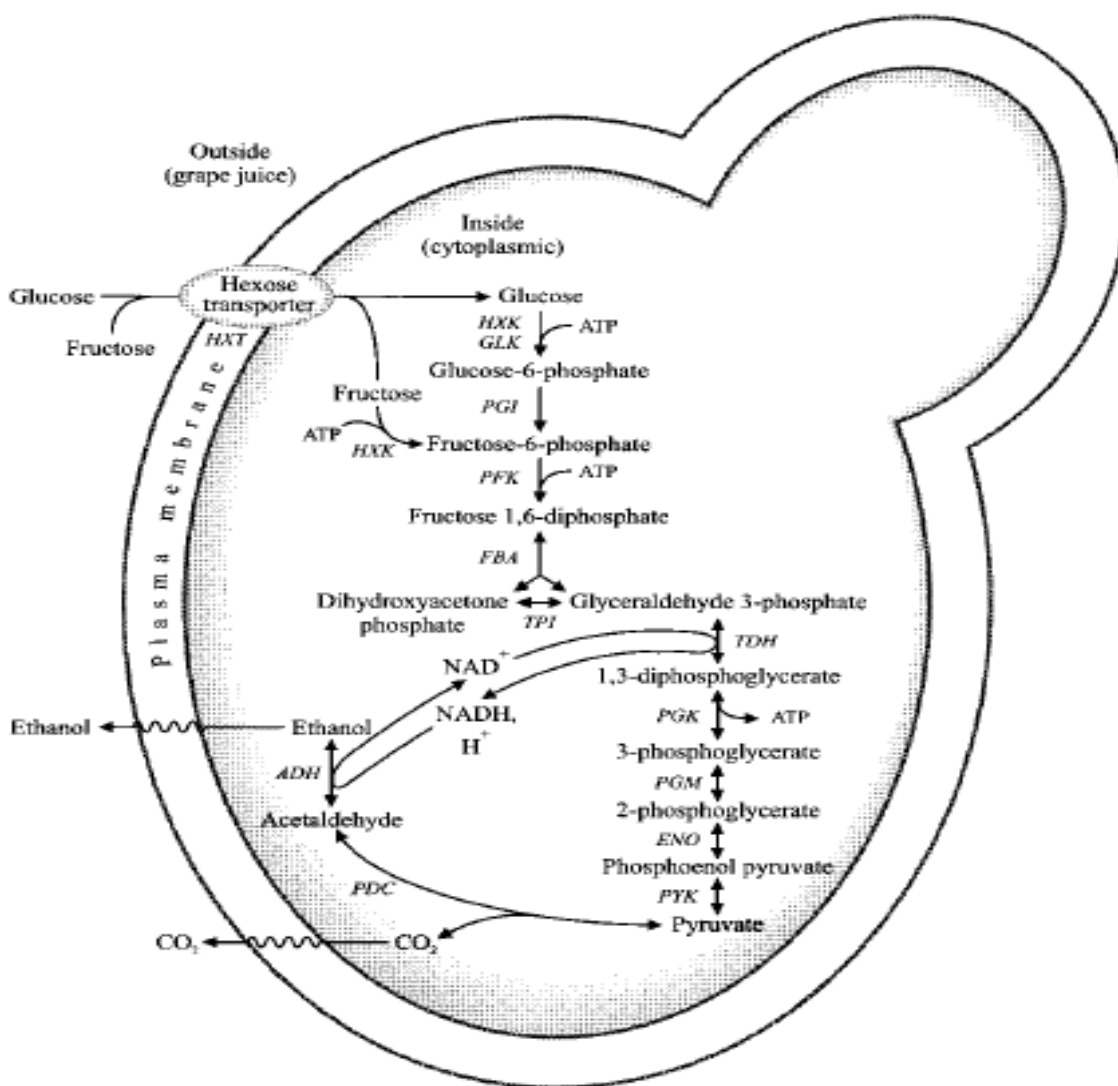


Figura 1 – Ilustração do metabolismo da produção do etanol (PRETORIUS, 2000).

1.1 - ETANOL: IMPORTÂNCIA E PAPEL NA ECONOMIA BRASILEIRA

A fermentação alcoólica é conhecida desde a antiguidade, como na produção de cerveja pelos egípcios, na fabricação do vinho dos povos da Mesopotâmia e da Grécia, ocupando lugar de destaque nas mais variadas culturas, também como bebidas derivadas da fermentação do arroz na China e Japão, do milho no Império Inca do Peru. A panificação também é um processo de fermentação alcoólica. O conhecimento envolvido na fabricação do etanol era guardado a sete chaves, dada a importância das bebidas, seu uso no preparo de remédios e especialmente na conservação de plantas medicinais (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2007).

No Brasil, as indústrias de produção de açúcar e álcool (bebidas) estiveram sempre correlacionadas, desde o tempo do descobrimento. Deduz-se que a produção de álcool iniciou-se na Capitania de São Vicente onde foi montado o primeiro engenho de açúcar do País, após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar trazidas da ilha da Madeira em 1532, sendo assim durante séculos, a produção de pinga ou cachaça o principal álcool produzido por fermentação. A indústria de álcool desenvolveu-se na Europa, no meados do século XIX, e no último quarto deste século iniciou-se a produção de etanol no Brasil, com as sobras do melaço da indústria de açúcar (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Uma destilaria autônoma produz apenas etanol, enquanto que uma usina associada ou mista produz tanto o etanol quanto o açúcar a partir da mesma matéria prima (RETRATO..., 2009).

Obtém-se etanol por três maneiras gerais: via sintética e via fermentativa (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001):

- via sintética obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha, sendo este processo viável para países que possuem grandes reservas de petróleo e uma indústria petroquímica avançada.
- via fermentativa é a maneira mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil. Mesmo que existam derivados de petróleo disponível para a produção de álcool de síntese, a via fermentativa ainda será de grande importância para a produção de bebidas destiladas, como é o caso das aguardentes.

O Brasil foi o primeiro país a produzir a bioenergia em larga escala, com a implementação do programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) pelo decreto nº 76.596/73 do Governo Federal datado de 1973. Este programa trouxe diversos benefícios, como o avanço do desenvolvimento rural e a criação de um combustível que colabora com a redução da poluição ambiental, uma vez que este país possui uma frota expressiva de automóveis

movidos a álcool (PARRO, 1996). O Brasil lançou em 2003, o automóvel *flex-fuel* que é movido tanto pelo etanol quanto pela gasolina. Em 2004, esse tipo de automóvel representou 21,6% do total de carros vendidos, em 2005 atingiu a cifra de 61,7% carros vendidos e elevou-se para 87,2% dos veículos comercializados em 2008 (O SUCESSO..., 2005; VENDA..., 2009).

A produção de álcool etílico no Brasil chegou a 17,5 bilhões de litros na safra 2006/2007, das quais três bilhões de litros foram exportados, sendo o restante consumido pelo mercado interno (PROCANA, 2007). Devido ao alto custo da gasolina, o etanol está ganhando abertura para tornar-se uma importante matriz energética mundial e renovável. Além disto, o etanol pode servir de plataforma para geração de uma gama enorme de derivados da petroquímica (LALUCE, 1991).

Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país, bem sua distribuição geográfica que engloba diversos climas e tipos de solos, permitindo assim o cultivo da cana-de-açúcar em quase todo o território e durante todo o ano (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Atualmente a fermentação do etanol não se restringe exclusivamente do caldo da cana-de-açúcar, mas sim a sua obtenção como subproduto da cristalização da sacarose do caldo, isto é melaço, que é o produto ideal uma vez que contém em média um teor de 90% de Brix sendo 60% de açúcares redutores e outros elementos necessários para a fermentação sem a adição de nutrientes (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

O setor sucroalcooleiro apresenta um cenário de crescimento para os próximos anos, principalmente no que se refere o etanol e a energia elétrica. Ainda com potencial enorme para ser explorado, a co-geração de energia a partir de resíduos da cana-de-açúcar tende a se ampliar a cada ano. Segundo a União da Indústria da Cana-de-Açúcar – UNICA (DOCE..., 2008), a co-geração de bioeletricidade é o terceiro produto proveniente da cana, e em breve ocupará a segunda posição, pois a maioria das usinas são alto suficientes em produção de energia (TA LIGADO?, 2008).

A quantidade de energia colocada na rede elétrica pelas indústrias tem crescido a cada ano. Em 2001 representava 120 megawatts de potência instalada. Em 2007 esse número chegou a 2.245 megawatts e para 2008 o excedente de energia gerado pelas usinas de açúcar e álcool aproximou-se de 5.000 megawatts. Espera-se que potencial para geração seja em média 11.500 megawatts em 2015, devendo passar para 14.000 megawatts em 2020. Isto representa uma potência maior que a gerada pela hidrelétrica de Itaipu (TA LIGADO?, 2008).

1.2 – LEVEDURAS E APLICAÇÕES

1.2.1- Citologia

A citologia das leveduras refere-se à anatomia celular. A **figura 2** ilustra em detalhes os componentes celulares da levedura *S. cerevisiae*. Como qualquer fungo, as leveduras são organismos eucariotos com um alto grau de organização. Possuem um núcleo celular delimitado por uma membrana nuclear e várias organelas sub-celulares como mitocôndrias (responsável metabolismo energético da célula), vacúolos (reservatório de nutrientes, de enzimas e produtos tóxicos), retículo endoplasmático e complexo de golgi. A parede celular apresenta uma estrutura rígida constituída de 25% do peso da célula, ela também protege a célula além de conter várias enzimas. As células das leveduras apresentam de forma esférica, elipsoidal ou cilíndrica. Contudo, o tamanho e a forma podem variar, dependendo das condições ambientais como temperatura, escassez de nutrientes entre outros. São células que não possuem a capacidade de se movimentarem livremente (WALKER, 1998).

As leveduras reproduzem-se por brotamento e formam colônias lisas ou rugosas. O gênero das leveduras engloba cerca de 500 espécies com diversas atividades metabólicas. Muitas leveduras têm sido utilizadas na alimentação e são culturalmente e legalmente aceitas para o consumo humano (WALKER, 1998).

A levedura *S. cerevisiae* é a estirpe mais conhecida do seu grupo devido à sua vasta utilização, particularmente no fabrico de fermento de panificação, de vinho e de cerveja. Os termos “levedura” e *Saccharomyces cerevisiae* são utilizados normalmente como sinônimos, porém, as leveduras da espécie *Saccharomyces* são uma das poucas leveduras fermentativas que são capazes de crescer em condições de anaerobiose, enquanto que as leveduras fermentativas dos gêneros *Kluyveryces* e *Candida* necessitam de quantidades de oxigênio para seu metabolismo (WEUSTHUIS, 1994 apud PINHEIRO, 2004).

WEUSTHUIS, R. A. General introduction. In: _____. **Disaccharide fermentation by yeasts**. Proedschrift (Doutorandus Biologie), Universidade de Delft, Netherlands, 1994.

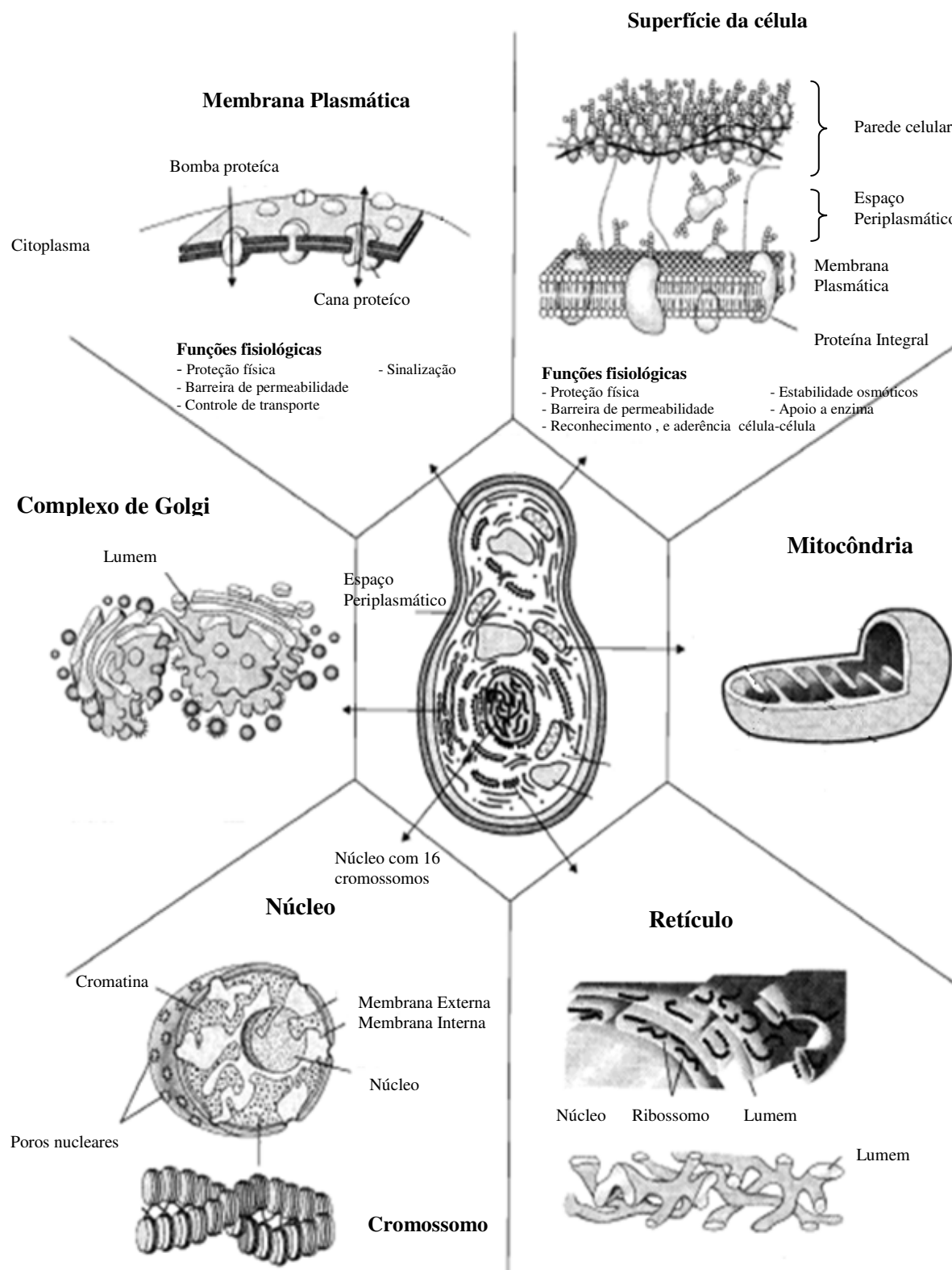


Figura 2 – Representação esquemática dos componentes celulares de uma levedura *S. cerevisiae* (adaptado de PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN, 1991 apud PRETOTIUS, 2000,)

PRETORIUS, I. A.; VAN DER WESTHUIZEN, T. J. The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, v. 12, p. 3-31, 1991.

1.2.2- Metabolismo

O metabolismo celular das leveduras apresenta uma ordenada seqüência de reações bioquímicas intimamente ligadas a sistemas enzimáticos (**Fig. 1**). O metabolismo nas leveduras é resultante de dois processos fundamentais: o catabolismo e o anabolismo. No catabolismo, os microrganismos promovem a degradação do substrato, enquanto no anabolismo, eles promovem a síntese de material celular (NOGUEIRA; VENTURINI-FILHO, 2005).

Os fenômenos catabólicos nas leveduras que produzem etanol compreendem: a respiração e a fermentação. A respiração é um processo biológico através do qual o açúcar ($C_6H_{12}O_6$) é completamente oxidado em CO_2 e H_2O , produzindo como saldo energético 38 moléculas de ATP. Dada a sua elevada eficiência energética, o processo respiratório é particularmente útil na multiplicação celular, devendo ser utilizado quando se deseja multiplicar fermento no início da safra. A fermentação alcoólica, por sua vez, é constituída de reações em que o açúcar é parcialmente oxidado para formar etanol e CO_2 , resultando na produção de apenas duas moléculas de ATP. Portanto, esse processo não é eficaz para a multiplicação celular, mas essencial na produção de etanol, indispensável na fabricação das bebidas alcoólicas, álcool e pão (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

Ambos os processos metabólicos, fermentativos e respiratórios, são muito importantes em processos industriais. A fermentação é essencial para a produção de dióxido de carbono e etanol, enquanto a respiração favorece a produção de biomassa, como por exemplo, na fabricação de fermento para pães. Do ponto de vista biotecnológico, é extremamente importante classificar as leveduras quanto à sua capacidade fermentativa e respiratória (PINHEIRO, 2004).

O metabolismo do carbono durante o crescimento depende do gênero da levedura, da fonte de carbono e das condições ambientais. De todos os fatores ambientais que regulam o metabolismo respiratório e fermentativo nas células de levedura, as concentrações de oxigênio e de glicose são os fatores mais bem descritos na literatura. Estes fatores estão intimamente ligados a vários fenômenos de regulação do metabolismo.

As leveduras podem ser divididas em três grupos de acordo com o seu metabolismo (PINHEIRO, 2004):

- Leveduras com um metabolismo fermentativo dominante (fermentativas obrigatórias): estas espécies fermentam a glicose e utilizam com dificuldade os substratos não-fermentativos.

- Leveduras com metabolismo misto (facultativas), respiratório e fermentativo. Estas podem ser divididas em dois subgrupos: leveduras sensíveis à repressão catabólica pela glicose, como é o caso da levedura *S. cerevisiae*; e leveduras não sensíveis à repressão, como é o caso da levedura *Candida utilis* e da levedura *Kluyveromyces marxianus*.
- Leveduras não fermentativas. Algumas leveduras como estirpes de *Rhodotorula*, não são capazes de realizar a fermentação alcoólica devido à incapacidade de sintetizar enzimas chave da via fermentativa.

1.2.3 - Reprodução

As leveduras se reproduzem geralmente por brotamento. Os brotos podem ser produzidos em qualquer parte da célula (brotamento multilateral), apenas nos dois pólos da célula (brotamento bipolar) ou ainda em um único pólo das células (brotamento monopolar) (WALKER, 1998).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* reproduzem assexuada (mitose) ou sexuadamente (meiose). Quando em meio de cultura rico em nutrientes, como nas fermentações industriais a reprodução é assexuada, onde a multiplicação das leveduras ocorre por brotamento ou gemulação, originando células-filhas idênticas a célula mãe. Já o processo sexuado pode ocorrer em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento como por exemplo, por deficiências nutricionais, onde se tem a formação de ascósporos (esporos) contidos no interior dos ascos. A reprodução sexuada resulta da meiose, processo que, a partir de uma célula diplóide forma células haplóides. Nos fungos, essa forma de reprodução só acontece sob certas circunstâncias. Quando há escassez de alguns nutrientes, por exemplo, alguns fungos sentem que o ambiente deixou de ser propício para crescimento vegetativo e passam a realizar meiose que da origem a células haplóides capazes de se cruzarem ou hibridizarem (WALKER, 1998).

Nos fungos que passam quase todo o ciclo de vida na forma haplóide, a fusão de células reprodutivas (uma de cada parceiro) forma células diplóide que, em geral, logo depois sofrem meiose. Os esporos sexuais, que resistem melhor às condições adversas do meio, favorecendo a perpetuação da espécie, estão contidos nos chamados “corpos de frutificação” ou ascos (FERREIRA, 2005).

O que torna os fungos sexualmente distintos é a existência de certas seqüências genéticas em um parceiro e a inexistência das mesmas em outro. Por isso, convencionou-se chamar esses parceiros não de macho e fêmea, mas, por exemplo, de tipo “a” ou “α” com

base na reação de acasalamento, em inglês, *mating-type* (FERREIRA, 2005). Tudo o que foi exposto encontra-se ilustrado de forma simplificada na **figura 3**.

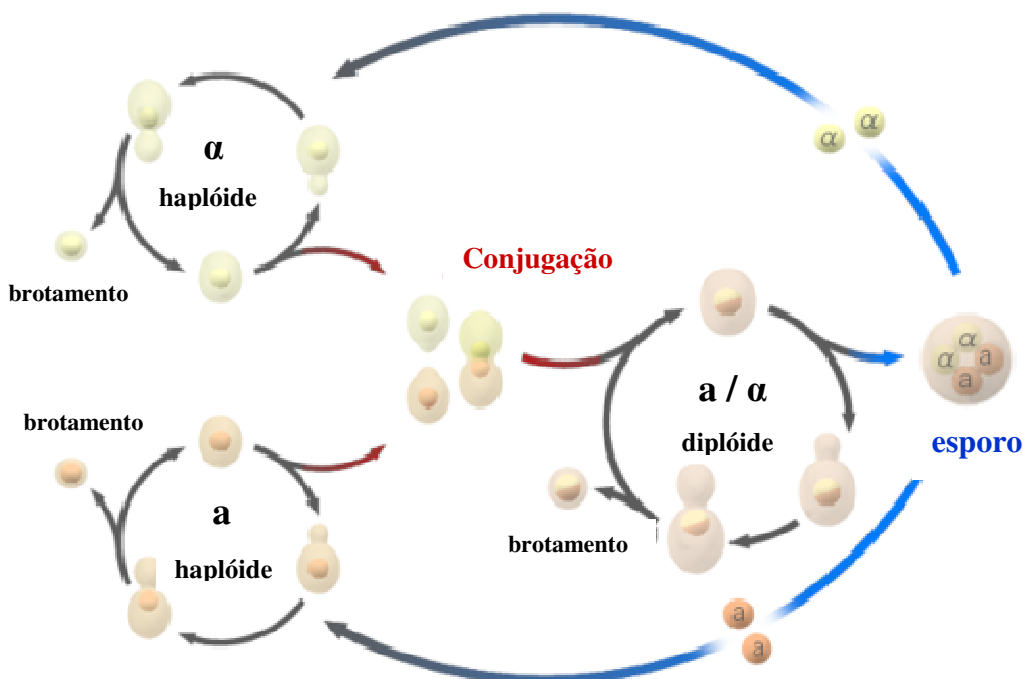


Figura 3 – Ilustra o ciclo sexual da levedura *S. cerevisiae* (adaptado de OLIVEIRA, 2006 disponível em:

<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7493/1/Protocolos%20MSPEC.pdf>)

1.2.4 - Uso de leveduras em processos industriais

A **tabela 1** mostra as principais leveduras e suas aplicações do ponto de vista industrial.

A cana-de-açúcar sadia carrega várias espécies de leveduras, como exemplo, dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*. As leveduras habitantes naturais do caldo são potencialmente candidatas a dominarem a biomassa das dornas de produção de bioetanol (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

A incidência de leveduras não *Saccharomyces* nos processo de produção de cachaça é comum, uma vez que nem sempre os teores alcoólicos nesse tipo de fermentação é tão alto que selecionam apenas linhagens do gênero *Saccharomyces*; já no caso da fermentação para obtenção do etanol carburante, a permanência de uma linhagem não *Saccharomyces* em condições normais do processo é difícil, uma vez que os teores alcoólicos nas dornas desse processo não permitem a sobrevivência de linhagens não *Saccharomyces* que não toleram níveis altos de etanol (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

Tabela 1 – Algumas leveduras importantes do ponto de vista biotecnológico e suas aplicações industriais (WALKER, 1998)

Levedura	Aplicações atuais e perspectivas futuras
<i>Candida</i> spp.	Grande variedade de utilizações dependendo da espécie, como exemplo: <i>Candida albicans</i> : ácido-6-aminopenicilânico e vitamina B ₆ a partir de hidrocarbonetos;
	<i>Candida maltosa</i> : proteína microbiana a partir de ácidos graxos e alcanos;
	<i>Candida pelliculosa</i> ; proteína microbiana a partir de matérias celulósicas
<i>Hansenula polymorpha</i>	Levedura metilotrófica utilizada na expressão de genes heterólogos;
<i>Hluveromyces marxianus</i>	Fermentam a lactose e o polifrutosano; fermentam o cacau;
<i>Hluveromyces lactis</i>	Sintetizam várias enzimas: lactase, pectinases ...

As maiorias das usinas até meados dos anos 90 iniciavam a safra com toneladas de leveduras de panificação. A partir dos anos 90 constatou-se que as leveduras utilizadas como inóculo são completamente substituídas por leveduras nativas ainda no início da safra, e observaram também que a única levedura que tem a capacidade de permanecer no processo é aquela isolada da mesma unidade em safras anteriores. Algumas linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de processos de fermentação alcoólica são largamente utilizadas como inóculo para início das safras brasileiras. Essas foram nomeadas com as iniciais das unidades de origem, dessa forma tem-se disponível BG1 (Usina Barra Grande), CR1 (Usina Cresciumal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), CL (Usina Clealco), entre outras. Embora a utilização de leveduras selecionadas seja uma alternativa viável para o início da safra, fazer uso de leveduras provenientes do próprio processo é a expectativa para o futuro das usinas brasileiras. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de produção de álcool está relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo. O conhecimento das características quanto ao potencial fermentativo da levedura é a informação mais importante para a produção do processo de fermentação (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado sadio trabalha com níveis de bactérias nunca menores que 10^5 células/mL (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

As leveduras industriais resultam do isolamento de variantes obtidos durante a operação de destilarias e não apresentam marcas genéticas de auxotrofia.

1.2.5- Relevância das leveduras em processos industriais

É longa a história de associação das leveduras ao desenvolvimento da civilização. A importância industrial das leveduras vêm estendendo além da fermentação tradicional, sendo que atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como demonstra a **figura 4**.

As células de levedura transformam os açúcares dos diferentes substratos em vários produtos de interesse comercial através do processo de fermentação. Estes produtos são utilizados na indústria de alimentos para a produção de vinhos, cerveja, bioetanol e pão. Além disto, as leveduras também são utilizadas na indústria química (produção de enzimas, pigmentos, saborizante de alimentos e fonte de medicamentos) na indústria farmacêutica (vacinas, hormônios, probióticos e fatores sanguíneos por leveduras geneticamente modificadas), na tecnologia ambiental (controle biológico, biorremediação, utilização de subprodutos indústrias, bioabsorção de metais), nas pesquisas biomédicas (metabolismo de drogas, doenças genéticas humanas, câncer e AIDS), além das pesquisas fundamentais nas áreas de biologia celular, bioquímica, genética molecular e biologia molecular. As indústrias de bebidas à base de fermentação alcoólica dependem da habilidade de leveduras como *S. cerevisiae* de converter os açúcares dos diferentes substratos (maltose, sacarose, amido) em glicose, e este em dióxido de carbono e etanol (GUEIROS, 2006).

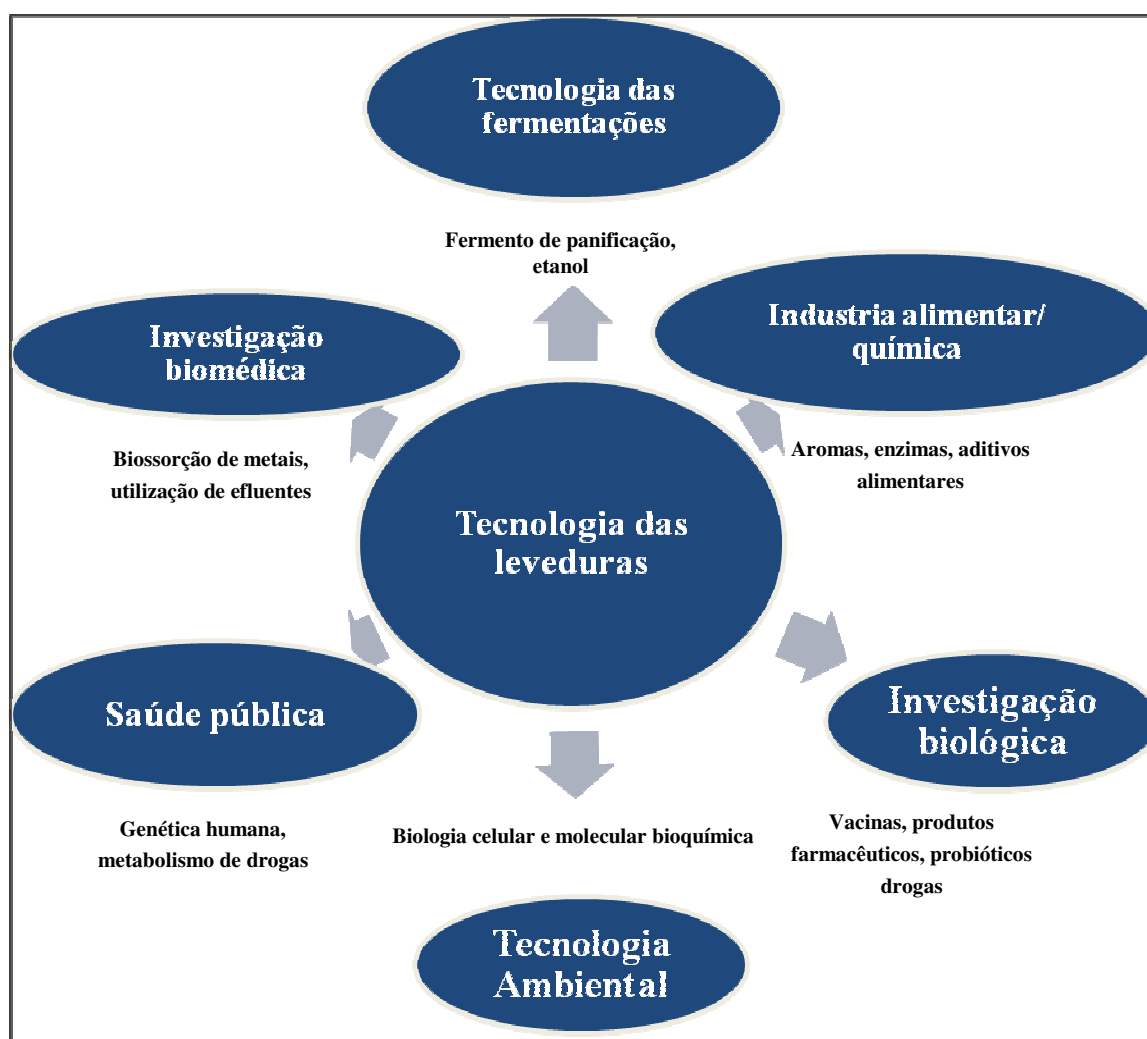


Figura 4 – Diversidade de áreas que envolvem as leveduras na aplicação industrial e biotecnológica (adaptado de WALKER, 1998)

As fermentações clássicas de produção de bioetanol, cerveja, vinho, bebidas destiladas e fermento de panificação usualmente utilizam linhagens da levedura *S. cerevisiae*. O cultivo em bateladas alimentadas tem sido utilizado com sucesso em produção de bioetanol, sendo também utilizado processo contínuo. A alimentação pode ser feita de forma contínua ou intermitente. As inoculações com reutilização de células evitam os custos com a propagação do inóculo, os quais incluem consumo adicional de matéria prima e levam a tempos mais longos de fermentação. O uso de altas densidades celular reduz os períodos de fermentação. As destilarias brasileiras operam em altas concentrações de açúcar (10% a 20% de açúcar total no mosto de alimentação, p.v⁻¹) e altas densidades de células (25-30% do volume de trabalho da dorna em leite de levedura equivalente a uma concentração final de células de 10%, v.v⁻¹). As altas densidades de células minimizam os efeitos da inibição pelo produto (RIESENBERG; GUTHKE, 1999), tornando possível a realização de fermentações mais

rápida. Diminuições em produção de etanol ocorrem sempre que a formação da biomassa for significativa. Em destilarias brasileiras, o excedente de biomassa é retirado antes do início de cada novo ciclo de fermentação, sendo utilizado no preparo de ração animal (LALUCE, 1991). O aumento do tamanho do inóculo levou a um aumento da viabilidade celular na população de células de uma linhagem termotolerante da levedura *S. cerevisiae* durante a fermentação de sacarose 15% a 40°C (UENO; URANO; KIMURA, 2002).

1.3 - POPULAÇÕES MICROBIANAS HETEROGÊNEAS EM FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS

As condições dos processos de fermentação utilizados em destilarias e usinas brasileiras são dificultados em relação à assepsia do substrato e equipamentos, favorecendo o desenvolvimento de bactérias e leveduras selvagens (CAMOLEZ; MUTTON, 2005). Segundo Cabrini e Gallo (1999) levedura contaminante é qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela levedura selecionada para a condução da produção de álcool. O grau de contaminação pode ser tal que se tenha uma fermentação lenta ou mesmo interrupção do processo.

As matérias primas utilizadas em processos industriais de fermentação, tais como produção de vinhos, etanol combustível, bebidas destiladas e outros processos da área de alimentos não são esterilizadas. São processos que dependem de uma população microbiana heterogênea considerando-se a taxonomia, a genética e a bioquímica, sendo a levedura *S. cerevisiae* a principal responsável pela fermentação alcoólica. A tolerância ao etanol e a adaptação à alta acidez, além de outros fatores de estresse, parecem ser responsáveis pela persistência de algumas espécies ou linhagens de levedura enquanto outras desaparecem durante o processo de fermentação (THORNTON, 1991; MORAIS et al., 1997).

A população microbiana desenvolve heterogeneidade em processos de fermentação (SUMNER; AVERY, 2002; MORAIS et al., 1997), devido a: a) coexistência de células de diferentes tamanhos que se encontram em diferentes estágios do processo de divisão celular, expressando genes de forma diferenciada; b) diferenças de idade entre células que passam a apresentar diferenças em parâmetros fisiológicos e sensibilidade a agentes mutagênicos; c) diferenças na duração do ciclo de divisão celular, sendo que a parede das células apresentam resistência elevada a enzimas líticas e supressão da velocidade de crescimento em fase estacionária; d) proliferação de bactérias e leveduras selvagens; e) aparecimento de variantes fenotípicos (reversíveis) e genotípicos (mutantes) por adaptação às condições de estresses.

Assim, células de leveduras que toleram maior acidez podem aparecer durante um processo de fermentação. Recentemente, observou-se que o surgimento e o enriquecimento de mutantes espontâneos são importantes durante o desenvolvimento de tolerância em uma cultura de leveduras (ZEYL; DEVISSER, 2001).

As mutações resultantes de estresse (Fig. 5) são os principais responsáveis pela heterogeneidade de uma população de levedura industrial. Dependendo das condições do processo podem aparecer alterações morfológicas que dão a impressão de que a população da levedura passou por uma invasão de leveduras selvagens (CECCATO-ANTONINI, 2008).

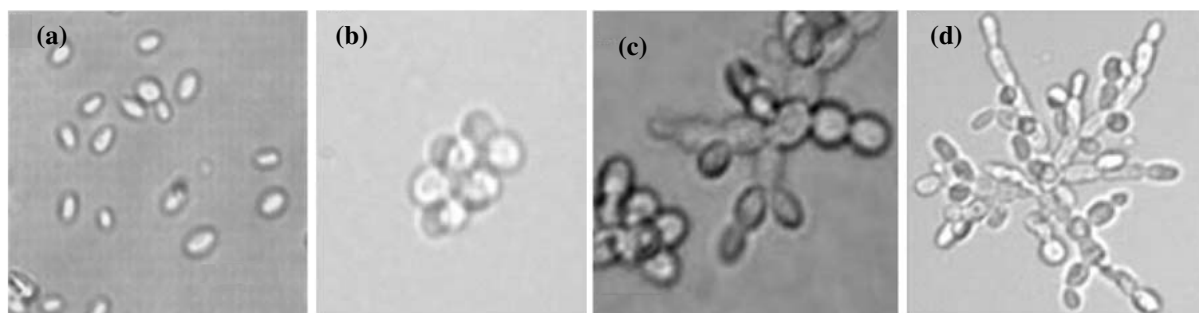


Figura 5 – Filamentação de cepas da levedura *S. cerevisiae* em resposta ao jejum nutricional e ao estresse do meio, tal como presença de butanol e álcool isoamílico: a) leveduras normais (controle); b) leveduras agrupadas; c) leveduras filamentadas devido à presença de álcool isoamílico e d) leveduras filamentadas devido à presença de butanol (adaptado de CECCATO-ANTONINI, 2008)

1.4 - SITUAÇÕES DE ESTRESSE EM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Durante a fermentação alcoólica as células de leveduras são submetidas a diversas condições de estresse e, desta maneira, precisam desenvolver mecanismos moleculares de resistência a estas situações adversas. Qualquer fator do meio que possa vir a produzir um efeito adverso sobre o crescimento celular é considerado uma condição de estresse e a sobrevivência celular depende da sua capacidade em se adaptar rapidamente às mudanças que ocorrem no meio de cultivo (IVORRA; PEREZ-ORTIN; OLMO, 1999).

As condições adversas que as células de leveduras enfrentam podem afetar as suas diferentes macromoléculas estruturais, tais como os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, cujas modificações estruturais afetam o funcionamento global das células (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004). Por outro lado, existem sistemas de respostas que envolvem a síntese rápida de moléculas de proteção e a ativação de cascatas

de sinalização celular que induz eventos secundários como o desencadeamento de atividades enzimáticas e a transcrição de genes que codificam para fatores de proteção. As diferentes habilidades que as leveduras apresentam de resistir às condições de estresse podem definir suas propriedades de fermentação, que podem servir de base para a escolha de critérios para seleção de leveduras melhoradas (IVORRA; PEREZ-ORTIN; OLMO, 1999; CARRASCO; QUEROL, 2001).

Durantes os ciclos sucessivos de bateladas alimentadas, as células da levedura *S. cerevisiae* são expostas aos estresses oxidativos - formação de radicais livres, alcoólico, hiperosmóticos - altas concentrações de açúcares (resultando em perdas da atividade de transporte e menor produção de etanol), elevação em acidez externa - causada pela respiração e excreção de ácidos, elevações da temperatura e limitações nutricionais.

O estresse nutricional também induz alterações na população de células e ocorre em células em fase estacionária, fase do tratamento e estocagens do fermento na indústria. Como o crescimento é sempre pequeno entre os ciclos de fermentação industrial com reutilização de células em fermentações de alta densidade celular, a maioria das suas células está em fase estacionária. Segundo D'Amore e Stewart (1987) o etanol produzido pela levedura pode reduzir a multiplicação e a viabilidade da levedura.

Portanto a sobrevivência das células é dependente da sua capacidade de resistir as alterações das condições ambientais e responder a novas situações. As alterações das condições químicas ou físicas da célula que são negativas para o crescimento exigem uma resposta rápida por parte da célula. Os mecanismos moleculares que são induzidos são designados de resposta ao estresse imposto pelas várias condições adversas. Estas condições adversas podem ter diversas origens, como ilustrada na figura 6. Podem ser condições ambientais, como a temperatura de crescimento, a falta de substrato ou outro nutriente essencial ao crescimento, a presença de íons metálicos, de oxidantes químicos ou o aumento da pressão parcial ou total de oxigênio (MARGER; HONMANN, 1997 apud PINHEIRO, 2004).

MAGER, W. M., HOHMANN, S. Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. (Ed.). **Yeast stress responses**. Amsterdam: Springer, 1997.

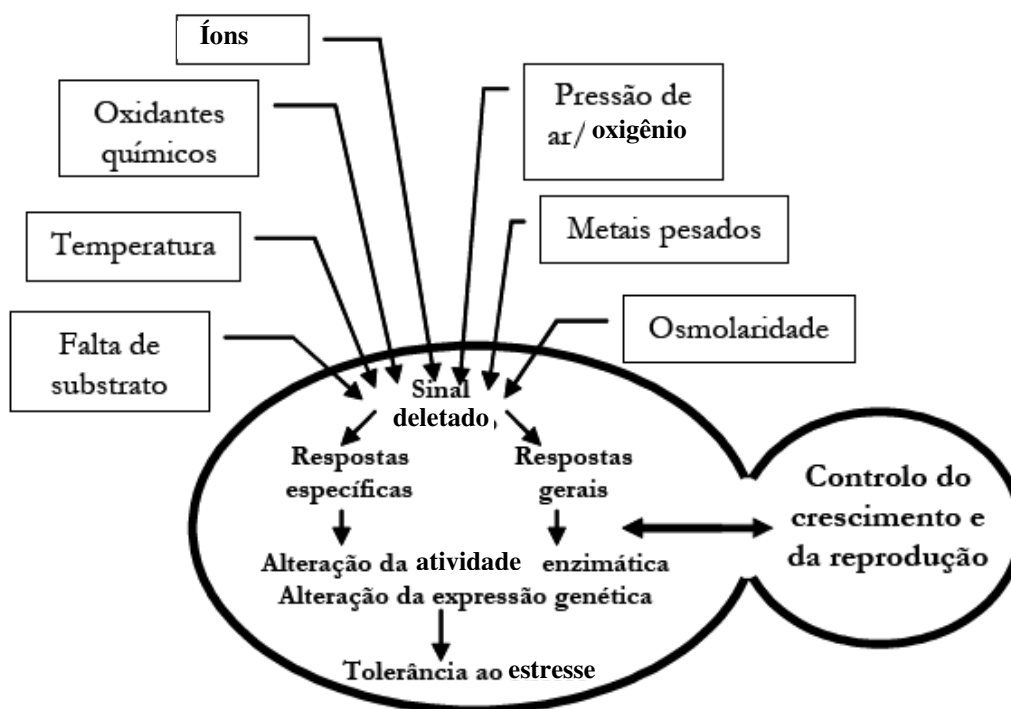


Figura 6 – A célula de levedura detecta os vários tipos de estresses e são desencadeadas respostas específicas e gerais a estas condições de estresse impostas à célula. Estas respostas resultam em alterações tanto ao nível enzimático como ao nível da expressão genética e levam à aquisição de tolerância ao estresse imposto. O controle do estresse tem um papel fundamental na regulação do crescimento celular (MARGER; HONMANN, 1997 apud PINHEIRO, 2004).

1.4.1 - Estresse térmico

A temperatura ótima varia entre as leveduras, sendo que as leveduras termofílicas apresentam temperaturas ótimas de crescimento acima de 40°C (WALKER, 1998). Termotolerância pode ser definida como a capacidade transitória das células sobreviverem quando expostas a temperaturas elevadas. Alguns fatores capazes de afetar a termotolerância das leveduras são: etanol e outros agentes químicos, pressão osmótica, valores baixos de pH externo, fase do crescimento, aquisição de resistência na fase estacionária e falta de nutrientes no estado de jejum (PIPER, 1993). Um crescimento rápido em meio rico contendo glicose, torna as células mais sensíveis ao calor e a outros tipos de estresse, que as células que deixaram de crescer ao atingirem a fase estacionária (WALKER, 1998). Isto pode ser devido ao efeito da repressão pela glicose sobre a síntese de proteínas (por exemplo, proteínas de choque térmico) envolvidas com os sistemas celulares de reparo.

As respostas ao estresse térmico em leveduras são bem estudadas. Um aumento de 10 a 15°C acima da temperatura ótima de crescimento induz a síntese de um grupo de proteínas chamado HSP (*Heat Shock Proteins*).

1.4.2 - Estresse etanólico

Do ponto de vista fisiológico, o etanol inibe o crescimento e a viabilidade das leveduras por atuar negativamente sobre os diferentes sistemas de transportes (incluindo permeases de aminoácidos), sobre a sinalização celular da glicose e a atividade de enzimas chaves da via glicolítica (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998; BISSON, 1999).

O etanol parece alterar o grau de polaridade da membrana celular citoplasmática, causando interrupção do crescimento em concentrações elevadas (LYND et al., 1991) e, ainda, aumentando a fluidez da membrana (LLOYD et al., 1993). Concentrações elevadas de ácidos graxos insaturados na membrana, vitaminas e proteínas parecem aumentar a tolerância ao etanol. Outros fatores fisiológicos, tais como, composição do meio, acúmulo intracelular de etanol, temperatura e pressão osmótica podem contribuir para a elevação da tolerância ao etanol (D'AMORE; STEWART, 1987). A ação da trealose consiste em estabilizar a membrana e proteger as células das leveduras frente aos efeitos do etanol. Assim, a concentração intracelular elevada deste dissacarídeo tem desempenhado um importante papel sobre capacidade da célula em tolerar elevadas concentrações de etanol (WALKER, 1998).

1.4.3 - Estresse osmótico

Uma condição de estresse osmótico se define como uma diminuição do potencial hídrico do ambiente no qual se está desenvolvendo um organismo. A resposta imediata consiste na saída de água intracelular, seguida de um processo adaptativo, que requer muito tempo para que o equilíbrio osmótico de células seja atingido. Devido ao movimento da água, as concentrações intracelulares de íons e biomoléculas aumentam dando como resultado uma diminuição na atividade celular, uma vez que o organismo se adaptou, ele volta a crescer (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004). A proliferação celular se altera após um período de adaptação no qual varia dependendo de um número de fatores, como por exemplo, o tipo e a intensidade do estresse, a genética da linhagem e sua fase de crescimento (BLOMBERG, 2000).

As linhagens de leveduras normalmente utilizadas nos processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada. Por esta razão, fermentações alcoólicas são conduzidas em concentrações de açúcar usualmente 20% (m.v⁻¹), devido o álcool ser fator

limitante. Concentrações elevadas de açúcar resultam em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos etanol, cujo, principais alvos são as membranas celulares (SALMON; MURICO, 1994).

A tolerância das linhagens de leveduras ao estresse osmótico e temperaturas elevadas pode aumentar através do aumento da concentração de peptona e extrato de levedura no meio (STEWART et al., 1988). Thomas, Hynes e Ingledew (1994) estudaram os efeitos de substâncias osmoprotetoras sobre a fermentação de uma linhagem de cervejaria (*S. cerevisiae*), usando uma concentração muito elevada de glicose (35%, m.v⁻¹), e mostraram que quando o meio é suplementado por glicina betaína, glicina e prolina, ocorre um aumento na quantidade de açúcar fermentado.

1.5 – TIPOS DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL

O processo fermentativo se inicia logo que a levedura entra em contato com o mosto, sendo dividido em três fases: fase preliminar ou pré-fermentação, caracterizada pela adaptação das leveduras e multiplicação celular; fase de fermentação principal e tumultuosa, com desprendimento abundante de gás e produção de álcool e fase de fermentação complementar ou pós fermentação, onde se observa redução da atividade fermentativa (SHIMIDELL et al., 2001).

O etanol pode ser produzido por quatro principais tipos de operações industriais: batelada simples, batelada alimentada, semicontínua e contínua.

a) Processo de fermentação em batelada simples, o substrato e a cultura de leveduras são adicionados juntos com outros nutrientes ao reator. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado ao reator, exceto oxigênio (em processos aeróbicos), anti-espumante, e ácido ou base para controle do pH. A maioria do etanol atualmente é produzido pelo processo de batelada simples e batelada alimentada, pois os custos com investimentos são mais baixo, não requerem muito controle e pode ser acompanhados por técnicos sem maiores conhecimentos sobre o processo. Porém a fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez, no início da fermentação, exerce efeitos de inibição, repressão metabólica, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessa (SHIMIDELL et al., 2001).

b) Processo de fermentação em batelada alimentada - é definido como um processo, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo sendo que os produtos permanecem no meio até o final da fermentação. Neste processo, a solução de nutrientes é adicionada em intervalos constantes, enquanto que o fermentado é removido da dorna apenas no final do processo. A principal vantagem do processo de batelada alimentada está relacionada com a repressão catabólica que é suprimida ou diminuída pela alimentação intermitente do substrato. Apesar de o substrato exercer um efeito inibitório, as suas adições intermitentes melhoram a produtividade da fermentação pela manutenção de uma baixa concentração de substrato durante o processo. É essencial manter a cultura em volume constante no processo contínuo, sendo que variações no volume do processo ocorrem em batelada alimentada (SHIMIDELL et al., 2001).

Objetivos almejados ao se empregar as fermentações descontínuas alimentadas: a) minimização dos efeitos negativos da sacarose sobre o controle do metabolismo celular; b) prevenção da inibição por substrato ou precursores; c) minimização da formação de produtos tóxicos do metabolismo; d) superação de problemas frequentes de estabilidade em processo contínuo; e) adequação do processo fermentativo a condições operacionais; e f) estudo de cinética de processos fermentativos (SHIMIDELL et al., 2001).

c) Processo de fermentação sucessivas em batelada alimentadas - a literatura descreve poucos trabalhos relacionados com a produção de etanol em sistemas com reciclagem de células (DAMIANO; WANG, 1985; MORIMURA; LING; KIDA, 1997; PERES; SOUZA; LALUCE, 2001; LALUCE et al., 2002). Uma fermentação com reciclo de células consiste em uma fermentação que se reutiliza sucessivamente as células de levedura através do processo de separação ou adição de células. Neste tipo de fermentação, as células podem ser recolhidas em sistemas de retenção celular (por ex.: centrifugação, micro-centrifugação, sedimentação) (GROOT et al., 1992).

Nas usinas de produção de etanol, células de leveduras são expostas a diversos tipos de estresses, principalmente em sistemas de reciclagens ou reutilização de células. Este tipo de fermentação é realizado para reduzir os custos na produção industrial de etanol a partir de da cana. Para isto, aumentos no rendimento e produtividade de etanol, reduções em resfriamento das dornas e custos com a destilação, bem como no volume de vinhaça são necessários (SHIMIDELL et al., 2001).

d) Processo de fermentação semi-contínuo, uma porção da cultura é coletada em intervalos de tempos enquanto meio fresco é adicionado ao sistema. Nos processos semi-contínuos há variações no volume da cultura. Este método tem algumas vantagens sobre as operações contínuas e de batelada, como: a) possibilidade de operar o fermentador por longos períodos sem que seja necessário preparar um novo inóculo; b) possibilidade de aumentar a produtividade do reator apenas modificando-se o cronograma de trabalho; c) possibilidade de, uma vez conhecida as melhores condições de operação, conseguir produtividade significativamente maior do que a obtida em processo descontínuo.

No entanto, há um alto risco de contaminação e mutação devido aos longos períodos de cultivos e as operações manuais. Além disso, são necessários reatores de volumes maiores e estes custos de investimento são mais elevados (SHIMIDELL et al., 2001).

e) Processo de fermentação contínuo, o meio nutriente mais o inóculo são injetados de forma contínua nos reatores, com a saída da mesma quantidade de meio fermentado. Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada alimentada de forma intermitente, pois a otimização da alimentação pode levar a uma maior produtividade, com redução dos custos laboratoriais, uma vez que reduz o tempo ocioso e também evita o gasto de tempo com limpeza e sanitização das dornas. Neste processo tem-se a manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o este processo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou ainda, para estudos de otimização da composição de meio de cultura. A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana, exigem um conhecimento maior quanto à otimização das condições do processo para que o rendimento desejado seja atingido, especialmente, quanto à adição de produtos químicos, alterações da taxa de fluxo e a mistura dos nutrientes, ou alterações nos parâmetros estimados, além de existir uma maior possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas, resultando na seleção de mutantes menos produtivos (SHIMIDELL et al., 2001).

O produto, que é retirado no topo no bioreator, contém etanol, células e açúcar residual. O processo de fermentação contínua normalmente tem início em um processo descontínuo (carrega-se inicialmente o reator com meio de cultura, procede-se à inoculação com o microrganismo responsável pela conversão, sendo que, após algum período de operação descontínua, inicia-se a alimentação de meio de cultura e retirada de caldo, dando-se início efetivamente ao processo contínuo). Em processo contínuo, a alimentação pelo

substrato é feita pelo bombeamento contínuo para dentro de um frasco agitado onde os microrganismos estão em estado ativado (SHIMIDELL et al., 2001).

Os processos de fermentação etanólica mais utilizados no Brasil são os de batelada alimentada de forma descontínua ou intermitente e a alimentada de forma contínua. O processo de batelada alimentada surgiu inicialmente na fabricação industrial de fermento para a panificação, no início do século XIX. Segundo ALMEIDA (1940 apud DORTA, 2006), em tal processo há a alimentação contínua do mosto na dorna de fermentação e ao final do processo as células são separadas por centrifugação. A condução pelo processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibitório do álcool, durante a fase inicial, resultando em maior concentração de etanol em um mesmo período de tempo quando comparada com a batelada convencional (não alimentada). Segundo LALUCE (1991), grande parte das usinas brasileiras trabalha com o processo de batelada alimentada com o reciclo do fermento, o qual é tratado com ácido sulfúrico antes de retornar para as dornas fermentativas. O mosto é, assim, adicionado lentamente durante 6-8 horas, sendo que em 8-12 horas chega-se ao final do processo.

1.5.1 – Mecanismos de regulação da fermentação alcoólica

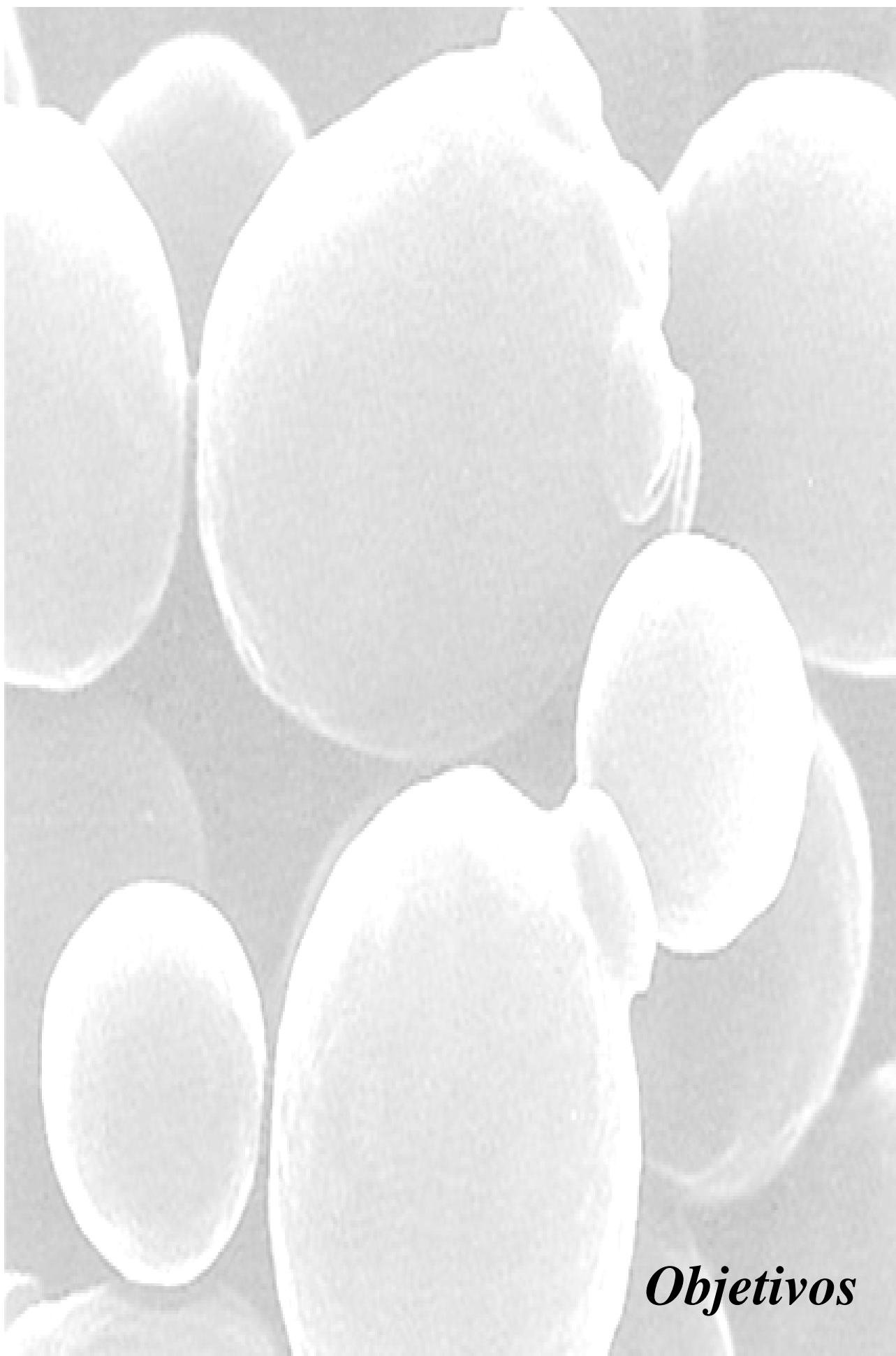
A regulação da fermentação e da respiração é controlada pelas condições ambientais, como por exemplo, a ausência ou presença de oxigênio, e o tipo e a concentração de substrato. Os principais efeitos do catabolismo da glicose sobre o efeito do metabolismo são: efeito *Pasteur* e efeito *Crabtree* (PINHEIRO, 2004).

- **Efeito de *Pasteur*** – consiste na indução da respiração pelo oxigênio, com a concomitante diminuição da atividade fermentativa das células. Contudo, este fenômeno só pode ser observado em pequenas concentrações de glicose, ou seja, menos de 5 mM, em culturas da levedura *S. cerevisiae*.

- **Efeito de *Crabtree*** - pode ser definido como a ocorrência de fermentação alcoólica em condições aeróbicas, na presença de excesso de glicose.

Repressão Catabólica - ocorre quando a glicose ou outros produtos do metabolismo da glicose reprimem várias enzimas da cadeia respiratórias e da gliconeogênese. A inativação catabólica resulta no rápido desaparecimento de tais enzimas com a adição de glicose. Na repressão catabólica certas atividades enzimáticas das vias metabólicas tornam-se menor com o crescimento celular devido ao maior consumo de glicose (WALKER, 1998).

ALMEIDA, J. R. **Álcool e destilaria**. Piracicaba: Nathanael dos Santos. 1940. v. 5, p. 55-85. Mimeografado.



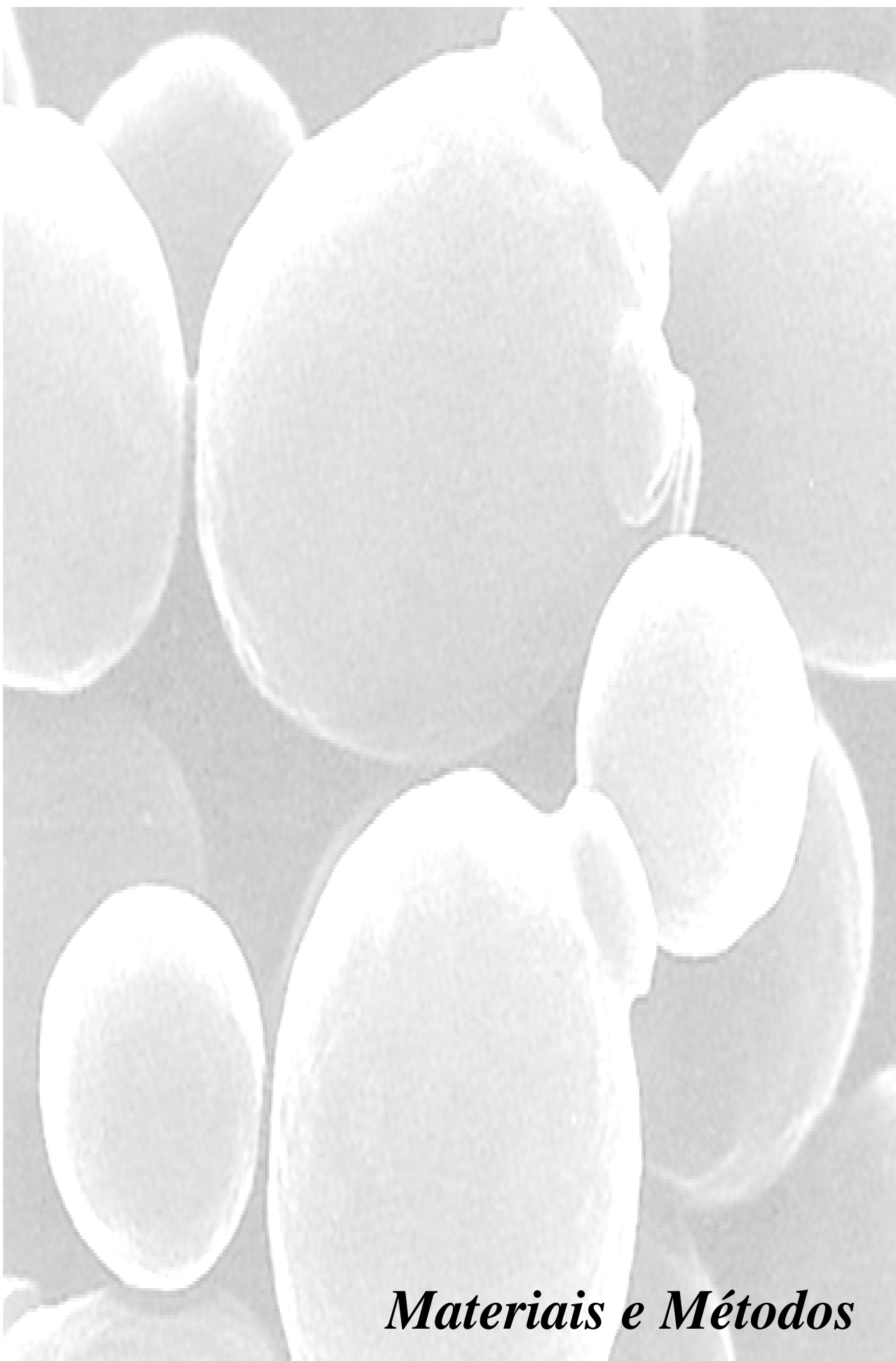
Objetivos

Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho consistiu em padronizar condições para realização de fermentações sucessivas da nova levedura linhagem IQAr/45-1 com utilização de meio sintético e densidade de células mais altas que as usadas em destilaria.

As seguintes etapas foram necessárias para realização de ciclos sucessivos de fermentação em meio sintético:

- a)** estabelecimento de condições para fermentação de altas concentrações de sacarose em meio sintético, utilizando altas densidades de células;
- b)** estratégias de controle do pH durante o processo de fermentação em batelada alimentada;
- c)** estabelecimento de um meio de ativação da viabilidade e da biomassa do leite de levedura entre um ciclo e outro de fermentação;
- d)** efeito da concentração de sacarose em ciclos sucessivos de fermentação;
- e)** comparação das leveduras BG1 (industrial) e a levedura IQAr/45-1 em ciclos sucessivos de fermentação a 34°C;
- f)** fermentação da levedura IQAr/45-1 a 37°C
- f)** procura de deficiências nutricionais no meio mínimo para fermentações com alta densidade de células, visando dispensar o tratamento de ativação do leite de levedura entre os ciclos;



Materiais e Métodos

3.1 – LEVEDURAS

Linhagem BG1 gentilmente cedida pela Zilor Engenharia de Alimentos, Macatuba-SP e a linhagem IQAr/45-1 contendo marcas genéticas cujo pedido de patente foi encaminhado em setembro de 2008, e ainda se encontra em fase de sigilo. As culturas destas leveduras foram estocadas a 4°C em meio YPD solidificado e transferidas a cada 4 meses para meio fresco. Culturas frescas destas leveduras foram utilizadas para realizar os experimentos.

****Meio YPD** (SHERMAN; HICKS, 1999) - Os constituintes do meio líquido YPD foram: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose (todos em %, p.v⁻¹). Este meio foi solidificado com Agar 2%.

3.2 – TÉCNICAS DE CULTIVO (SOUZA et al., 2007)

3.2.1 – Meio usado na fermentação - O meio sintético descrito por Thomas, Hynes, Ingledew (1998) foi utilizado com uma modificação na elevação da concentração de sacarose que substituiu a glicose como fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado a 4,5 antes da esterilização. A composição deste meio sintético (MS) descrito por Thomas, Hynes, Ingledew (1998) desprovido da glicose foi a seguinte: 10 mM de (NH₄)₂SO₄; 0,86 mM de K₂HPO₄; 6,25 mM de KH₂PO₄; 2,03 mM de MgSO₄, 0,68 mM de CaCl₂; 1,7 mM de NaCl; 100 µM de ZnSO₄; 24,0 µM de H₃BO₃, 1,8 µM de KI; 20 µM de MnSO₄; 10,0 µM de CuSO₄; 1,5 µM de Na₂MoO₄; 1,5 µM de CoCl₂; 1,23 µM de FeCl₃. As concentrações das vitaminas no meio final foram: 20 µg.L⁻¹ de biotina, 2,0 mg.L⁻¹ de pantotenato de cálcio, 20 µg.L⁻¹ de ácido fólico, 10 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 400 µg.L⁻¹ de niacina, 200 µg.L⁻¹ de ácido *p*-aminobenzóico, 400 µg.L⁻¹ de cloreto de piridoxina, 200 µg.L⁻¹ de riboflavina e 200 µg.L⁻¹ de cloreto de tiamina. A concentração final de ergosterol foi 0,004% e de Tween 80 foi de 0,4% no meio.

O meio sintético (MS) usado no presente trabalho foi preparado misturando-se várias soluções contendo diferentes componentes do meio, agrupados com base em sua solubilidade, assim as soluções estoques concentradas para prepara 100 mL de meio estão descritas na **tabela 2**.

Tabela 2 - Composição das soluções estoque utilizadas no preparo do meio sintético descrito por Thomas, Hynes, Ingledew (1998).

Soluções estoques	V/100mL(mL) ^a	Composição (g.L ⁻¹)	Esterilização
Solução A	25	150 g.L ⁻¹ a 800 g.L ⁻¹ de sacarose	Autoclave, (121°C, 20 min)
Solução B	49	1,32 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,85 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ ; 0,15 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ ; 0,5 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 g.L ⁻¹ de CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,1 g.L ⁻¹ de NaCl a pH 5,0	Autoclave, (121°C, 20 min)
Solução C ou Solução de sais	0,1	5,12 g.L ⁻¹ de ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,148 g.L ⁻¹ de H ₃ BO ₃ ; 0,03 g.L ⁻¹ de KI; 0,378 g.L ⁻¹ de MnSO ₄ .H ₂ O; 0,391 g.L ⁻¹ de CuSO ₄ .5H ₂ O; 0,043 g.L ⁻¹ de Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,054 g.L ⁻¹ de CoCl ₂ .6H ₂ O; 0,055 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ .6H ₂ O a pH 2,0	Autoclave, (121°C, 20 min)
Solução D ou Solução de vitaminas	0,1	0,01 g.L ⁻¹ de biotina, 1,0 g.L ⁻¹ de pantotenato de cálcio, 0,01 g.L ⁻¹ de ácido fólico, 5,0 g.L ⁻¹ de myo-inositol, 0,2 g.L ⁻¹ de niacina, 1,0 g.L ⁻¹ de ácido p-aminobenzóico, 0,2 g.L ⁻¹ de cloreto de piridoxina, 0,1 g.L ⁻¹ de riboflavina e 0,1 g.L ⁻¹ de cloreto de tiamina. Dissolução completa do componentes a 60°C, pH 7,0.	Filtração em membrana GSWP 02500 da Milipore
Solução E	0,8	5 g.L ⁻¹ de ergosterol dissolvido em etanol absoluto e Tween 80 (50%, v.v ⁻¹),	-

^a O volume final do meio foi completado para 100 mL, com 25 mL de suspensão de células ou leite de levedura

3.2.2 – Propagação do inóculo e obtenção do leite de levedura – O inóculo foi propagado no meio descrito acima, mas acrescido de 20 g.L⁻¹ de extrato de levedura. A concentração final de sacarose no meio final foi de 100 g.L⁻¹. A propagação de inóculo foi realizada por 12 horas a 30°C em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de propagação sob agitação (125 rpm). A concentração inicial de células na inoculação foi de 0,85 g.L⁻¹ (células frescas previamente crescidas por 12-16 horas, 125 rpm e 30°C em meio YPD contendo 1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% de glicose). Após propagação, as células de levedura foram coletadas por centrifugação por 1 minuto (5000 x g), em seguida, foram lavadas duas vezes com água deionizada estéril; e as células lavadas foram re-suspensas em água deionizada estéril para formar uma suspensão concentrada de células (168 g.L⁻¹, massa seca) ou leite de leveduras para ser utilizada como inóculo das fermentações.

3.2.3 – Ativação do leite de levedura entre um ciclo de fermentação e o seguinte - Células do leite de levedura foram coletadas por centrifugação e lavadas por duas vezes em água deionizada estéril e re-suspensas (2,5% em gramas de massa seca) em solução contendo 100 g.L^{-1} de sacarose e 10 g.L^{-1} de extrato de levedura a pH 4,0, formando um volume final de 132 mL (solução + células). A suspensão foi ativada durante uma incubação agitada (125 rpm) a 30°C por 15 horas.

3.2.4 – Sistema de fermentação - O sistema usado foi construído pela Marconi, S.A, Piracicaba, Brasil, modelo MA5002/4/200. O sistema é composto por 4 mini-reatores de 200 mL para um volume de trabalho de 100 mL, equipados com dispositivos independentes para ajuste do pH (adição básica), agitador magnético ($\cong 100 \text{ rpm}$), e amostradores que podem ser operados independentemente e simultaneamente. Temperaturas foram controladas por água proveniente de um banho-maria termostático. Uma coluna de resfriamento foi ligada a cada mini-reator e refrigerada por água circulante a 4°C.

3.2.4.1 – Estratégias aplicadas ao processo de fermentações em batelada simples agitadas em Erlenmeyers – A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 40 mL de meio sintético a pH 4,5, 24,6 mL de solução de sacarose concentrada (200 g.L^{-1} em relação ao volume final de trabalho) e 15,4 mL de células (168 g.L^{-1}). O meio foi inoculado com a suspensão de células concentradas para que a concentração máxima inicial de células fosse mantida ao redor de 33 g.L^{-1} (massa seca, equivalente a 12,5% v.v⁻¹ de massa úmida) nos diversos experimentos. O volume final do meio no Erlenmeyer foi de 70 mL. A temperatura das fermentações foi de 34°C em culturas agitadas (125 rpm). Os intervalos de tempo entre as amostragens variaram com o experimento, ou seja, as amostragem foram realizadas a cada 2 ou 3 horas por períodos de fermentação de 8 a 12 horas.

3.2.4.2 – Estratégias aplicadas ao processo de fermentação em batelada simples em mini-reatores – Um volume de 50 mL de meio sintético sem sacarose foi adicionado inicialmente ao mini-reator, 19,2 mL de uma suspensão de células (168 g.L^{-1}) e 30,8 mL de solução de sacarose (650 g.L^{-1}), totalizando uma concentração de 200 g.L^{-1} de sacarose em relação ao volume final de trabalho. A temperatura do experimento de batelada simples foi de 34°C com o pH ajustado para 4,5 ($\sim 0,1 \text{ mL}$ de NaOH $2,4 \text{ mol.L}^{-1}$) após a adição da sacarose. O volume final do meio no mini-reator foi de 100 mL e a quantidade de células adicionadas foi de 33 g.L^{-1} . Amostras (aproximadamente 0,5 mL) foram retiradas dos mini-reatores em diferentes tempos em intervalos de 2 horas por períodos de 8 a 12 horas.

3.2.4.3 – Estratégias aplicadas ao processo de fermentação em bateladas alimentada por pulso de sacarose em mini-reatores – Os reatores contendo 50 mL de meio sintético (2 vezes concentrado) exceto sacarose e um volume de 19,7 mL leite de levedura contendo 3,3 g de células (ou 4,7% em massa seca, p.v⁻¹ e 19,8% em v.v⁻¹) no reator antes da alimentação sem a presença de açúcar que foi adicionada por pulsos decrescentes de solução concentrada de sacarose utilizando-se três estratégias diferentes: **a)** adição de 5 pulsos de volumes decrescentes (10mL, 6 mL, 4 mL, 3 mL e 2 mL) de uma solução concentrada de sacarose (800 g.L⁻¹) totalizando um tempo de alimentação de 2 horas com adições a cada de 30 minutos (partindo do tempo zero) como mostra a **figura 7 (parte A)** tal que uma quantidade de açúcar adicionada no final da alimentação foi de 200 g.L⁻¹, e com reajuste de pH apenas após o primeiro pulso; **b)** adição de 5 pulsos de volumes decrescentes (12,3 mL – 7,4 mL – 4,9 mL – 3,7 mL e 2,5 mL) de uma solução concentrada de sacarose (650 g.L⁻¹) totalizando um tempo de alimentação de 4 horas com adições a cada de 60 minutos (partindo do tempo zero) como mostra a **figura 7 (parte B)**, tal que uma quantidade de açúcar adicionada no final da alimentação foi de 200 g.L⁻¹, e com reajuste de pH apenas após o primeiro pulso; **c)** como descrito para a estratégia anterior “b”, porém com pH reajustado a cada pulso de sacarose. O volume total de meio no reator após a fase de alimentação foi de 100 mL e a temperatura foi 34°C e 37°C dependendo do experimento. Após o período de alimentação a fermentação foi prolongada por 5 a 8 horas até o consumo total do açúcar. O pH do meio foi reajustado para 4,5 (adição de aproximadamente 0,5 mL de NaOH 2,4 mol.L⁻¹) após cada pulso de solução de sacaroses, de acordo com o experimento realizado. Amostras de aproximadamente 0,5 mL foram retiradas dos mini-reatores a cada 30 minutos ou a cada 1 hora até o final do experimento, levando a uma redução do volume do meio de 4,5% a 6% (v.v⁻¹).

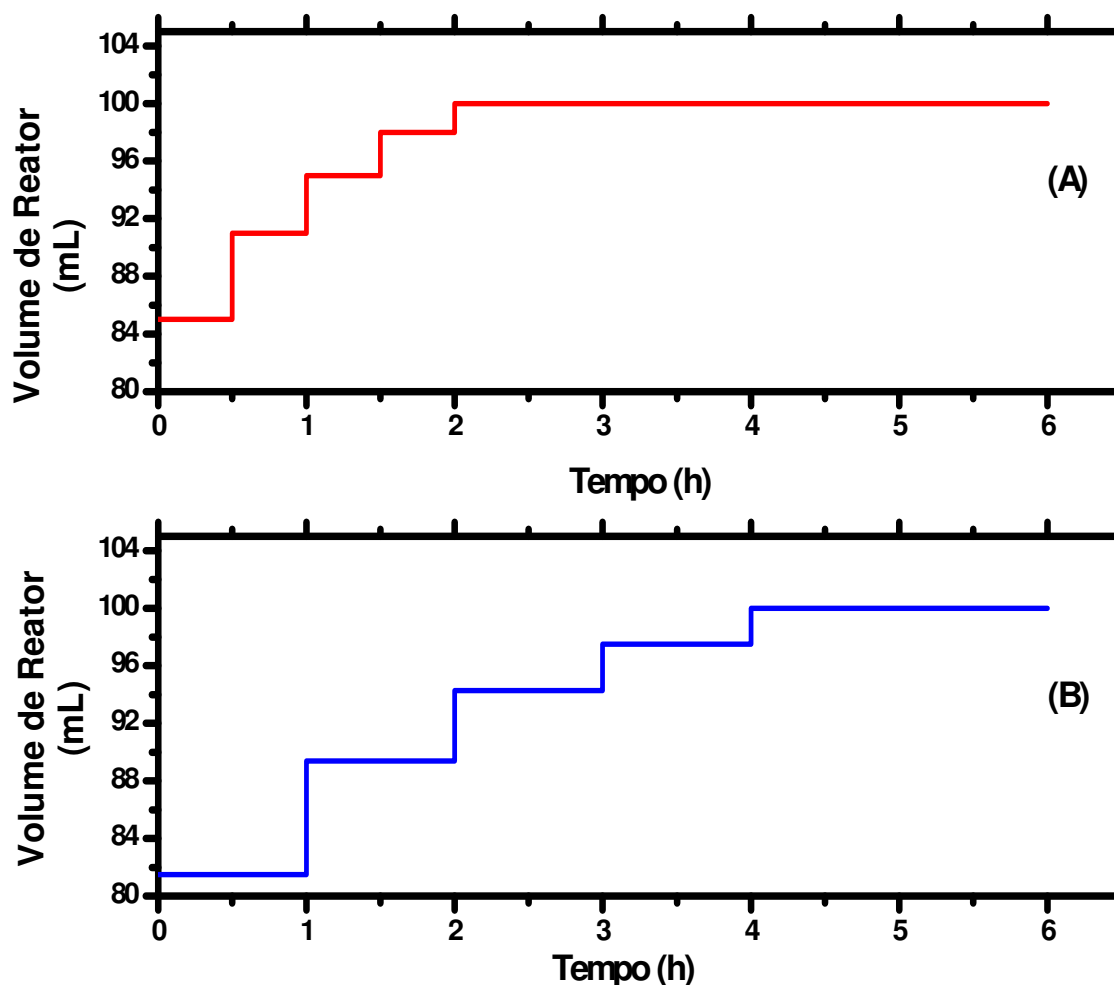


Figura 7 – Variação do volume nos reatores em função do tempo de alimentação com solução concentrada de sacarose: adição de 5 pulsos de volumes decrescentes (10mL no tempo zero, 6 mL, 4 mL, 3 mL e 2 mL) de uma solução concentrada de sacarose (800 g.L^{-1}) totalizando um tempo de alimentação de 2 horas (parte A); adição de 5 pulsos de volumes decrescentes (12,3 mL no tempo zero, 7,4 mL – 4,9 mL – 3,7 mL e 2,5 mL) de uma solução concentrada de sacarose (650 g.L^{-1}) totalizando um tempo de alimentação de 4 horas (Parte B).

3.2.5 – Determinação das variáveis dependentes do processo

Todas as medidas descritas abaixo foram feitas em duplicata e calculou-se a média e o desvio-padrão para cada uma destas medidas.

a) **Medida de biomassa:** a concentração de biomassa foi determinada por medidas de densidades óticas a 570 nm usando-se o espectrofotômetro (Marca BIOESPECTRO SP-22), as quais foram convertidas para massa seca de células ou $\text{mg}_{\text{célula}}/\text{mL} = A_{570\text{nm}} \times \text{diluição} \times$

fator de conversão de absorvância á 570nm em biomassa de 0,409. Fator (0,409) da curva de calibração (concentração de célula em $\text{g.L}^{-1} \times A_{570\text{nm}}$) ver **fig. 22 no Apêndice**. Os valores de biomassa foram calculados em relação ao volume de meio no fermentador, no instante da amostragem, e expressos em g.L^{-1} .

Fator de conversão de massa úmida de células (v.v^{-1}) de levedura para massa seca (p.v^{-1});

Um volume de 10 mL do leite de levedura concentrado (de concentração em massa seca conhecida) foi centrifugado por 5 minutos a 1300 x g. Em seguida anotou-se o volume de células úmidas, calculando a proporção de células de leveduras neste volume.

Fator de conversão de massa úmida para massa seca = 0,3797

b) Viabilidade celular: a viabilidade foi determinada pelo método de azul de metileno (**LEE et al., 1981**), através da contagem celular ao microscópio em câmara de Neubauer. A viabilidade foi obtida pela relação (em porcentagem) entre células viáveis e número total de células (vivas e mortas).

Reagente azul de metileno:

A composição do reagente azul metileno foi a seguinte: 10 g.L^{-1} de glicose; 0,42 g.L^{-1} de KCl; 0,48 g.L^{-1} de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g.L^{-1} de NaHCO_3 ; 9,0 g.L^{-1} de NaCl; 0,25 g.L^{-1} de azul de metileno; água deionizada.

Procedimento:

Utilizou-se 0,05 mL de suspensão de células ao qual foi adicionado 0,595 mL do reagente de azul de metileno. Após 5 minutos foram feitas as contagens das células.

c) Dosagem de etanol: a concentração do etanol foi determinada nos sobrenadantes das culturas separados por centrifugação a 1500 x g a 4°C, utilizando um cromatógrafo gasoso com um detector de ionização de chama (modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil).

d) Açúcar residual total (ART): o açúcar residual foi determinado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959) e expresso em ART (g.L^{-1} de açúcar redutor total) após a hidrólise da sacarose. Uma curva padrão foi obtida, com o uso do espectrofotômetro BIOESPECTRO Visível (SP-22), destinada a correlacionar a concentração de glicose e absorvância dos hidrolisados (fator de 0,063 ver **Fig. 23 no Apêndice**).

Curva padrão de açúcar redutor

Soluções:

- a) Reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (100 mL) contendo: 30 g de tartarato de sódio e potássio, 1,6 g de hidróxido de sódio e 1 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico.

Solução padrão de glicose 0,1%.

Solução de ácido clorídrico 6M.

Solução de hidróxido de sódio 2,4M.

A mistura de reação (1,0 mL) foi desenvolvida com a adição de 0,8 mL de amostra (solução de glicose ou sobrenadante de cultura) mais água destilada e 0,2 mL de solução de ácido clorídrico 6M em tubos de ensaio. Em seguida, estes tubos foram incubados a 60 °C durante 7 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de hidróxido de sódio 2,4 M. A reação colorimétrica ocorreu com a adição de 2,0 mL do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico, seguido por aquecimento a 100 °C durante 5 minutos em banho de água fervente. As leituras foram feitas no espectrofotômetro BIOESPECTRO SP22 a 546 nm. A curva padrão foi linear a concentração até 0,05% de glicose ou ART 0,05% o qual equivale a um ART de 0,5 g.L⁻¹ (g/ de ART= ΔA_{546nm} x diluição x fator da curva de glicose x 10). O fator de conversão (inverso da tangente desta curva) da medida de absorbância em concentração de açúcares redutores (**fator F**, na **Fig. 23 no Apêndice**) foi de 0,063. A concentração de açúcar foi calculada da seguinte forma:

$$[g.L^{-1}] = F \cdot \Delta A_{546nm} \cdot \text{diluição}$$

Onde ΔA_{546nm} = diferença da medida de absorbância entre os tubos contendo água (controle) e os tubos contendo as soluções padrão de sacarose, em concentrações variadas, medidas a 546 nm.

e) **Proteína Total:** A proteína total foi determinada pelo método do Biureto (ROBYT; WHITE, 1987), onde os valores foram calculados em relação ao volume total do fermentador e expressos em mg_{proteína}.mg_{células}⁻¹ (ver curva padrão na **Fig. 24 no Apêndice**).

O processo de extração da proteína total foi realizado com uma quantidade de 100 mg (massa seca) de células de levedura que foram re-suspensas em 1,0 mL de solução tampão de extração Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2 e adicionados em um tubo de vidro com parede espessa de 5 mL contendo 1,0 g de micro-esferas de vidro (0,05mm de diâmetro) a 4 °C. Em seguida, os tubos foram congelados a -20 °C. As células foram rompidas em um agitador de tubos (Marca VELP, modelo Zx³) durante 4 ciclos de agitação de 30 segundos e permanência em banho de gelo por 30 segundos nos intervalos entre as agitações. As micro-esferas de vidro e as células

foram separadas por centrifugação rapidamente em Eppendorf a 12000 x g por 3 minuto a 4 °C. Em seguida, as proteínas coaguladas foram separadas por centrifugação rapidamente em Eppendorf a 12000 x g por 5 minuto a 4 °C.

O reagente do Biureto foi preparado da seguinte maneira: 0,3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,9 g de tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 50 mL de NaOH 0,2M contendo 0,5 g de KI. O volume do reagente foi completado para 100 mL.

A mistura da reação foi a seguinte: 2,0 mL de amostra mais 3,0 mL do reagente de Biureto. A mistura da reação foi incubada por 10 minuto a 37 °C. As leituras de absorbância foram feitas a 540 nm e a solução de soroalbumina 1,0% foi utilizada como solução-padrão para a obtenção da curva analítica. O cálculo da concentração de proteína intracelular, expressa em $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$, foi o seguinte:

$$[\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}] = F \cdot \text{diluição} \cdot \Delta A_{540\text{nm}}$$

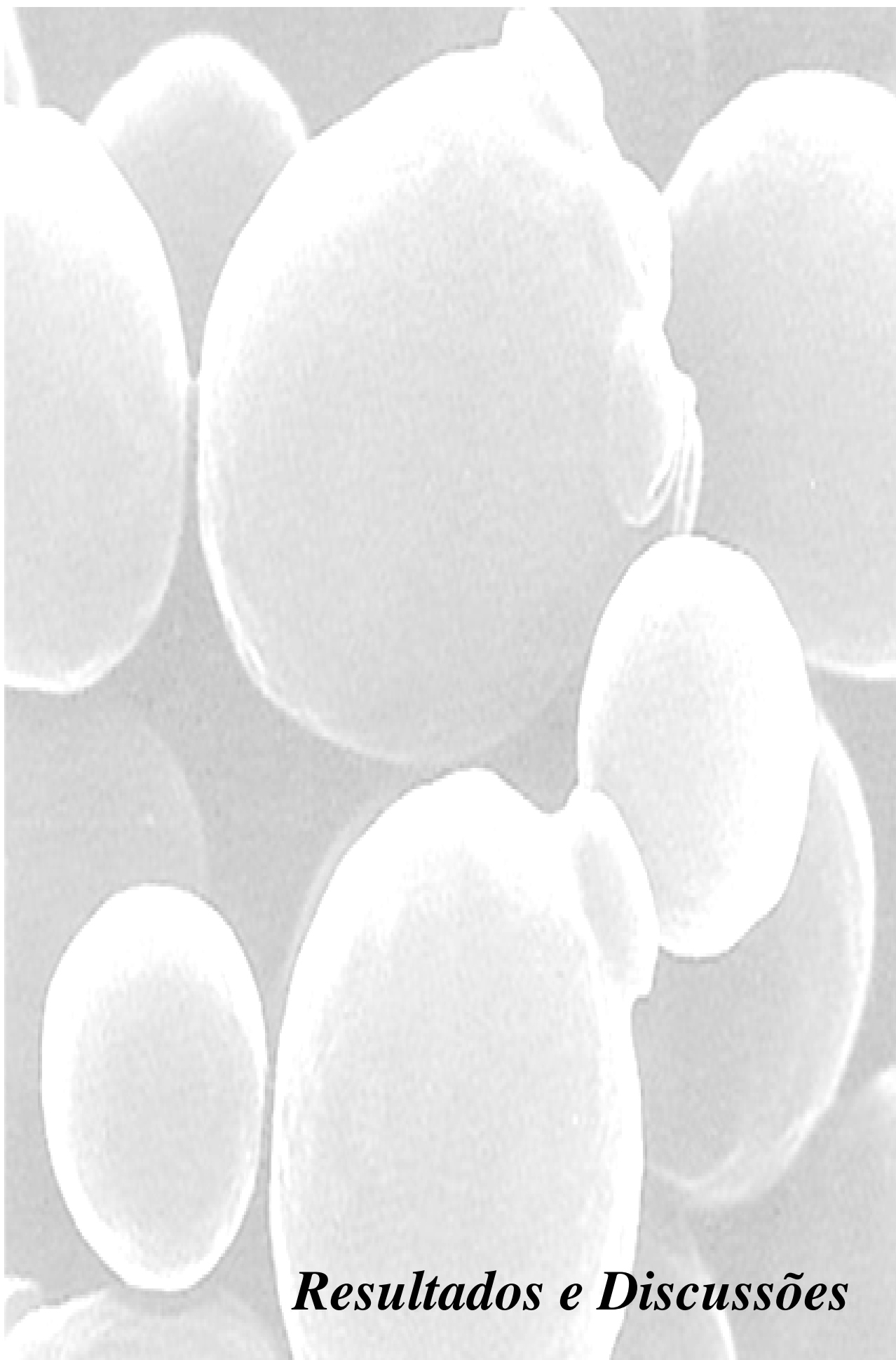
f) Trealose Intracelular em Leveduras (PERES et al., 2005): A glicose liberada durante a hidrólise da trealose foi determinada em sobrenadante livre de proteína usando-se o kit de glicose LaborLab (Lote: 418). Uma curva padrão (ver curva padrão **na Fig. 25 no Apêndice**) foi obtida, com o uso do espectrofotômetro FEMTO (modelo 382). Cada concentração de glicose na curva padrão representa o valor da glicose obtida com o uso do kit enzimático multiplicado por dois (cada mol de trealose é desdobrado em 2 mols de glicose durante a ação da trealose).

O processo de extração foi realizado da mesma maneira que para a medida de proteína total, como descrito acima, mas usando-se solução tampão acetato de sódio (contendo 30 mM de CaCl_2) 0,1 M a pH 5,5 ao invés do tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2.

O sobrenadante foi ensaiado usando o kit enzimático (CAT no. 02200) da LaborLab, Guarulhos, SP. A mistura da reação para hidrólise da trealose foi a seguinte: 40 μL de tampão acetato de sódio (contendo 30 mM de CaCl_2) 0,1 M a pH 5,5, 40 μL de extrato de extrato celular, 10,4 μL da enzima comercial trealase da Sigma (Lote: 62H8075) 0,5 U/mL. A mistura foi incubada por 60 minuto a 50 °C. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição dos tubos em banho de água fervente por 5 min. Imediatamente, os tubos foram colocados em banho de gelo. As proteínas coaguladas foram separadas por centrifugação (em centrífuga Sorval, modelo Legend LACH 1.6R) em Eppendorf a 12000 x g por 3 minutos. A glicose liberada durante a hidrólise da trealose foi determinada em sobrenadante livre de proteína usando-se o kit de glicose (LaborLab): 3 mL do reagente de cor acrescido de 30 μL do sobrenadante das células rompidas. Os tubos foram incubados por 10 minuto a 37 °C e a

medida de absorbância foi monitorada a 525 nm. A quantidade de trealose foi expressa em $\text{mg}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$.

g) **Medidas de pH:** foi obtidas com o uso de um pHmetro digital da Marconi modelo MA PA200/P.



Resultados e Discussões

Os resultados foram apresentados divididos em tópicos que aparecem ao longo do texto a seguir.

4.1 – CONDIÇÕES PARA FERMENTAÇÃO EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE COM MEIO SINTÉTICO DE ALTA DENSIDADE CELULAR

4.1.1 – Efeito do tamanho do inoculo e da estratégia de alimentação

Utilizou-se quantidades diferentes de inóculo na faixa de 22,8 g.L⁻¹ a 34 g.L⁻¹ em relação ao volume final de meio, seguindo duas estratégias de alimentação: a estratégia baseada na adição de 5 pulsos decrescentes de alimentação em intervalos de 30 minutos, e outra estratégia na qual o intervalos foi de 60 minutos, sendo a mesma quantidade de açúcar adicionado em cada pulso nas duas estratégias. O reajuste de pH a 4,5 somente foi realizado após a adição do primeiro pulso de sacarose em ambas as estratégias. As condições do experimento controle resultaram de estudos preliminares não descritos no presente trabalho.

Tabela 3 - Variações em quantidade de inóculo e intervalo de tempo entre os pulsos de alimentação sobre as variáveis e parâmetros do processo durante as fermentações, adicionando-se um total de 200 g.L⁻¹ de sacarose, em relação ao volume final de meio com reajuste de pH somente após a adição do primeiro pulso.

Variáveis da fermentação	Inóculo (g.L ⁻¹) / Intervalo entre pulso (minutos)		
	34,6 / 30'	22,8 / 60'	30,3 / 60'
Tempo de fermentação (h)	6	8	7
PH_{inicial}	4,45	4,51	4,49
PH_{final}	3,95	3,45	3,67
Viabilidade_{inicial} (%)	97,0 ± 0,9	97,2 ± 0,7	98,2 ± 0,2
Viabilidade_{final} (%)	92,6 ± 1,3	86,8 ± 1,2	95,6 ± 0,0
Biomassa:			
Inicial (g.L⁻¹)	34,6 ± 0,7	22,8 ± 0,1	30,3 ± 0,7
Final (g.L⁻¹)	39,9 ± 0,4	25,9 ± 0,2	35,1 ± 1,3
Biomassa_{Final - Inicial} (g.L⁻¹)	5,3 ± 0,8	3,2 ± 0,2	4,8 ± 1,5
Acúmulo de biomassa (%)^b	15,2%	13,9%	16%
[Etanol]_{final} (g.L⁻¹)	96,2 ± 3,9	99,8 ± 1,7	96,7 ± 2,9
[ART]_{final} (g.L⁻¹)	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,1

Alimentação: 5 pulsos contendo a mesma quantidade de sacarose, porém de volumes maiores quando os intervalos de adição dos pulsos foram de 60 minutos, sendo as condições do experimento controle resultante de trabalhos preliminares. A quantia de fermento no reator antes da alimentação foi de 4,7% em massa seca (p.v⁻¹) ou 19,8% (v.v⁻¹)

^b**Acúmulo de Biomassa (%)**: (Final – Inicial)*100/Inicial

A **tabela 3** mostra o seguinte: a) aumento do tempo de fermentação com o aumento dos intervalos dos pulsos e diminuição do tamanho do inóculo; b) queda de pH no final da fermentação, ocorreu independente das condições utilizadas no processo, c) queda da viabilidade inicial (86,8 ± 1,2) com a menor quantidade de inóculo; d) tudo indica que o menor inóculo levou a queda em biomassa final independente do intervalo de adição dos pulsos; e) não houve variação com relação ao etanol final, e ao açúcar residual.

Parece que o aumento da velocidade de fermentação causou queda em viabilidade, apesar do aumento no tempo de fermentação em uma hora. Talvez o inóculo ainda deva ser mais baixo ou a quantidade de açúcar deva ser menor quando se usa um inóculo menor. As destilarias usam inóculos ao redor de 25-30% (v.v⁻¹), com uma concentração final de células

de 10% (v.v⁻¹). Como a quantidade de sacarose foi a mesma nos três experimentos, o etanol final foi semelhante mesmo quando um inóculo mais baixo foi utilizado. Nas publicações da literatura (THOMAS, HYNES, INGLEDEW, 1998) os meios sintéticos são inoculados com baixa densidade de células em estudos de crescimento. Assim, espera-se que o uso deste meio com altas densidades de células deva levar a certa deficiência nutricional. Deste modo, foi mantido um inóculo de 33 g.L⁻¹ e intervalos entre os pulsos de adição de sacarose de 60 minutos, durante a fermentação de uma quantidade de sacarose de 200 g.L⁻¹.

4.1.2 – Estratégias de controle do pH durante o processo de fermentação em batelada alimentada

Na **tabela 4**, os dois experimentos descritos diferem apenas quanto ao reajuste do pH.

Tabela 4- Comparação do efeito do reajuste do pH do meio apenas após a adição do primeiro pulso de sacarose (experimento controle) e após cada pulso de sacarose adicionado em intervalos de 60 minutos (total de 4 horas de alimentação) usando-se 33 g.L⁻¹ de inóculo

Variáveis da fermentação	Ajuste de pH	
	Apenas após 1º pulso	Após cada pulso
Tempo de fermentação (h)	7	6
pH _{inicial}	4,49	4,55
pH _{final}	3,67	4,56
Viabilidade _{inicial} (%)	98,2 ± 0,2	98,3 ± 0,0
Viabilidade _{final} (%)	95,6 ± 0,0	97,1 ± 0,3
Biomassa:		
Inicial (g.L ⁻¹)	30,3 ± 0,7	29,6 ± 0,3
Final (g.L ⁻¹)	35,1 ± 1,3	34,2 ± 1,4
Biomassa _{Final} – Inicial (g.L ⁻¹)	4,8 ± 1,5	4,6 ± 1,5
Acúmulo de biomassa (%) ^b	16%	15,5%
[Etanol] _{final} (g.L ⁻¹)	96,7 ± 2,9	100,1 ± 0,7
[ART] _{final} (g.L ⁻¹)	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,0

Alimentação: 5 pulsos contendo a mesma quantidade de sacarose, com intervalos de adição de pulsos de 60 minutos. A quantia de fermento no reator antes da alimentação foi de 4,7% em massa seca (p.v⁻¹) ou 19,8% (v.v⁻¹)

^bAcúmulo de Biomassa (%): (Final – Inicial)*100/Inicial

Os dados descritos na **tabela 4** comprovam a necessidade do ajuste do pH logo após a adição de cada pulso de sacarose em fermentações a 34°C. O pH foi mantido ao redor de 4,5 até o final da fermentação quando o pH foi reajustado após a adição de cada pulso de sacarose. Quando o pH foi ajustado somente apenas após o primeiro pulso de sacarose, houve uma queda do pH durante a fermentação (de 4,49 para 3,67), sendo que esta variação reduziu o tempo de fermentação em uma hora, sem nenhum ganho em relação aos outros parâmetros fermentativos. Valores finais do etanol produzido, viabilidade e biomassa não foram afetados.

4.2 – ESTABELECIMENTO DE UM MEIO DE ATIVAÇÃO DA BIOMASSA A SER USADO ENTRE CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO

Em experimentos prévios de fermentação em batelada alimentada por pulsos de sacarose (200 g.L⁻¹ e uma quantidade de inóculo de 33 g.L⁻¹ em relação ao volume final de meio no reator) realizados a 34°C, foram observados grandes perdas em viabilidade e biomassa entre um ciclo e outro de fermentação (dados não mostrados). Na verdade, não foi possível realizar mais que 4 ciclos de fermentação consecutivos, devido as baixas viabilidades. Por este motivo, houve a necessidade de procurar uma forma de reativar as células de levedura antes do início do próximo ciclo de fermentação.

Para obtenção do leite de levedura a ser reativado, dois ciclos de fermentação (200 g.L⁻¹ de sacarose e 33 g.L⁻¹ de células em relação ao volume final do meio) foram realizados a 34°C e a seguir as células foram submetidas à reativação por incubação em diferentes meios, no final dos quais mediu-se as variações em biomassa e viabilidade. As células coletadas foram submetidas a condições diferentes de incubação (células suspensas em água pura, e diferentes meios) com intervalos de 4 à 15 horas entre um ciclo de fermentação e o seguinte, com o objetivo de recuperar perdas em biomassa e a viabilidade.

A **tabela 5** mostra a viabilidade e a biomassa no início e no final de cada período de 15 horas de ativação (agitação de 125 rpm e 30°C) das suspensões de células. Durante este tempo de tratamento ocorreram aumentos em biomassa de até 37,2%, dependendo das condições, sem grandes variações em viabilidade (acréscimos de até 2,7%). Estas perdas insignificantes de viabilidade parecem ser devido ao fato das viabilidades iniciais serem altas (faixa de 91% a 83%).

Tabela 5 – Variações em viabilidade e biomassa das células do leite de levedura (25 g.L⁻¹, ou 9,5 % v.v⁻¹) suspensas em água ou meio mínimo contendo sacarose e extrato de levedura a pH 4,0, após 15 horas de incubação com agitação de 125 rpm a 30°C.

Meios de ativação			Viabilidade (%)		Biomassa (g.L ⁻¹)	
Meios líquidos	Aditivos	g.L ⁻¹	Inicial	Final	Inicial (100%) ^a	Final (relativo, %) ^b
H₂O torneira	Sacarose	100	84,6 ± 0,6	87,3 ± 1,5	24,2 ± 0,7	33,2 ± 1,5 (+37,2%)
	Extrato de levedura	10				
H₂O destilada	Sacarose	100	87,8 ± 0,0	84,4 ± 2,4	25,9 ± 0,8	29,1 ± 0,3 (+12,4%)
	Extrato de levedura	10				
H₂O miliQ	Sem aditivos	-	87 ± 2,1	86 ± 0,9	24,3 ± 1,1	24,6 ± 0,4 (+1,2%)
	Sacarose	50	83 ± 0,1	78 ± 1,9	23,5 ± 0,7	23,8 ± 0,4 (+1,3%)
	Sacarose	50	88 ± 2,4	85 ± 0,5	23,3 ± 0,2	23,4 ± 1,4 (+0,4%)
	Extrato de levedura	10				
Meio definido (MS)	Sacarose	20	91 ± 1,7	87 ± 1,5	24,2 ± 0,3	23,8 ± 0,1 (-1,7%)
	Sacarose	50	86 ± 1,9	80 ± 3	23,9 ± 0,8	24,3 ± 0,5 (+1,7%)
	Sacarose	100	86 ± 2,3	76 ± 2,9	23,9 ± 0,3	23,3 ± 1,1 (-2,5%)
	Sacarose	20	87 ± 2,7	85 ± 1,9	24,9 ± 0,2	24,9 ± 0,2 (0%)
	Extrato de levedura	10				
	Sacarose	50	85 ± 2,6	87 ± 1,1	24,5 ± 0,2	24,6 ± 0,9 (+0,4%)
	Extrato de levedura	10				
	Sacarose	100	86,4 ± 0,8	89,0 ± 2,6	26,5 ± 0,5	30,3 ± 0,2 (14,3%)

^a biomassa inicial foi considerada como 100%, para cada condição

^b **Acúmulo de Biomassa (%)**: (Final – Inicial)*100/Inicial

A melhor condição de ativação observada na **tabela 5**, foi a condição na qual as células foram tratadas em água de torneira estéril contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose e 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura a pH 4,0, (aumento de 37,2% em biomassa), e ganho em viabilidade (2,7%) embora não significativo. Além disto, foi um tratamento que não se exigia muitos nutrientes.

Com base na **figura 8**, decidimos deixar o leite de levedura no meio de ativação selecionado, por 14-16 horas a 30°C, antes do início do ciclo de fermentação seguinte. A **figura 8** mostra que a biomassa aumentou de 24,2 g.L⁻¹ (tempo zero) para 32,4 g.L⁻¹ em 4 horas e um valor de 33,2 g.L⁻¹ após 14 horas. A viabilidade praticamente não variou (86,4% em 4h e depois atingindo um valor de 87,3% em 14h). O aumento de biomassa ocorreu até 4

horas de reativação e se manteve constante até 14 horas. A seguir foi variado o tempo de tratamento na melhor condição a 4°C e a 30°C, como descrito nas **tabelas 6 e 7**.

A **tabela 6** mostra que perdas em viabilidades foram observadas em água de torneira pura e em soluções desta contendo extrato de levedura e sacarose, quando a suspensão de células foi incubada sem agitação a 4°C. Nesta condição houve perda de biomassa (7,1%) e conseqüentemente perdas de viabilidade, isto porque, talvez tenha ocorrido alguma formação de etanol que tenha levado a mortalidade celular. A melhor condição foi o tratamento a sob agitação de 125 rpm a 30°C por 16 horas (18,6% de aumento de biomassa, e sem perdas de viabilidade), confirmando os dados descritos na **tabela 6 e figura 8**. A reativação por 4 horas sob agitação a 30°C, onde se observa um máximo na **figura 8**, seguido por repouso de 12 horas na geladeira a 4°C (**Tab. 6**), levou a uma menor biomassa, devido a parada do crescimento. No meio II sem fonte de carbono e extrato de levedura não houve ganho em biomassa em nenhum caso, mas perdas de 11% a 17,6%, indicando a necessidade de nutrientes para multiplicação celular. Como uma concentração muito alta de células foi usada como inóculo no presente trabalho, um tratamento para o aumento da biomassa se fez necessário entre os ciclos de fermentação. Perdas em biomassa ocorrem durante as centrifugações entre os ciclos sucessivos de fermentação e, além disto, certo crescimento celular é necessário para garantir a reposição de novas células que se perdem durante o processo por simples morte celular, ou apoptose.

A **tabela 7** mostra que durante o tratamento sob agitação a 30°C ocorre ganho em proteína interna com o aumento de incubação nesta temperatura. A proteína total interna indica que as células encontram-se em boas condições fisiológicas com relação à viabilidade e lise celular. A proteólise intracelular precede a lise das células. Com relação à trealose observou-se uma perda da mesma em todos os casos com o aumento do tempo de reativação. A trealose pode ser considerada um açúcar de reserva que se acumula em fase estacionária, e passa a ser consumido rapidamente quando a população de células passa a crescer como ocorre durante a reativação.

Os ciclos de fermentações sucessivas descritos a seguir foram intercalados por reativação das células: 16 horas de agitação (125 rpm) a 30°C das células suspensas em solução de água de torneira estéril contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose e 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

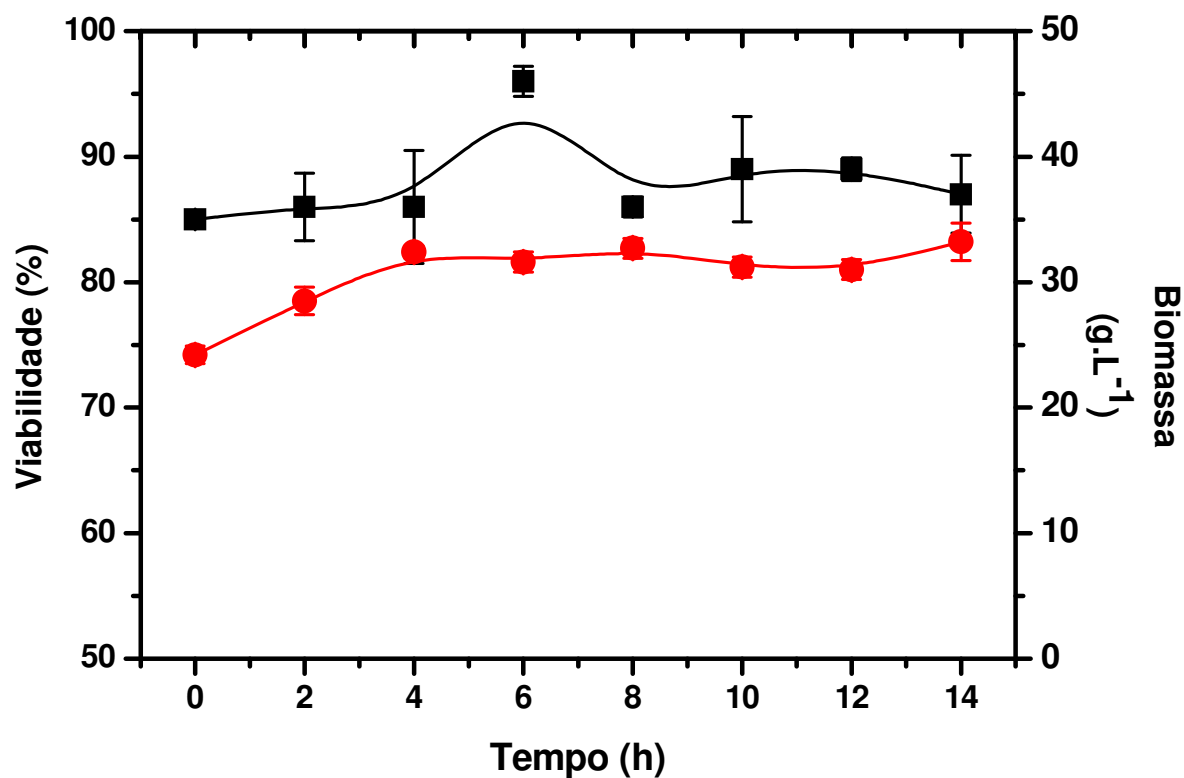


Figura 8 – Curvas de tempo de reativação ou revitalização da levedura IQAr/45-1 em meio constituído por água de torneira estéril contendo 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L⁻¹ de sacarose a 30°C. A curva em preto (■) indica a viabilidade e a em vermelho (●) indica a biomassa.

Tabela 6 – Variações em viabilidade e biomassa das células do leite de levedura (25 g.L^{-1} , ou $9,5 \%$ em v.v^{-1}) com o tempo de tratamento de reativação das células à 4°C e a 30°C em água de torneira contendo sacarose e extrato de levedura a pH 4,0 e/ou água pura

Amostras			Viabilidade (%)			Biomassa (g.L ⁻¹)		
Meios de ativação	Tempo de ativação (h)							
	30°C	4°C	0h	4h	16 h	0h	4h	16 h (acúmulo,%) ^b
Meio I	0	16	91,3 ± 0,4	-	86,6 ± 0,7	27,5 ± 1,3	-	25,6 ± 1,4 (-7,1%)
	4	12	91,3 ± 0,4	89,5 ± 0,4	90,9 ± 0,1	27,5 ± 1,3	31,4 ± 1,6	29,7 ± 1,4 (7,8%)
	16	0	91,3 ± 0,4	89,5 ± 0,4	93,1 ± 1,1	27,5 ± 1,3	31,4 ± 1,6	32,6 ± 0,1 (18,6%)
Meio II	0	16	93,5 ± 0,6	-	88,1 ± 0,8	28,4 ± 0,3	-	25,1 ± 1,3 (-11,9%)
	4	12	93,5 ± 0,6	89,0 ± 1,0	89,7 ± 0,7	28,4 ± 0,3	27,5 ± 0,7	24,6 ± 0,4 (-13,3%)
	16	0	93,5 ± 0,6	89,0 ± 1,0	90,5 ± 1,0	28,4 ± 0,3	27,5 ± 0,7	23,4 ± 0,1 (-17,6%)

Meio I: água de torneira contendo 100 g.L^{-1} de sacarose e 10 g.L^{-1} de extrato de levedura;

Meio II: água de torneira pura

^b**Acúmulo de Biomassa (%):** $(\text{Final} - \text{Inicial}) * 100 / \text{Inicial}$

Tabela 7 – Variação em proteína total e trealose das células do leite de levedura (25 g.L^{-1} , ou $9,5 \%$ em v.v⁻¹) com o tempo de tratamento de reativação das células à 4°C e a 30°C em água de torneira contendo sacarose e extrato de levedura a pH 4,0 e/ou água pura

Amostras			Proteína Total (mg _{proteína} ·mg _{célula})			Trealose (mg _{proteína} ·mg _{célula})		
Meios de ativação	Tempo de ativação (h)							
	30°C	4°C	0h	4h	16 h	0h	4h	16 h
Meio I	0	16	0,13 ± 0,00	-	0,19 ± 0,00	0,25 ± 0,00	-	0,01 ± 0,0
	4	12	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,13 ± 0,00
	16	0	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Meio II	0	16	0,22 ± 0,00	-	0,26 ± 0,00	0,19 ± 0,01	-	0,10 ± 0,00
	4	12	0,22 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,14 ± 0,00
	16	0	0,22 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,09 ± 0,00

Meio I: água de torneira contendo 100 g.L^{-1} de sacarose e 10 g.L^{-1} de extrato de levedura;

Meio II: água de torneira pura

4.3 - CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO A 34°C INTERCALADOS POR REATIVAÇÃO DO LEITE DE LEVEDURA: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE

4.3.1 – Ciclos sucessivos de fermentação com 200 g.L⁻¹ de sacarose em relação ao meio final

Ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem IQAr/45-1 a 34°C em batelada alimentada por pulsos de 200 g.L⁻¹ de sacarose adicionados em intervalos de 60 minutos, e pH ajustado para 4,5 após a adição de cada pulso. A quantidade de inóculo foi de 33 g.L⁻¹.

As **figuras 9, 10 e 11** mostram os efeitos dos ciclos sucessivos de fermentação sobre viabilidade, brotos viáveis, biomassa, proteína total, açúcar redutor total (ART) e etanol em processo com reutilização de células em batelada alimentada durante oito ciclos de fermentação.

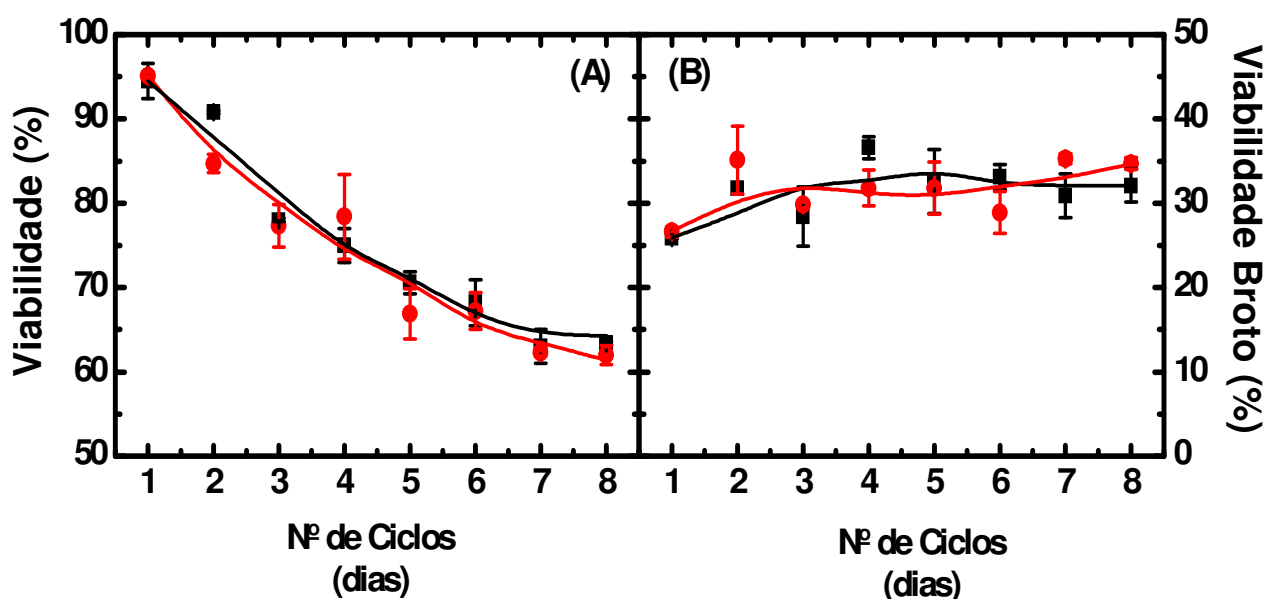


Figura 9 – Variações em viabilidade (A) e brotos viáveis (B) durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células reativadas da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada com ajuste de pH após cada pulso de sacarose. As curvas em preto (■) indicam valores iniciais e as vermelhas (●) indicam valores no final dos ciclos de fermentação. **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, e alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca).

A **figura 9** mostra as variações em viabilidade e brotamento durante os ciclos sucessivos de fermentação. A viabilidade (**Fig. 9, parte A**) decresceu (perda acumulada de 32,4% no final do 8º ciclo) enquanto que o brotamento (**Fig. 9, parte B**) permaneceu constante durante os ciclos de fermentação. Assim, não ocorreram aumentos em viabilidade durante as fases de reativação, indicando que o ciclo de divisão celular foi mais afetado que a viabilidade ao longo dos ciclos.

A **figura 10** correlaciona os valores de viabilidade e biomassa no final dos tratamentos de reativação (após cada ciclo) com o número de ciclos de fermentação. A perda em viabilidade acumulada no final do 7º ciclo de reativação foi de 32,5%. Comparando-se as **figuras 9 e 10** observa-se que a reativação não evitou a perda de viabilidade das células. Uma possibilidade de reativação seria enriquecer o meio de reativação com aditivos que minimizem as perdas em viabilidade. Outra justificativa seria o fato de utilizar uma concentração muito alta de etanol durante as fermentações sucessivas. O etanol interno não teria sido liberado mesmo com a lavagem prévia das células em água antes de serem incubadas em solução de reativação contendo extrato de levedura e sacarose.

A **figura 11** correlaciona os valores de biomassa e proteína total em função do número de ciclos sucessivos de fermentação. A biomassa final em cada ciclo de fermentação (**Fig. 11, parte A**) manteve-se estável durante o decorrer dos ciclos sucessivos de fermentação. Além disto, a **figura 11** mostra pequenos aumentos em biomassa e proteína interna total entre as medidas iniciais e finais de cada ciclo de fermentação. Com relação à proteína total (**Fig. 11, parte B**), não houve grandes variações, sendo que pequenas diminuições em proteína interna só ocorreram entre o 1º e 2º ciclo de fermentação. O aumento em proteína interna a partir do 3º ciclo indica adaptação do fermento (**Fig. 11, parte B**).

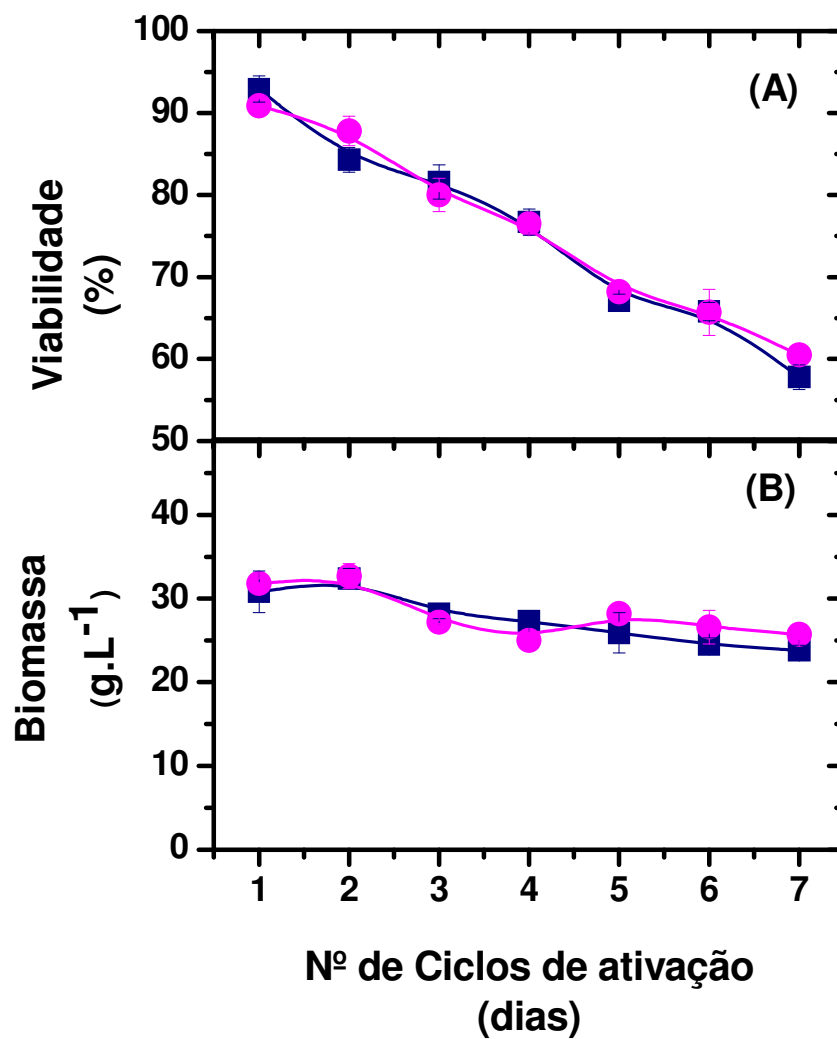


Figura 10 – Efeitos de reativação entre ciclos sucessivos de fermentação com sacarose 200 g.L⁻¹ sobre a viabilidade (A) e quantidade de biomassa (B) da levedura IQAr/45-1 durante a estocagem por 15 horas a 30°C sendo que as curvas em azul (■) indicam valores iniciais de reativação; e as curvas em rosa (●) indicam valores finais do repouso.

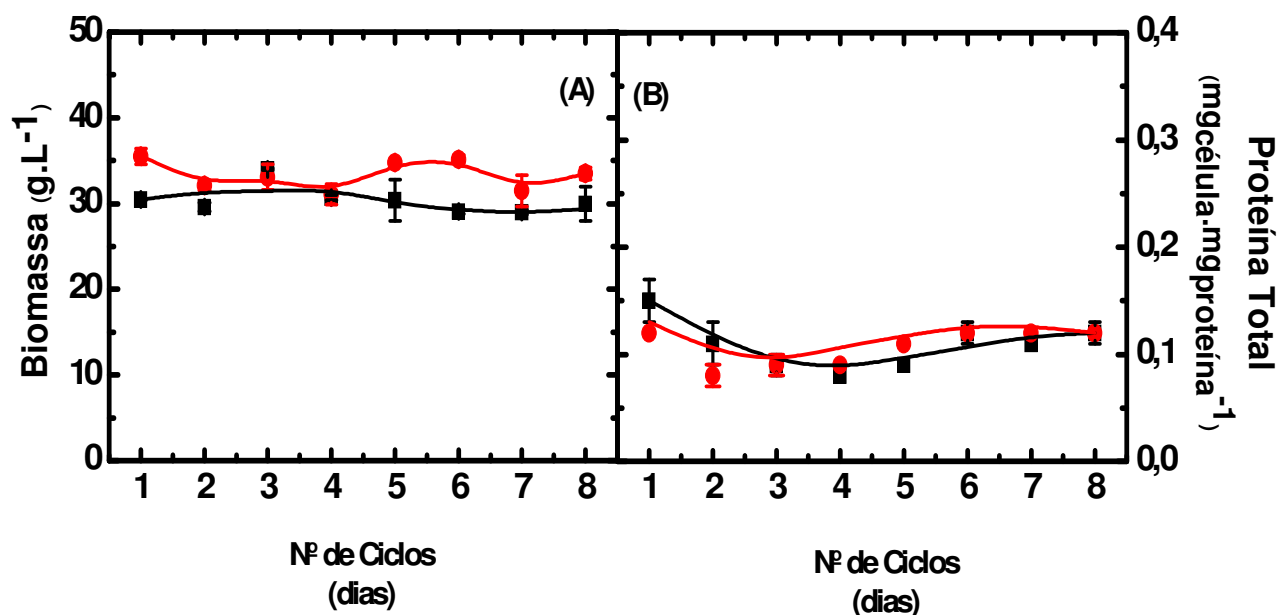


Figura 11 – Variações em biomassa (A) e proteína total (B) durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada com ajuste de pH após cada pulso de sacarose. As curvas em preto (■) indicam valores iniciais e as vermelhas (●) indicam valores no final dos ciclos de fermentação. **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, e alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca).

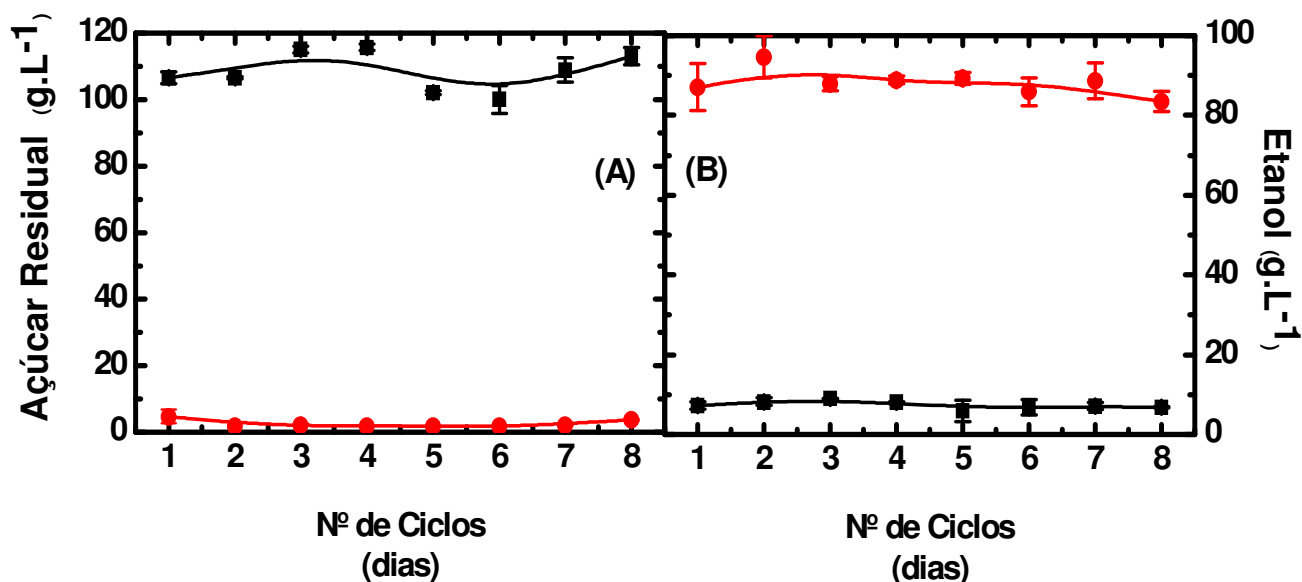


Figura 12 – Variações em açúcar residual (A) e etanol (B) durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da levedura IQAr/45-1 em batelada alimentada com ajuste de pH após cada pulso de sacarose. As curvas em preto (■) indicam valores iniciais e as vermelhas (●) indicam valores no final dos ciclos de fermentação. **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, e alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca).

A **figura 12** mostra variações de etanol e açúcar residual total em função do número de ciclos sucessivos de fermentação. O açúcar residual (**Fig. 12, parte A**) foi totalmente consumido no final de cada ciclo de fermentação, enquanto que o etanol produzido (**Fig. 12, parte B**) foi praticamente constante durante todos os ciclos, variando de $87,1 \pm 5,9 \text{ g.L}^{-1}$ (1º ciclo) a $83,5 \pm 2,5 \text{ g.L}^{-1}$ (8º ciclo).

Altas concentrações de etanol inibem o crescimento da levedura e a atividade fermentativa (**Laluce et al., 2009**). Portanto para aumentar a viabilidade celular durante a fermentação será preciso diminuir a concentração do açúcar, conseqüentemente diminuir a concentração de etanol produzido e assim o efeito inibitório do etanol sobre as células, como mostraremos a seguir. Nas destilarias brasileiras os reatores são alimentados por melaço ou melaço/caldo-de-cana com valores de ART na faixa de 15% a 25% (v.v⁻¹), em um período de até 12 horas, sendo que a concentração final de etanol seja da ordem de 8% a 9% (v.v⁻¹). Nestes experimentos os valores de etanol final estão na faixa de 11,3 % (v.v⁻¹) o que levou a perdas em viabilidade.

4.3.2 - Efeito da concentração de açúcar sobre a linhagem IQAr/45-1 em bateladas únicas alimentadas por pulsos

Os efeitos da concentração de açúcar em bateladas alimentadas por pulsos decrescentes (156 g.L^{-1} e 180 g.L^{-1} e a controle 200 g.L^{-1}) de sacarose sobre a produção de etanol, viabilidade, biomassa e açúcar residual foram ensaiados, e os resultados estão descritos na **tabela 8 e figuras 13 e 14**.

Tabela 8 – Efeitos das diferentes concentrações de sacarose adicionada a bateladas alimentadas únicas por pulsos de sacarose em intervalos de 60 minutos (total de 4 horas) e com pH reajustado para 4,5 após cada pulso.

Variáveis da fermentação	Concentração total de sacarose (g.L ⁻¹)		
	156	180	200 (Controle)
Tempo de fermentação (h)	5	5	6
pH _{inicial}	4,51	4,50	4,52
pH _{final}	4,46	4,50	4,36
Viabilidade _{inicial} (%)	98,3 ± 0,4	99,3 ± 0,4	98,7 ± 0,1
Viabilidade _{final} (%)	95,4 ± 0,8	97,4 ± 0,2	96,2 ± 1,1
Biomassa: Inicial (g.L ⁻¹)	31,2 ± 0,7	32,3 ± 0,1	31,5 ± 0,5
Final (g.L ⁻¹)	36,4 ± 0,6	38,5 ± 0,4	36,1 ± 1,1
Biomassa _{Final} – Inicial (g.L ⁻¹) Acúmulo de biomassa (%) ^b	5,2 16,8%	6,3 19,5%	4,6 14,6%
[Etanol] _{final} (g.L ⁻¹)	80,4 ± 0,5	92,3 ± 0,8	100,5 ± 0,5
[ART] _{final} (g.L ⁻¹)	0,6 ± 0,0	0,98 ± 0,0	2,12 ± 0,0

Alimentação: 5 pulsos contendo concentrações diferentes de sacarose, com intervalos de adição de pulso de 60 minutos. A quantia de fermento no reator antes da alimentação foi de 4,7% em massa seca (p.v⁻¹) ou 19,8% (v.v⁻¹)

^b**Acúmulo de Biomassa (%)**: (Final – Inicial)*100/Inicial

A **tabela 13** mostra os efeitos de diferentes concentrações de sacarose sobre as variáveis dependentes do processo (viabilidade, biomassa, etanol e ART) e os respectivos parâmetros de fermentação: a) o tempo de fermentação aumenta com concentrações de sacarose acima de 180 g.L⁻¹; b) a biomassa final aumentou mostrando um valor máximo em 180 g.L⁻¹ de sacarose (aumento de 19,5%); c) o ART final aumentou com o aumento da concentração de sacarose (2,12 ± 0,0 de ART final com 200 g.L⁻¹).

As **figuras 13 e 14** descrevem as curvas de tempo para viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual (ART). As viabilidade (**Fig. 13 parte A**) caíram discretamente de forma independente da concentração inicial de açúcar. A **figura 13 (parte B)** mostra que houve um acúmulo maior de biomassa quando a concentração de sacarose era de 180 g.L⁻¹. Na **figura 13** observa-se que o tempo de fermentação foi menor com 156 g.L⁻¹ e 180 g.L⁻¹ de sacarose, enquanto que a maior quantidade de etanol foi obtida com 200 g.L⁻¹.

Portanto escolheu a concentração de 156g.L⁻¹ de sacarose, por apresentar uma concentração de etanol menor (na ordem de 8% a 10 %, v.v⁻¹), e assim amenizar o efeito

inibitório do etanol sobre as células, diminuindo as perdas em viabilidades durante os ciclos sucessivos de fermentação, que são causadas.

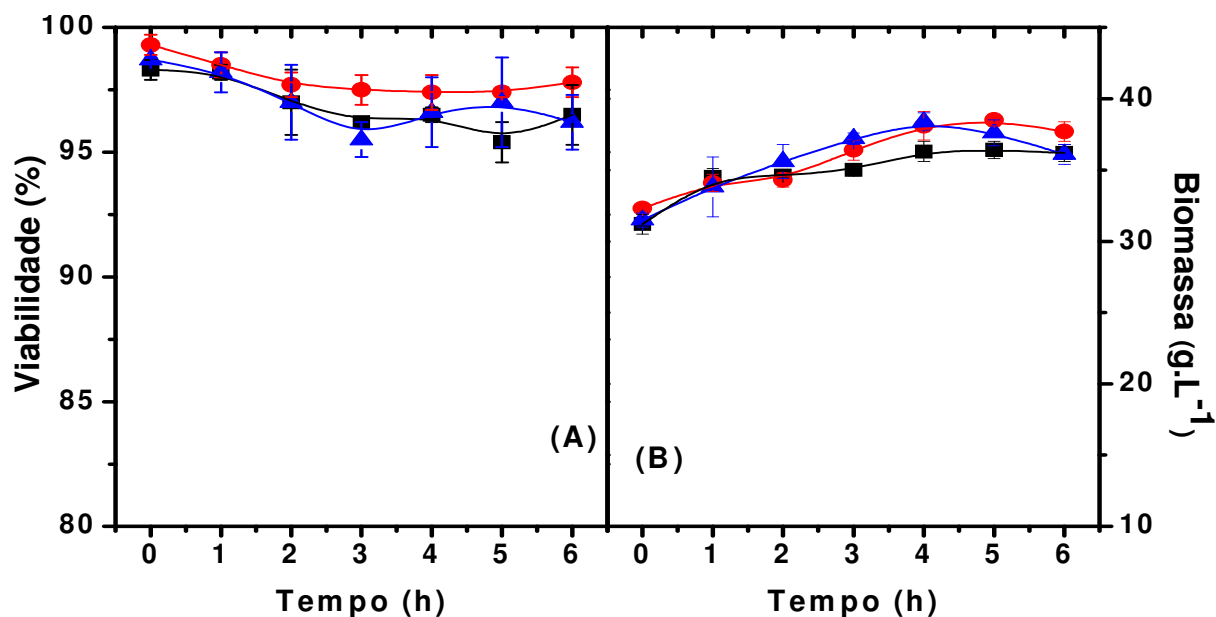


Figura 13 – Efeito das concentrações de sacarose ($\blacktriangle$ 200 g.L⁻¹; $\bullet$ 180 g.L⁻¹; $\blacksquare$ 156 g.L⁻¹, em relação ao volume final do meio) sobre as curvas de tempo das variações em viabilidade (parte A) e biomassa (parte B). **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca), e ajuste de pH após cada pulso.

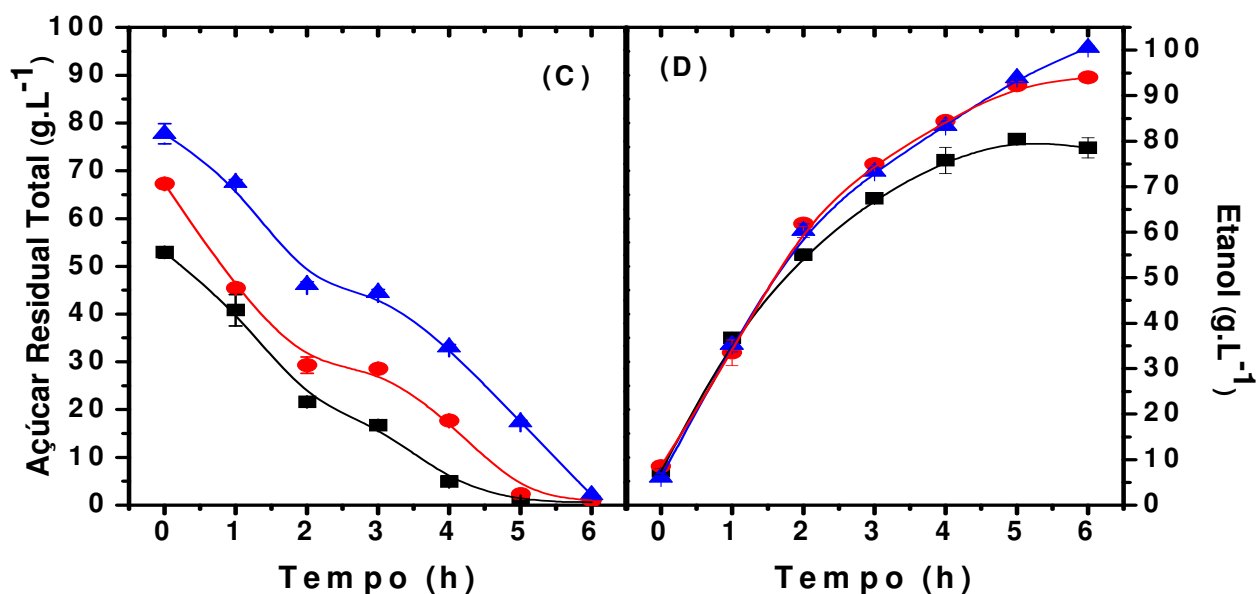


Figura 14 – Efeito das concentrações de sacarose ($\blacktriangle$ 200 g.L⁻¹; $\bullet$ 180 g.L⁻¹; $\blacksquare$ 156 g.L⁻¹, em relação ao volume final do meio) sobre as curvas de tempo das variações em açúcar residual (parte A) e etanol (parte B). **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca), e ajuste de pH após cada pulso.

4.4 – COMPARAÇÃO ENTRE A LEVEDURA IQAr/45-1 E A LEVEDURA COMERCIAL BG1 DURANTE CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM MEIO SINTÉTICO (MS)

A linhagem híbrida IQAr/45-1 e a linhagem industrial BG1 foram comparadas em bateladas alimentadas por pulsos decrescentes de sacarose (156 g.L^{-1} em relação ao volume final de meio) em meio sintético. Os ciclos sucessivos de fermentação foram realizados a 34°C .

Em experimentos prévios, foram observados que entre um ciclo e outro de fermentação, as células perdiam biomassa e viabilidade. Por este motivo, as células foram reativadas, entre um ciclo e outro de fermentação por incubação em meio de reativação (água de torneira estéril acrescida de 100 g.L^{-1} de sacarose e 10 g.L^{-1} de extrato de levedura) como tentativa de recuperar perdas em viabilidade das células e obter aumentos em biomassa.

4.4.1 – Curvas de variação em viabilidade, brotamento, biomassa, etanol, proteína total e açúcar residual em função do número de ciclos de fermentação realizadas com a levedura IQAr/45-1 em meio sintético contendo um total de sacarose adicionada de 156 g.L^{-1}

A **figura 15** mostra as variações de viabilidade, brotamentos, biomassa, proteína total, etanol e açúcar residual em função do número de ciclos de fermentação: a) a viabilidade (**Fig. 15, parte A**) decresceu de 92,4% para 80,7% no final do 10º ciclo de fermentação, o que representa uma queda na ordem de 12,4%. b) a viabilidade dos brotos (**Fig. 15, parte B**) aumentou de 25,3% para 49,0% no final do 10º ciclo indicando um aumento na quantidade de brotos viáveis (na ordem 23,7%) maior que a diminuição em viabilidade; c) a biomassa (**Fig. 15, parte C**) não variou, certamente devido ao intenso brotamento; d) a proteína interna total (**Fig. 15, parte D**) manteve-se constante durante os ciclos, sendo maior a quantidade no final de cada ciclo; e) o açúcar residual (**Fig. 15, parte E**) foi nulo, enquanto que o etanol final (**Fig. 15, parte F**) foi constante ao longo dos ciclos, como uma média de $75,2 \text{ g.L}^{-1}$ ou 9,5 % (v.v⁻¹).

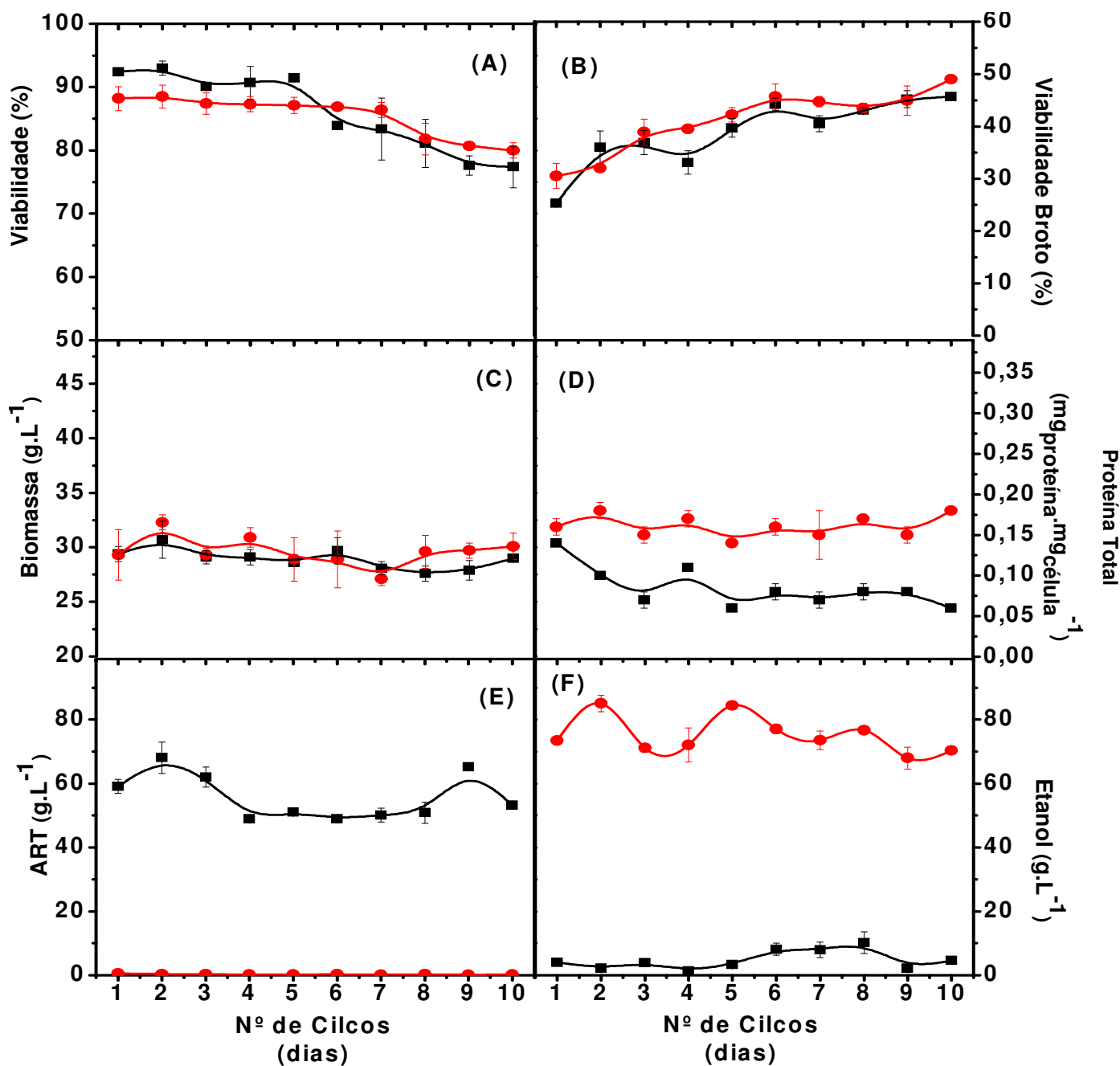


Figura 15 – Ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da **levedura IQAr/45-1** em batelada alimentada por pulsos de sacarose adicionada até um total de 156 g.L⁻¹ e seus efeitos sobre os valores iniciais (■) e finais (●) relacionados com: viabilidade (A), brotamento (B), biomassa (C), proteína total (D), açúcar residual (E) e etanol (F). **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca), e ajuste de pH após cada pulso.

4.4.2 – Curvas de variação em viabilidade, brotamento, biomassa, etanol, proteína total e açúcar residual em função do número de ciclos de fermentação realizados com a levedura comercial BG1, e adição ao meio sintético de uma quantidade total de sacarose adicionada de 156 g.L⁻¹

A **figura 16** mostra as variações de viabilidade, números de brotos, biomassa, proteína total, açúcar residual e etanol em função do número de ciclos de fermentação: a) a viabilidade (**Fig. 16, parte A**) decresceu de 99,6% para 87,1% no final do 10º ciclo de fermentação, o que representa uma queda na ordem de 12,5%; b) o números de brotos (**Fig. 16, parte B**) aumentou de 19,6% para 45,3 % no final do 10º ciclo indicando um aumento na quantidade de brotos viáveis (na ordem de 25,8%) maior que a diminuição em viabilidade; c) a biomassa (**Fig. 16, parte C**) aumentou no final de cada ciclo, até o 8º ciclo (ao redor de 3,0 g.L⁻¹); d) a proteína interna total (**Fig. 16, parte D**) manteve-se constante durante os ciclos, sendo maior a quantia no final de cada ciclo; e) o açúcar residual (**Fig. 16, parte E**) foi nulo, enquanto que o etanol final (**Fig. 16, parte F**) elevou-se de 57,6 g.L⁻¹ para 82,5 g.L⁻¹ ate o 5º ciclo, a partir deste ponto ficando constante até o final do 10º ciclo de fermentação.

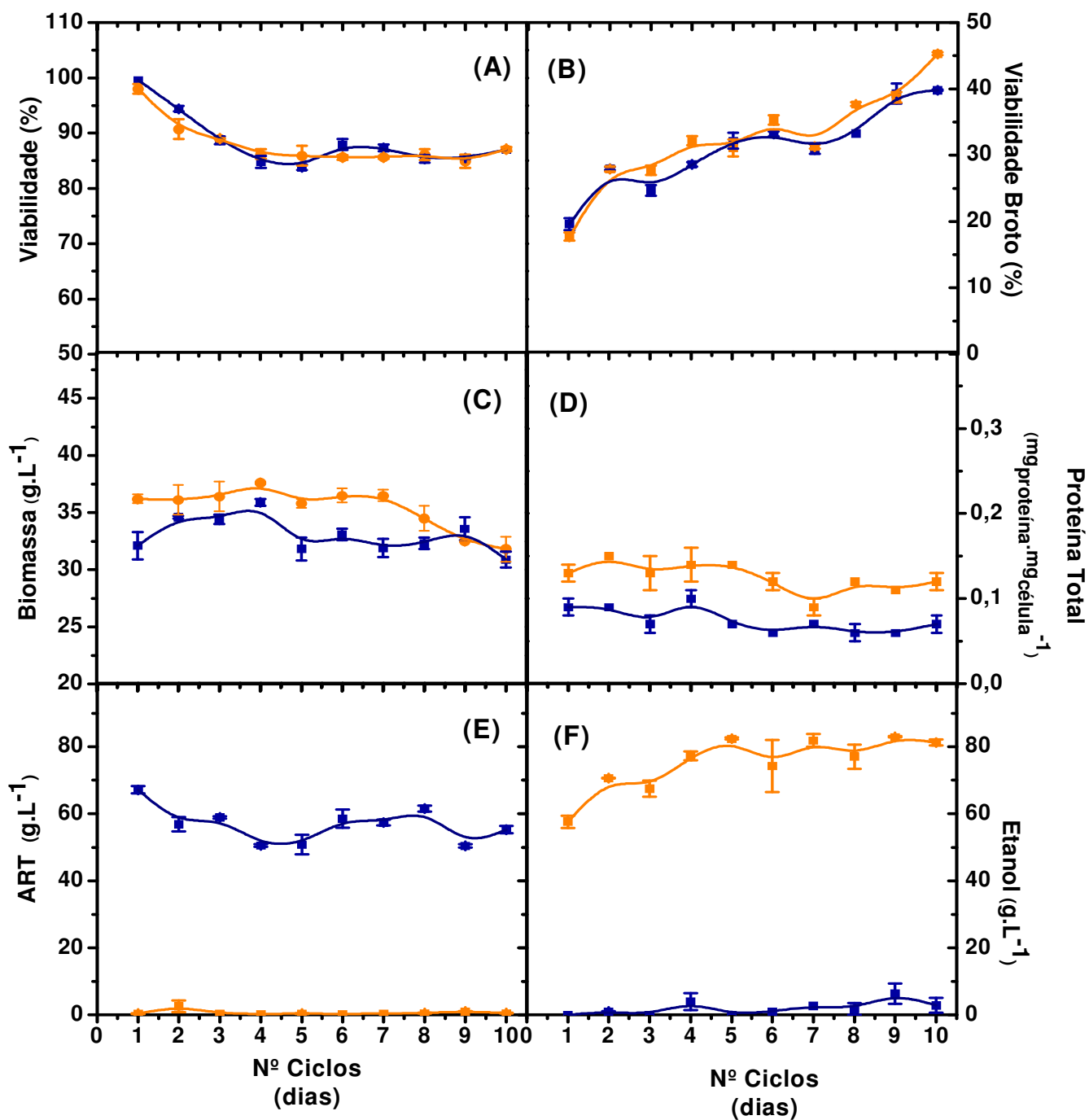


Figura 16 – Ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células da **levedura industrial BG1** em batelada alimentada por pulsos de sacarose adicionada até um total de 156 g.L⁻¹ e seus efeitos sobre os valores iniciais (■) e finais (●) relacionados com: viabilidade (A), brotamento (B), biomassa (C), proteína total (D), açúcar residual (E) e etanol (F). **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca), e ajuste de pH após cada pulso.

A **tabela 9** permite comparar os principais aspectos das **figuras 15 e 16**, quanto a:

- a) Viabilidade - valores na faixa de 80 % a 87,1% parecem ser valores constantes de um equilíbrio entre células vivas e mortas para uma quantia de inóculo 33 g.L^{-1} . Como a viabilidade passou a decair a partir do 1º ciclo no caso da levedura BG1, a levedura IQAr/45-1 parece mais resistente a perdas em viabilidade.
- b) Brotos viáveis – o número brotamentos elevou com a duas leveduras a partir do 1º ciclo (tanto inicial quanto final), porém, a elevação do brotamento para a levedura BG1 foi gradativa enquanto um brotamento intenso e rápido passou a ocorrer até o 3º ciclo da fermentação para a levedura IQAr/45-1.
- c) Biomassa – como a quantia de células inoculadas com a levedura BG1 foi maior (da ordem de $33,0 \text{ g.L}^{-1}$) que a inoculada no caso da levedura IQAr/45-1 (da ordem de $28,9 \text{ g.L}^{-1}$), teve-se uma diferença entre a biomassa inicial e final de cada ciclo, da ordem de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ para a levedura BG1, e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ para a levedura IQAr/45-1
- d) Proteína total – aumento no final de cada ciclo para ambas as leveduras, sendo ligeiramente maior no caso da levedura IQAr/45-1. A levedura IQAr/45-1 obtém uma biomassa mais rica em proteína no final do 10º ciclo de fermentação (18,0% de proteína ÷ $30,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, uma razão proteína e biomassa de 0,6) que a levedura BG1 (12,0% de proteína ÷ $31,8 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, uma razão proteína e biomassa de 0,4). Quanto maior o nível de proteína intracelular, maior a resistência celular a lise.
- e) Etanol – por fermentar mais rápido a levedura IQAr/45-1 mostrou um valor de $73,5 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol a partir do 1º ciclo, enquanto que a levedura BG1 mostrou um etanol menor no 1º ciclo atingindo um valor de $81,3 \text{ g.L}^{-1}$ apenas no 10º ciclo. O nível final de etanol de $81,3 \text{ g.L}^{-1}$ foi possível de ser atingido pela levedura BG1 porque a fermentação foi mais lenta.

A conclusão final é que a levedura BG1 fermenta mais lentamente que a levedura IQAr/45-1, porém com seu teor de proteína ligeiramente menor. Os cálculos de parâmetros cinéticos (velocidade específica de produção de etanol, eficiência e rendimento) poderiam elucidar melhor a diferença entre as duas leveduras.

Tabela 9 - Comparações das variáveis de fermentação entre as leveduras IQAr/45-1 e a levedura industrial BG1

Comparações entre as linhagens		
Variáveis ao longo dos ciclos	Linhagem IQAR/45-1	Linhagem BG1
Viabilidade	Perdas até o 5º ciclo chegando a 80% no 10º ciclo, perda total de 12,5%	Perdas a partir do 1º ciclo, atingindo um valor constante de 85,9% no 5º ciclo, perda total de 12,4%
Brotos viáveis	Elevações até o 10º ciclo (25,3% a 49,0%), ganho equivalente a 23,7%	Elevação gradual a partir do 1º ciclo (19,8%) até 45,3% (10º ciclo), ganho equivalente a 25,8%
Biomassa	As biomassas iniciais e finais permaneceram constantes ao longo dos ciclos, mas com uma elevação média de 0,7 g.L ⁻¹ durante os ciclos	Biomassa inicial praticamente constante ao longo dos ciclos, porém com aumentos (ao redor de 2,3 g.L ⁻¹) na biomassa final de cada ciclo até o 7º ciclo
ART final	Nulo	Nulo
Etanol	Quase constante, variando de 73,5 g.L ⁻¹ no 1º ciclo a 70,4 g.L ⁻¹ no 10º ciclo	Elevou-se de 57,6 g.L ⁻¹ (1º ciclo) para 81,3 g.L ⁻¹ no 10º ciclo
Proteína Total	Constante ao longo dos ciclos, mas com aumentos ao redor de 1,9 vezes entre o início e fim de cada ciclo	Constantes ao longo dos ciclos, mas com aumento ao redor de 1,7 vezes entre o início e fim de cada ciclo

4.4.3 – Curvas de variação de biomassa e viabilidade durante a reativação das células no meio de ativação das leveduras IQAr/45-1 e BG1

A **figura 17** mostra os valores iniciais e finais de viabilidade e biomassa em função do número dos ciclos de reativação.

A **figura 17** mostra que as leveduras BG1 e IQAr/45-1 tiveram ganhos em biomassa durante as reativações de 15 horas realizada a 30°C entre os ciclos de fermentação. A levedura IQAr/45-1 mostrou reativação da viabilidade final até o 4º ciclo, e com perdas entre o 5º e 6º ciclo, sendo o comportamento contrário observado para a linhagem BG1. A recuperação da viabilidade ocorrida com a levedura IQAr/45-1 na fase de reativação não foi suficiente para evitar perdas maiores em viabilidade durante os ciclos de fermentação (viabilidade inicial no 1º ciclo de 93,8% reduzido a 79,9% no início do 10º ciclo, ou seja, uma queda da ordem de 14,0%) (ver **Fig.17, parte A e C**). Com a levedura BG1 a viabilidade caiu de 97,9% no 1º ciclo de fermentação para 83,2% no 10º ciclo de fermentação que também corresponde a uma queda de 14,6% (ver **Fig. 17, parte B e D**). Assim, perdas de viabilidade ocorreram com as duas leveduras ao longo das fermentações sucessivas, mas a diferença entre as perdas com as duas leveduras não parecem significativa em apenas dez ciclos de fermentação.

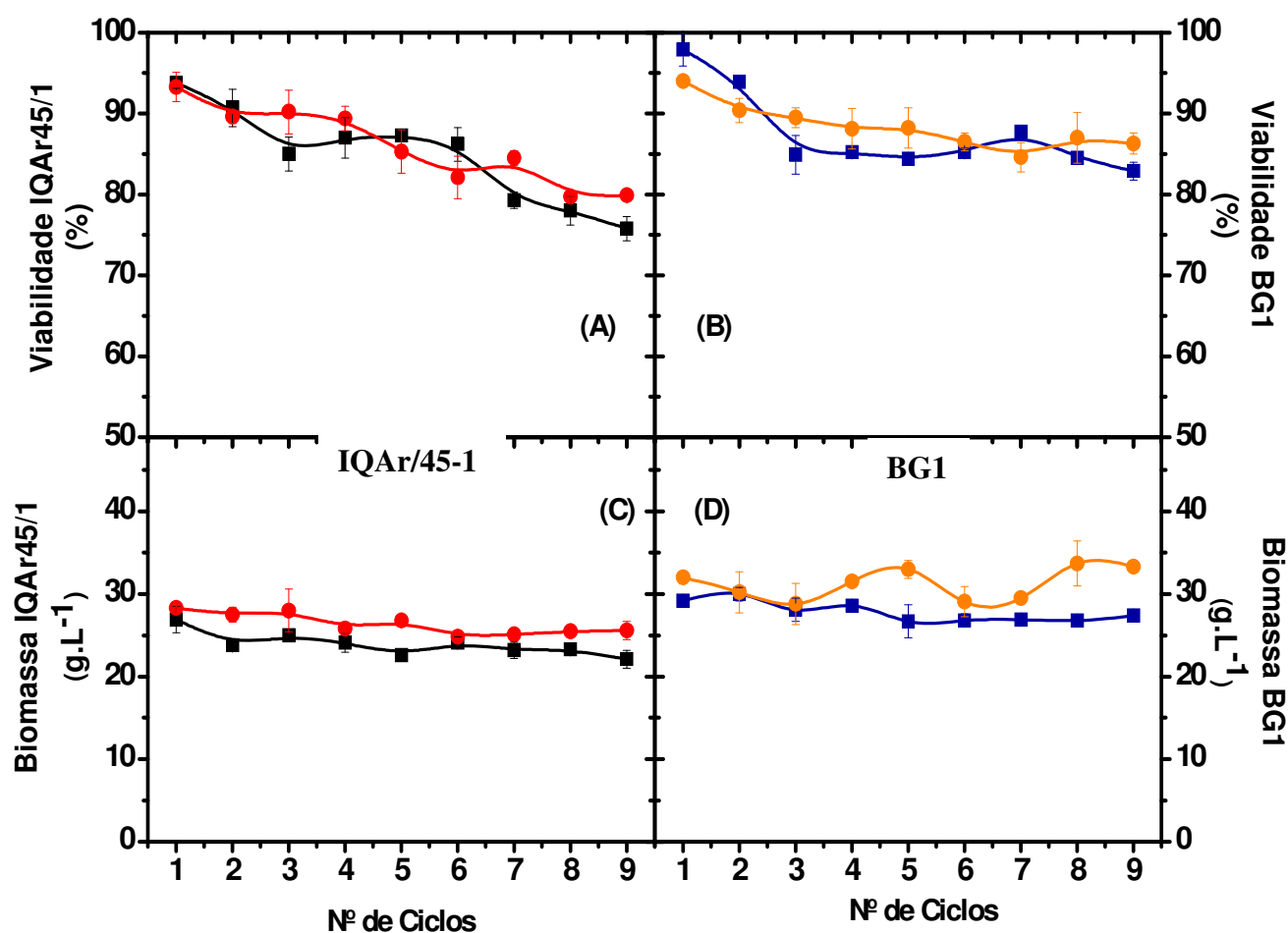


Figura 17 - Efeitos de reativações sucessivas do leite de levedura sobre a viabilidade e biomassa das leveduras IQAr/45-1 (“A” e “C”) e BG1 (“B” e “D”) durante a estocagem por 15 horas a 30°C sendo: (■) e (■)= valores iniciais do repouso; (●) e (●) = valores finais do repouso.

4.5 – EFEITO DA ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA EM CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO A 37°C INTERCALADOS POR REATIVAÇÃO DO LEITE DE LEVEDURA

4.5.1 - Ciclos sucessivos de fermentação com um total de 156 g.L⁻¹ de sacarose adicionada ao meio final

Ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem IQAr/45-1 em batelada alimentada por pulsos tal que uma quantia de 156 g.L⁻¹ de sacarose (em relação ao volume final do meio) foi adicionada em intervalos de 60 minutos, com o ajuste de pH a 4,5 após cada pulso e uma quantidade de inóculo de 33 g.L⁻¹ (em relação ao volume final do meio) a 37°C.

A **figura 18** mostra as variações em viabilidade, brotos viáveis, biomassa, proteína total, açúcar residual (ART) e etanol em ciclos sucessivos com reutilização de células a 37°C: a) a viabilidade (**Fig.18, parte A**) decresceu de 98,9 % para 69,1% no final do 10º ciclo de fermentação (perda na ordem de 29,8%); b) a viabilidade dos brotos (**Fig. 18, parte B**) aumentou de 26,7% para 34,1% no fim do 10º ciclo, ou seja, um aumento do número de brotos da ordem de 7,4%; c) a biomassa inicial de cada ciclo (**Fig. 18, parte F**) manteve-se constante ao redor de 32,7 g.L⁻¹, mas com uma elevação no final ao redor de 34,8 g.L⁻¹, ou seja, um ganho em cada ciclo na média de 2,0 g.L⁻¹; d) a proteína interna total (**Fig. 18, parte E**) manteve-se constante durante os ciclos, sendo a diferença entre o valor inicial e o final em cada ciclo da ordem de 1,7 vezes maior no final do ciclo; e) o açúcar residual (**Fig. 18, parte C**) foi nulo em todos os ciclos, mas devido a rapidez da fermentação o ART inicial diminui até o 10º ciclo; f) o etanol final (**Fig. 18, parte D**) foi constante até o último ciclo (10º ciclo) de fermentação; enquanto o etanol inicial da ordem de 7-10 g.L⁻¹ foi devido ao etanol formado rapidamente entre o tempo zero e a amostragem realizada após a adição do primeiro pulso, e ajuste do pH.

Tabela 11 mostra comparações entre as variáveis das fermentações da levedura IQAr/45-1 nas diferentes temperaturas (34°C e 37°C) .

Comparações entre temperaturas de fermentação da levedura IQAr/45-1		
Variáveis ao longo dos ciclos	34°C	37°C
Viabilidade	Perdas até o 5º ciclo chegando a 80% no 10º ciclo	Perdas ao longo de todos os ciclos chegando a um valor de 69,1% de viabilidade no final do 10º C
Brotos viáveis	Elevações até o 10º ciclo (25,3% a 49,0%), ganho equivalente a 23,7%	Elevações até o 5º ciclo (26,7% a 34,1%), porém com ganho total equivalente a 7,4% até o 10º ciclo
Biomassa	As biomassas iniciais e finais permaneceram constantes ao longo dos ciclos, mas com uma elevação média de 0,7 g.L ⁻¹ durante os ciclos	As biomassas iniciais e finais permaneceram constantes ao longo dos ciclos, mas com uma elevação média de 2,0 g.L ⁻¹ durante os ciclos
ART final	Nulo	Nulo
Etanol	Variando de 73,5 g.L ⁻¹ no 1º ciclo e 70,4 g.L ⁻¹ no 10º ciclo	Variando de 79,9 g.L ⁻¹ no 1º ciclo e 75,2 g.L ⁻¹ no 10º ciclo
Proteína Total	Valores constante ao longo dos ciclos, mas com aumento ao redor de 1,9 vezes entre o início e fim de cada ciclo	Sem variações ao longo dos ciclos, mas com aumento de 1,7 vezes, entre o início e fim de cada ciclo

A **tabela 11** mostra que a elevação da temperatura prejudicou apenas a viabilidade durante os ciclos de fermentação, e ligeiramente o número de brotos. Um surpreendente aumento de biomassa no final de cada ciclo de fermentação a 37°C foi observado. Isto pode ser explicado pela reativação que precedeu cada ciclo de fermentação.

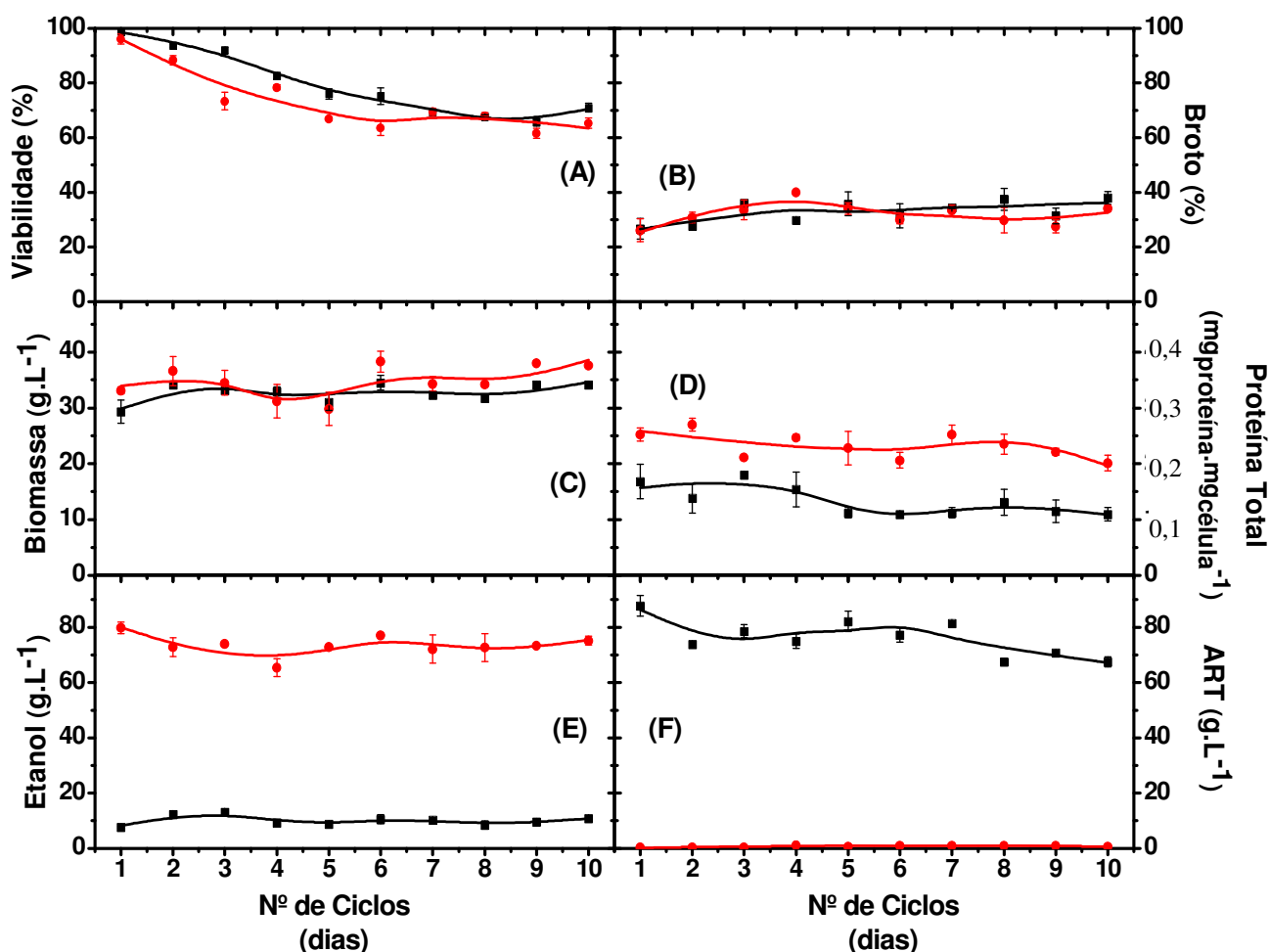


Figura 18 – Ciclos sucessivos de fermentação a 37°C com reutilização de células da **levedura IQAr/45-1** em batelada alimentada por pulsos de sacarose adicionada até um total de 156 g.L⁻¹ e seus efeitos sobre os valores iniciais (■) e finais (●) relacionados com: viabilidade (A), brotamento (B), biomassa (C), proteína total (D), etanol (E) e açúcar residual total–ART (F). **Condições de fermentação em cada ciclo:** adição de 5 pulsos decrescente de sacarose a cada 60 minutos, alto inóculo (33 g.L⁻¹, massa seca), e ajuste de pH após cada pulso.

4.5.2 - Curvas de variação de biomassa e viabilidade durante a reativação das células da levedura IQAr/45-1 no meio de reativação

A **figura 19 (parte A)** mostra queda tanto de viabilidade inicial quanto final nos três primeiros ciclos de ativação. A partir deste ciclo, observou-se um aumento da viabilidade

durante os tratamentos sucessivos de reativação, ou seja, um aumento de 7,8% a 9,4% de viabilidade no 5º e 6º ciclo respectivamente, e com aumento de 2% a 4% no decorrer dos outros ciclos de reativação. Por outro lado, observa-se um aumento de viabilidade da biomassa de células que saiu dos reatores (biomassa inicial) indicando uma adaptação da população de células durante as fermentações sucessivas.

Na **figura 19 (parte B)** observa-se aumentos de biomassa final em todos os tratamentos de reativação, sendo que esta reativação adquire valores máximos a partir do 4º ciclo de ativação (ganhos médios na ordem de $3,8 \text{ g.L}^{-1}$ considerando a massa no início da reativação ao redor de $26,5 \text{ g.L}^{-1}$). A **figura 15 (parte C)** mostra um aumento bem menor em biomassa ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) durante as reativações em fermentações sucessivas a 34°C . Parece que as células mais estressadas respondem melhor ao tratamento de reativação. O mesmo foi observado com relação a viabilidade quando se compara a **figura 15 (parte B)** com a **figura 19 (parte B)**.

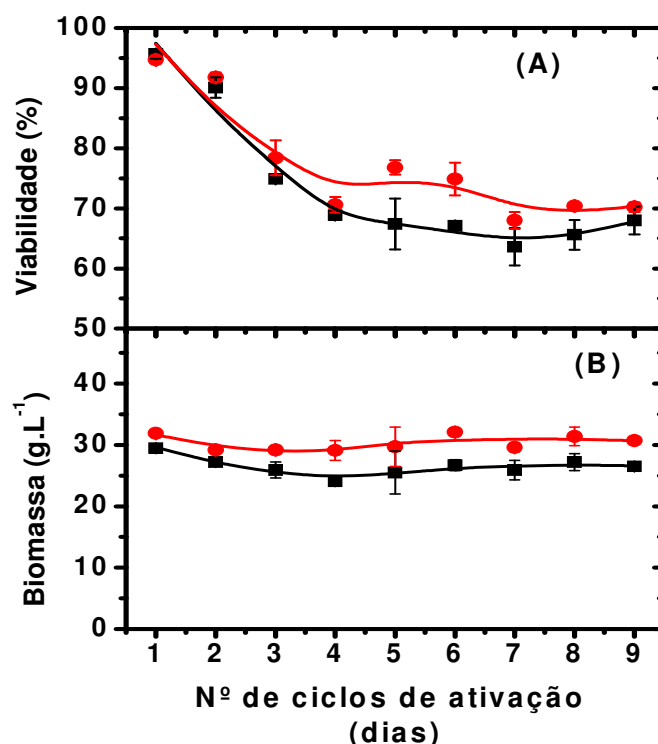


Figura 19 - Efeitos de reativações entre ciclos sucessivos de fermentação a 37°C e adição de 156 g.L^{-1} de sacarose sobre a viabilidade (A) e quantidade de biomassa (B) da levedura IQAr/45-1 durante a estocagem por do leite de levedura por 15 horas a 30°C , sendo: (■) valores iniciais do repouso; (●) valores finais do repouso

4.6 – DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS DO MEIO MÍNIMO (MS) EM FERMENTAÇÕES COM ALTAS DENSIDADES DE CÉLULAS

4.6.1 – Efeito sobre a viabilidade e biomassa para a levedura IQAr/45-1 em batelada simples realizada em mini-reatores e Erlenmeyers

O desempenho do meio sintético contendo 200 g.L^{-1} de sacarose adicionada a pH 4,5, foi comparado em batelada simples realizada em Erlenmeyers agitados, e nos mini-reatores do sistema de fermentação (melhor controle de temperatura, pH e de agitação).

A **figura 20** mostra maiores quedas de viabilidade e biomassa em função do tempo em Erlenmeyers do que em mini-reatores.

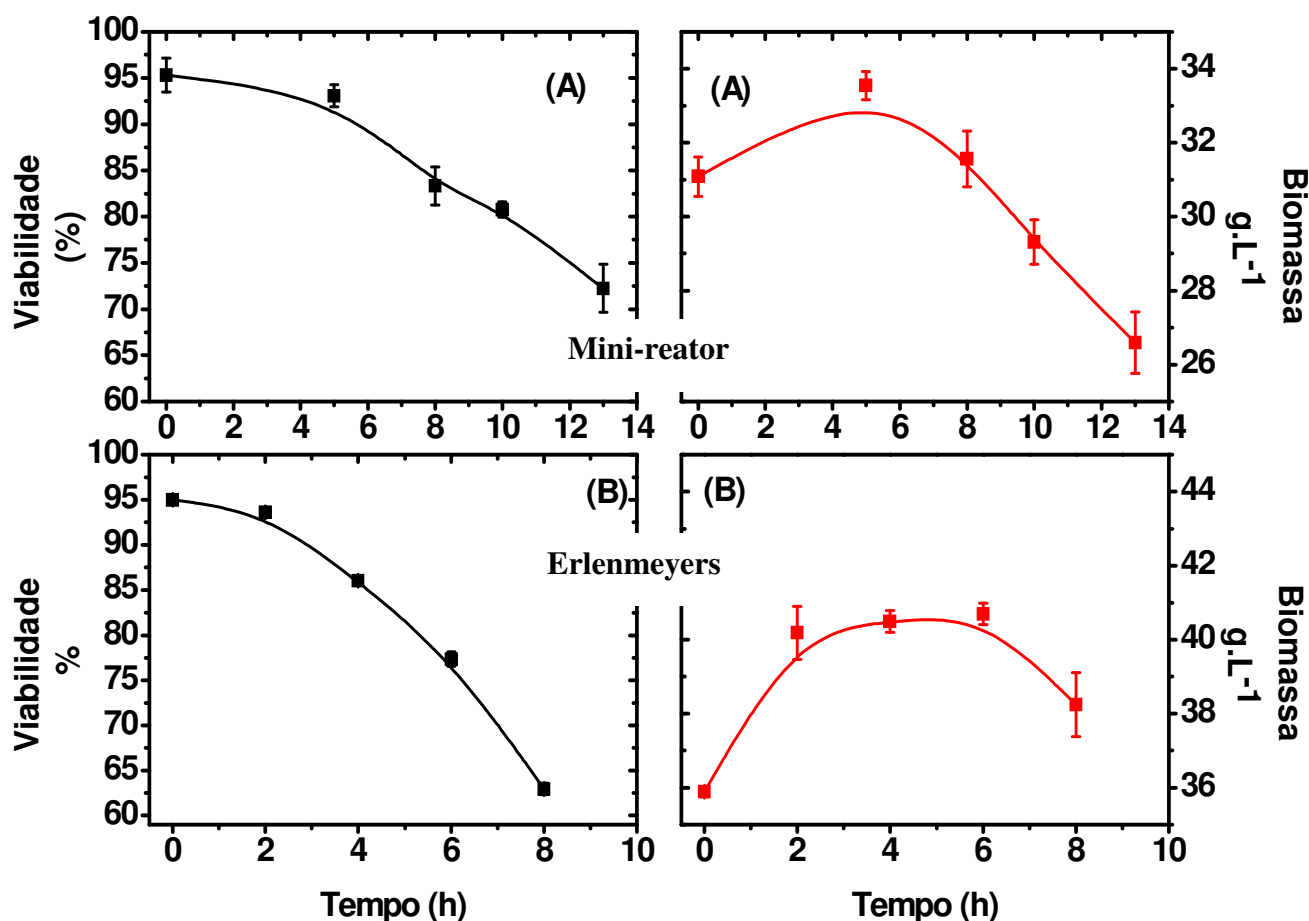


Figura 20 – As curvas de viabilidade (■) e biomassa (●) em função do tempo de fermentação com a levedura IQAr/45-1 em batelada simples a 34°C em meio sintético contendo 200 g.L^{-1} de sacarose, foram realizadas da seguinte forma: em mini-reator (A) e Erlenmeyers agitados (B).

Podemos observar na **figura 20** que nos cultivos em Erlenmeyers agitados (B) a viabilidade foi de 63% após 8 horas enquanto que no fermentador (A) foi de 83,3%. Quanto á biomassa, houve perdas acima de 5 horas de fermentação no Erlenmeyers (B), ao passo que no reator (A) houve um máximo de acúmulo de biomassa entre 3-7 horas. Assim, o melhor controle de temperatura e agitação nos reatores permitiu minimizar as perdas em viabilidade e evitar a perda de biomassa por mais tempo. As condições usadas nos Erlenmeyers agitados estimulam o crescimento à custas de maiores perdas em viabilidade. Por outro lado, como a queda de viabilidade foi maior em sistema de batelada simples agitada em Erlenmeyers, este nos pareceu o processo mais drástico no qual os efeitos da adição de nutrientes seriam melhores observados.

4.6.2 – Alterações na composição do meio mínimo (MS) em batelada simples realizada em Erlenmeyers

A **tabela 12** mostra a fermentação em batelada simples em Erlenmeyers, utilizando 33 g.L⁻¹ de inóculo, 200 g.L⁻¹ de sacarose a 34°C, sob agitação de 125 rpm, onde se determinou as melhores concentrações das fontes de nitrogênio, fosfato de amônio e magnésio sobre a viabilidade e biomassa no processo. Os ensaios de biomassa e viabilidade foram feitos em um tempo de 12 horas, onde as perdas em biomassa e viabilidade são mais drásticas.

A **tabela 13** mostra os efeitos da alteração na concentração das soluções usadas no preparo do meio mínimo (MS) sobre a viabilidade e biomassa após 8 horas de fermentação em batelada simples realizadas em Erlenmeyers agitado (125 rpm) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose adicionada e 33 g.L⁻¹ de inóculo a 34°C.

A **tabela 14** demonstra o estudo realizado sobre o efeito do sulfato de zinco e do di-amônio fosfato (DAP) sobre a manutenção da viabilidade e da biomassa em batelada simples realizadas em Erlenmeyers agitado (125 rpm) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose adicionada e 33 g.L⁻¹ de inóculo a 34°C.

Tabela 12 - Efeito da alteração na concentração das fontes de nitrogênio, fosfato e magnésio do meio MS sobre a viabilidade e biomassa em processo de batelada simples após 12 horas de fermentação em Erlenmeyers agitado

Meio MS			Viabilidade (%)		Biomassa (g.L ⁻¹)	
Suplementos modificados	Suplementação (antes) (após) g.L ⁻¹ g.L ⁻¹		Inicial	Final	Inicial	Final (acúmulo, %) ^b
MS Controle	-	-	92,9 ± 1,7	7,9 ± 0,9	30,8 ± 1,6	33,9 ± 0,6 (+9,3%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,32	1,6	92,0 ± 0,9	24,2 ± 3,2	26,6 ± 1,7	36,0 ± 0,6 (+26,1%)
	1,32	2,0	96,0 ± 0,3	24,4 ± 2,1	29,7 ± 1,4	32,8 ± 2,2 (+9,7%)
K ₂ HPO ₄	0,85	1,0	94,9 ± 0,0	21,7 ± 0,7	29,7 ± 0,9	33,1 ± 1,7 (+10,5%)
	0,85	1,3	93,7 ± 3,5	22,7 ± 0,3	29,2 ± 0,9	33,5 ± 0,6 (+12,8%)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5	0,7	92,6 ± 1,2	23,3 ± 4,0	29,9 ± 1,2	31,5 ± 1,7 (+5,2%)

Condições da fermentação: batelada simples com adição de 200 g.L⁻¹ de sacarose, 33 g.L⁻¹ de inoculo a 34°C

^b**Acúmulo de Biomassa (%):** (Final – Inicial)*100/Inicial

A **tabela 12** mostra que o meio mínimo é deficiente em sulfato de amônio (ganho 26,1%) e fosfato de potássio (ganho 12,8%) para biomassa. A perda de viabilidade após 12 horas de fermentação foi drástica em todos os casos.

Outra tentativa (**Tab. 13**) consistiu em dobrar os componentes do meio. O aumento da concentração de todos os componentes do meio mínimo (MS) de 1,5 a 2 vezes não levou a

nenhuma melhora. Porém, a **tabela 13** mostra que o meio MS também é deficiente em ergosterol. A perda de viabilidade (**Tab. 13**) ocorreu em todos os casos.

Assim, as **tabelas 12 e 13** permitem concluir que a variação nas quantidades dos componentes do meio sintético bem como dos suplementos não evitaram as perdas em viabilidade.

A literatura (ZAO et al., 2008) descreve que o zinco é um protetor da viabilidade celular durante a fermentação, e por outro lado a indústria utiliza di-amônio fosfato (DAP) como fonte de nitrogênio e fosfato. Por esta razão foi decidido aumentar a concentração de zinco e adicionar DAP ao meio mínimo para acompanhar os efeitos sobre a viabilidade e biomassa (**Tab. 14**). A **Tabela 14** mostra que nenhum aumento significativo foi observado em viabilidade final. Com base na **tabela 13**, realizamos as mesma adições ao meio MS contendo solução de sais duas vezes concentradas. Porém efeitos significativos em biomassa final também não foram observados (**Tab. 10**).

A **figura 21** contém as curvas de biomassa e viabilidade da levedura IQAr/45-1 em função do tempo, utilizando-se o meio mínimo simples (MS) e o meio mínimo (MS) duas vezes concentrado para fermentação em batelada simples após as seguintes modificações: a) meio MS (controle); b) meio MS contendo sulfato de zinco ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$); c) meio MS contendo ZnSO_4 ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$) e DAP (1%); d) meio MS contendo solução de sais [2x]; e) meio MS contendo solução de sais [2x] e ZnSO_4 ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$); f) meio MS contendo sais [2x], ZnSO_4 ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$) e DAP (1%). Apesar das modificações realizadas no meio simples **figura 21 (parte A)**, grandes perdas em viabilidade foram observadas a partir de 4 horas de fermentação em todos os casos. Por outro lado, a suplementação aumentou a biomassa mostrando um máximo em 6 horas de fermentação. As adições realizadas no meio MS concentrado levaram a menores ganhos em biomassa. Assim, a escolha de 12 horas de fermentação para comparar as diversas suplementações (**Tab. 12, 13 e 14**) não foi uma boa escolha.

Tabela 13 – Efeito da alteração na concentração das soluções usadas no preparo do meio mínimo (MS) sobre a viabilidade e biomassa após 8 horas de fermentação em Erlenmeyers agitado contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose adicionada

Soluções concentradas (vezes) adicionadas ao meio MS	Viabilidade (%)		Biomassa (g.L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Inicial (100%)	Final (acúmulo, %)*
MS	96,4 ± 0,1	71,7 ± 0,3	30,8 ± 1,6	33,9 ± 0,6 (+9,3%)
MS + minerais traços ^b (2x)	98,1 ± 0,0	75,8 ± 1,1	26,6 ± 1,7	36,0 ± 0,6 (+26,1%)
MS + vitaminas ^c (2x)	98,4 ± 1,4	87,4 ± 0,9	29,7 ± 1,4	32,8 ± 2,2 (+9,7%)
MS + ergosterol (2x)	98,9 ± 0,8	75,4 ± 1,2	29,7 ± 0,9	33,1 ± 1,7 (+10,5%)
MS + sais ^a (2x)	98,3 ± 1,1	80,2 ± 2,0	29,2 ± 0,9	33,5 ± 0,6 (+12,8%)
MS (2x)	98,3 ± 1,6	70,1 ± 2,4	29,9 ± 1,2	31,5 ± 1,7 (+5,2%)
MS (1,5x)	97,1 ± 1,5	44,1 ± 0,7	35,6 ± 1,2	39,1 ± 0,3 (+8,9%)

^aComponentes da solução de sais: (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄ . 7H₂O, CaCl₂ . 7H₂O, NaCl; ^bComponentes da solução de minerais traços: ZnSO₄ . 7H₂O, H₃BO₃, KI, MnSO₄ . H₂O, CuSO₄ . 5H₂O, Na₂MoO₄ . 2H₂O, CoCl . 6H₂O, FeCl₃;

^cComponentes da solução de vitaminas: Biotina, Pantotenato de Ca, Ácido fólico, Myo-inositol, Niacina, Ácido p-aminobenzoico, Piridoxina, Riboflavina, Tiamina.

Condições da fermentação: batelada simples com adição de 200 g.L⁻¹ de sacarose, 33 g.L⁻¹ de inóculo a 34°C

* **Acúmulo de Biomassa (%)**: (Final – Inicial)*100/Inicial

Tabela 14 - Efeito da suplementação do meio MS com sulfato de zinco e DAP sobre a viabilidade e biomassa após 8 horas de fermentação em processo de batelada simples realizada Erlenmeyers, com adição de 200 g.L⁻¹ de sacarose

MS			Viabilidade (%)		Biomassa (g.L ⁻¹)	
Meios	Suplementos	Concentração	Inicial	Final	Inicial	Final (acúmulo, %) ^b
MS	Sem	-	99,2 ± 0,4	62,3 ± 0,9	33,7 ± 0,6	33,5 ± 0,3 (-0,6%)
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,012 g.L ⁻¹	99,1 ± 0,0	69,7 ± 2,4	34,4 ± 0,3	33,7 ± 1,4 (-1,8%)
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O + DAP	0,012 g.L ⁻¹ + 1%	99,2 ± 0,5	65,2 ± 2,1	32,8 ± 0,7	35,2 ± 0,6 (+6,7%)
MS [2x]	Sem	-	99,2 ± 0,4	68,8 ± 0,3	33,8 ± 0,1	36,9 ± 0,1 (+8,3%)
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,012 g.L ⁻¹	98,9 ± 0,7	69,7 ± 0,5	32,4 ± 0,1	29,0 ± 0,6 (-11,6%)
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O + DAP	0,012 g.L ⁻¹ + 1%	99,3 ± 0,3	72,3 ± 3,2	33,4 ± 0,4	36,0 ± 0,3 (+7,1%)

DAP: di-amônio fosfato

Condições da fermentação: batelada simples com adição de 200 g.L⁻¹ de sacarose, 33 g.L⁻¹ de inóculo a 34°C

^b**Acúmulo de Biomassa (%):** (Final – Inicial)*100/Inicial

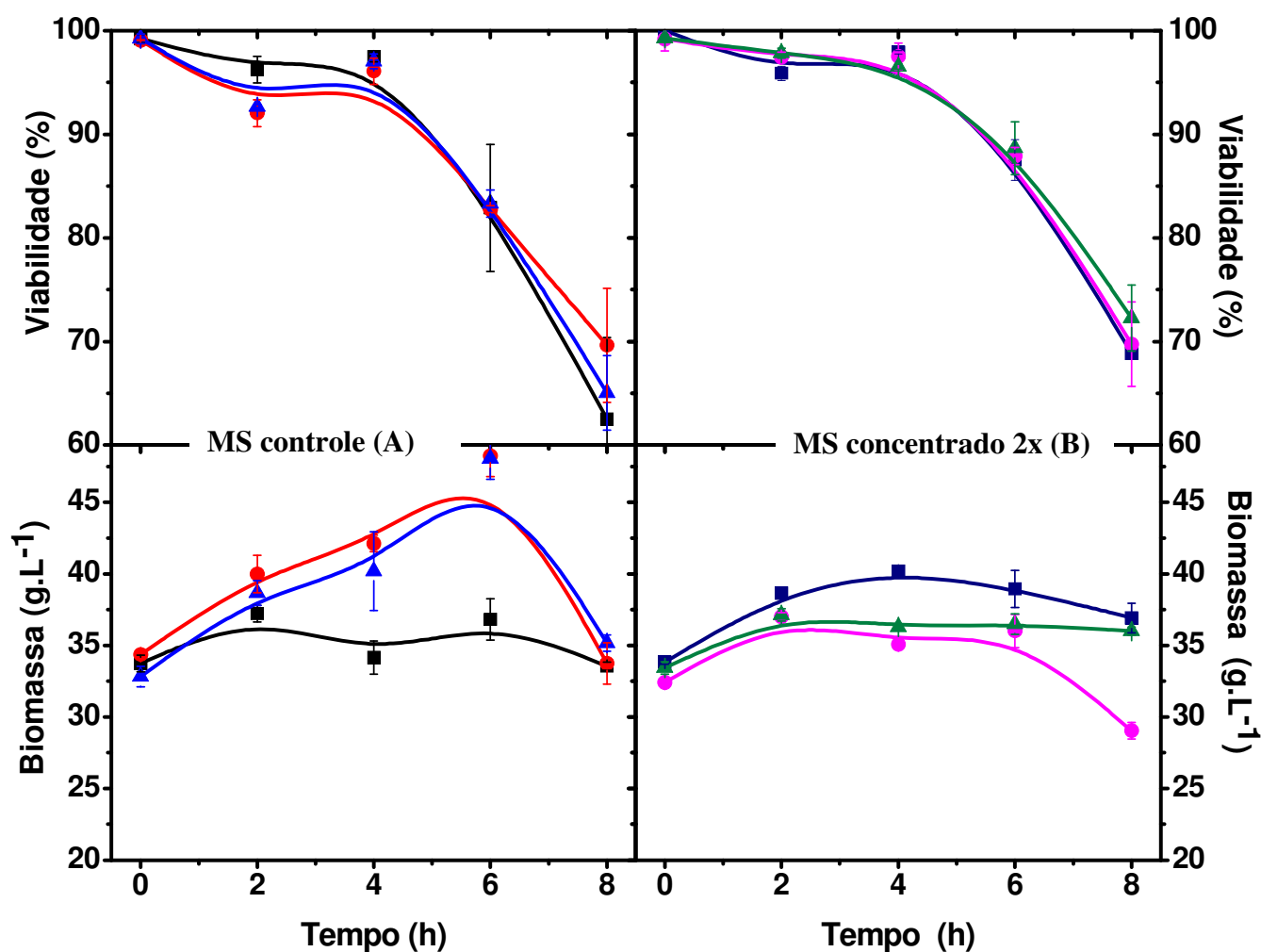


Figura 21 – Curvas de tempo de biomassa e viabilidade obtidas com a levedura IQAr/45-1 em MS controle (A) e MS concentrado 2 vezes (B) após as seguintes suplementações: as curvas em preto (■) indicam o experimento controle (MS); as em vermelho (●) indicam a adição de ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹); as em azuis (▲) indicam adição de ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹) e DAP (1%); as curvas em azul escuro (■) indicam o MS contendo solução de sais [2x]; as curvas em rosa (●) indicam o meio MS contendo solução de sais [2x] e ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹); as em verde (▲) indicam o MS contendo solução de sais [2x], ZnSO₄ (0,012 g.L⁻¹) e DAP (1%). **Condições das fermentações:** batelada simples, utilizando 200 g.L⁻¹ de sacarose adicionada e inoculo de 33 g.L⁻¹, a 34°C

4.6.3 – Efeito da suplementação nutricional em batelada alimentada por pulsos de sacarose em mini-reatores

Com base na **figura 21** o efeito da suplementação no meio sintético (MS) sobre a fermentação (**Tab. 15**) em batelada alimentada por pulsos de sacarose foi estudado da seguinte forma: a) meio sintético normal acrescido de sulfato de zinco ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$); b) meio sintético normal acrescido de sulfato de zinco ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$) e DAP (1%); c) meio sintético duas vezes concentrado, acrescido de sulfato de zinco ($0,012 \text{ g.L}^{-1}$) e DAP (1%). Estas concentrações foram avaliadas em processo de batelada alimentada sem que ocorressem melhoras (nem em viabilidade nem em biomassa) em relação ao meio sintético simples (controle).

A **tabela 15** mostra que as suplementações não alteraram o tempo de fermentação, mas a viabilidade final manteve-se alta nas três condições, sendo este o resultado esperado. Além disto, a suplementação com DAP levou a uma biomassa maior em MS simples, do que em meio MS duas vezes concentrado. Isto será comprovado com a realização de ciclos sucessivos de fermentação.

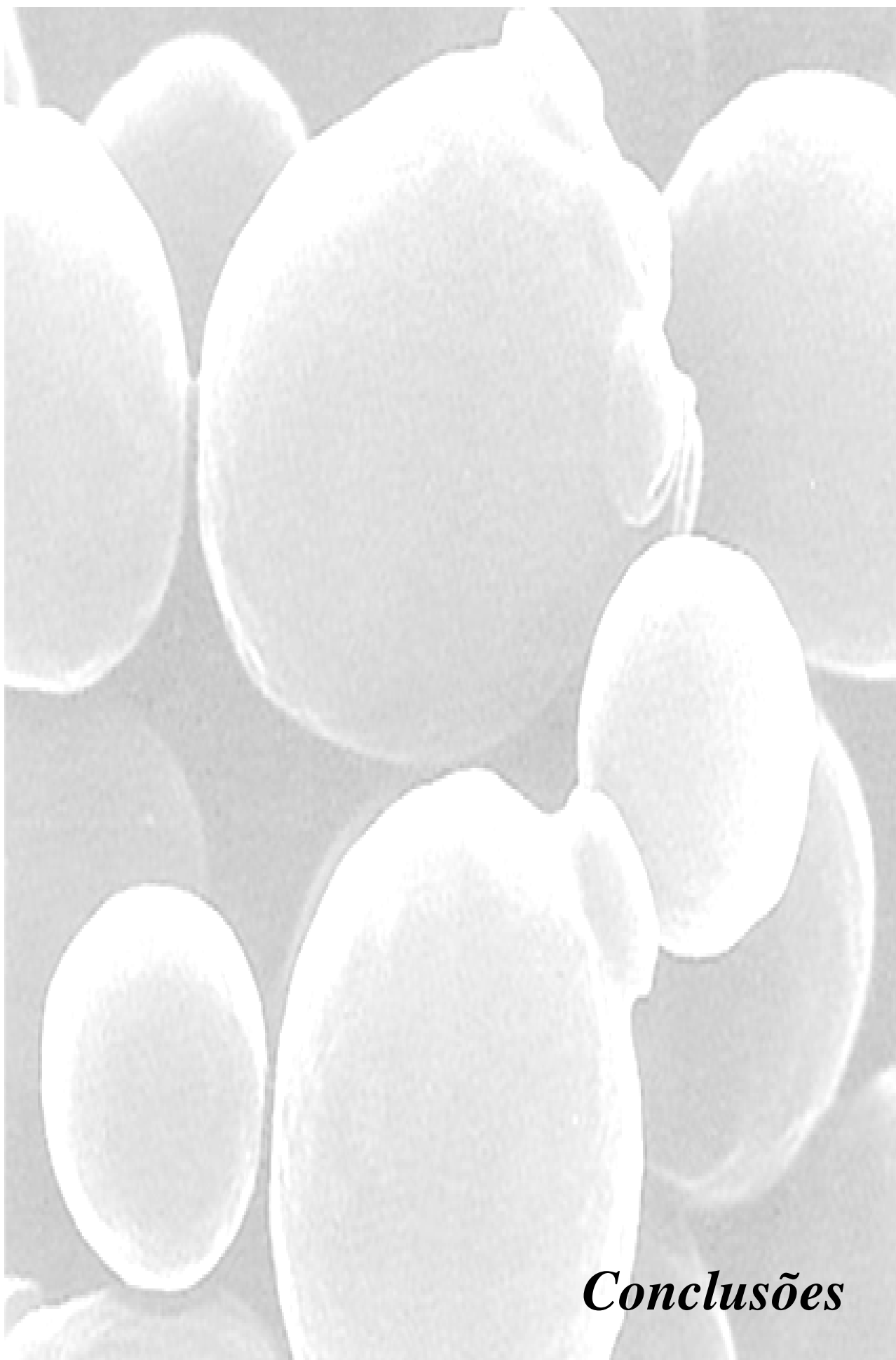
A **tabela 15** mostra que os suplementos (sulfato de zinco e DAP) levaram a poucas perdas em viabilidade após 6 horas de fermentação. A tabela também mostra que houve aumento significativo, para a biomassa em todos os casos. Os maiores aumentos de biomassa ocorreram no meio MS sem aditivos e no meio contendo DAP e sulfato de zinco. A viabilidade não variou com a suplementação. A eficácia das suplementações nutricionais só será comprovada, de forma definitiva, em ciclos sucessivos de fermentação.

Tabela 15 – Efeito da suplementação do meio sintético com sulfato de zinco e DAP sobre as medidas e parâmetros do processo, em batelada alimentada por pulsos de sacarose a 34°C

Variáveis da fermentação	Suplementos		
	MS (controle)	MS + Zinco + DAP	MS [2x] + Zinco + DAP
Tempo de fermentação (h)	6	6	6
pH_{inicial}	4,50	4,50	4,60
pH_{final}	4,69	4,57	4,62
Viabilidade_{inicial} (%)	96,7 ± 2,3	97,1 ± 0,5	96,9 ± 0,8
Viabilidade_{final} (%)	93,4 ± 0,1	93,5 ± 0,4	95,7 ± 3,8
Biomassa:			
Inicial (g.L⁻¹)	37,3 ± 0,2	35,8 ± 0,7	37,5 ± 1,2
Final (g.L⁻¹)	41,4 ± 0,4	43,6 ± 0,7	44,1 ± 0,1
Biomassa_{Final} – Inicial (g.L⁻¹)	4,1 ± 0,5	7,7 ± 0,8	6,6 ± 1,2
Acúmulo de biomassa (%)^b	(10,9%)	(21,6%)	(17,5%)
[Etanol]_{final} (g.L⁻¹)	106,2 ± 3,2	105,0 ± 1,6	106,2 ± 0,5
[ART]_{final} (g.L⁻¹)	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0

Alimentação: 5 pulsos de sacarose contendo 200 g.L⁻¹ em relação ao volume final de meio, em intervalos de 60 minutos, com pH ajustado para 4,5 após cada pulso. A quantia de fermento no reator antes da alimentação foi de 4,7% em massa seca (p.v⁻¹) ou 19,8% (v.v⁻¹)

^b**Acúmulo de Biomassa (%)**: (Final – Inicial)*100/Inicial



Conclusões

O objetivo do presente trabalho consistiu em estabelecer condições para realizar ciclos sucessivos de fermentação sem perdas de viabilidade, com aumentos de biomassa no final de cada ciclo de fermentação e conversão de todo açúcar em etanol.

5.1 – Experimentos utilizando um único ciclo de fermentação

5.1.1 - Quanto ao tamanho do inóculo e a estratégia na alimentação - A melhor estratégia consistiu em utilizar inóculo de 33 g.L⁻¹ e intervalos entre pulsos de sacarose de 60 minutos. Um inóculo menor levou a maiores perdas em viabilidade e menor quantidade na biomassa final. Parece que a aceleração da velocidade de fermentação causou queda em viabilidade, apesar do aumento no tempo de fermentação em 1 hora.

5.1.2 – Estratégias de controle do pH durante o processo de fermentação em batelada alimentada - os melhores resultados foram obtidos quando o pH foi ajustado para 4,5 após a adição de cada pulso de sacarose.

5.1.3 – Efeito da concentração de açúcar sobre bateladas únicas alimentadas por pulsos de sacarose utilizando-se a linhagem IQAr/45-1 – a melhor concentração de sacarose foi 180 g.L⁻¹ com a qual se obteve maior valor em biomassa final. Houve perdas insignificativas de viabilidade em todas as condições. A utilização de 156g.L⁻¹ de sacarose foi escolhida, por apresentar uma concentração de etanol menor, e assim amenizar o efeito inibitório do etanol sobre as células.

5.2 – Estabelecimento de um meio de ativação do leite de levedura a ser usados entre ciclos sucessivos de fermentação – o leite de levedura contendo 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L⁻¹ de sacarose mostrou um ganho em biomassa até 4 horas de incubação, sendo que a biomassa manteve-se constante até 14 horas a 30 °C.

5.3 – Experimentos utilizando ciclos sucessivos de fermentação a 34°C intercalados por reativação do leite de levedura

5.3.1- Ciclos sucessivos de fermentação com 200 g.L⁻¹ de sacarose no meio final – houve perdas significativas de viabilidade celular indicando ser necessário diminuir a concentração de açúcar para obter um etanol final mais baixo, e assim minimizar seu efeito sobre as células.

5.3.2 - Comparação entre a levedura industrial BG1 e a levedura IQAr/45-1 em ciclos sucessivos de fermentação com a adição de 156 g.L⁻¹ de sacarose – a levedura BG1 fermenta mais lentamente que a levedura IQAr/45-1, porém o seu teor de proteína interna foi ligeiramente menor. As viabilidades nos últimos ciclos de fermentação foram equivalentes para ambas as leveduras, mas o brotamento foi mais rápido para a levedura IQAr/45-1. Apesar do inóculo da levedura BG1 ser maior não houve diferença significativa entre as biomassas no final de cada ciclo de fermentação.

5.4 – Experimentos utilizando ciclos sucessivos de fermentação a 37°C intercalados por reativação do leite de levedura para a levedura IQAr/45-1

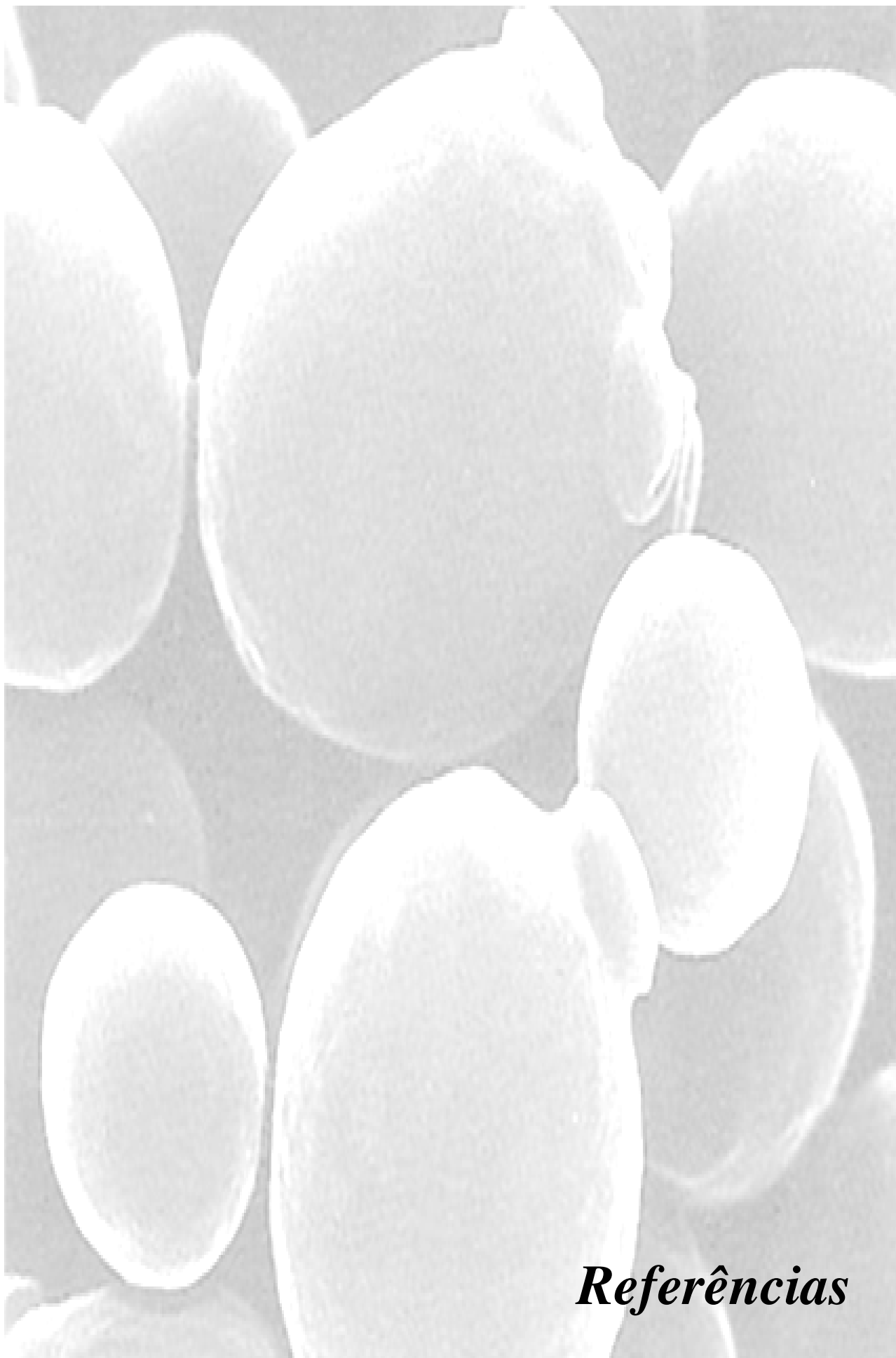
Ciclos sucessivos de fermentação com 156 g.L⁻¹ de sacarose no meio final – o comportamento observado foi semelhante ao observado a 34°C, no entanto houve um surpreendente aumento de biomassa no final de cada ciclo de fermentação a 37°C. Houve um maior prejuízo em relação à perda de viabilidade nesta temperatura.

5.5 - Buscas de deficiências nutricionais em meio mínimo durante fermentações realizadas em Erlenmeyers agitados (125 rpm)

O meio mínimo (MS) mostrou deficiência nutricionais em fermentações com altas densidades de células, pois levou a quedas em viabilidade e biomassa. O MS simples mostrou-se deficiente em sulfato de amônio, fosfato e ergosterol. No entanto o meio MS duas vezes concentrado apresentou piores resultados em viabilidade e biomassa. A suplementação do meio MS simples com sulfato de zinco e di-amônio fosfato (DAP) levou aumentos em biomassa com máximo em 6 horas, mas nenhum aumento foi observado em viabilidade final.

5.6 – Utilização do meio suplementado com sulfato de zinco e DAP em batelada alimentada por pulso

A estratégia de alimentação evitou perdas de viabilidade durante o processo, com aumentos em biomassa final. Espera-se poder dispensar as reativações entre os ciclos de fermentação utilizando-se este meio suplementado.



Referências

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Hampshire, v. 20, n. 1, p. 20-27, Aug. 1998.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, Campinas, n. 7, out. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_02_7.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.

BISSON, L. Stuck and sluggish fermentations. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **Fems Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 182, n. 1, p. 1-8, Jan. 2000.

CABRINI, T. K.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em Usina do Estado de São Paulo. **Sci. Agri.**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 207-216, 1999.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB**, Piracicaba, v. 23, n. 5, maio-jun. 2005.

CARRASCO, P.; QUEROL, A. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 175, p. 450-457, 2001.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, Amsterdam, v. 30, p.1151-1161, 2008.

D'AMORE, T.; STEWART, G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme Microb. Technol.**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.

DAMIANO, D.; WANG, S. S. Improvements in ethanol concentration and fermenter ethanol productivity in yeast fermentations using whole soy flour in batch, and continuous recycle systems. **Biotechnol. Lett.**, Amsterdam, v. 7, n. 7, p. 135-140, 1985.

DOCE é o horizonte. **Anuário Brasileiro da Cana-de-Açúcar**: cenário, p. 26-27,. 2008. Disponível em: < <http://www.anuarios.com.br/upload/publicacaoCapitulo/pdfpt/pdf309.pdf> >. Acesso em: 24 mar. 2009.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**. 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

TA LIGADO? **Anuário Brasileiro da Cana-de-Açúcar**: energia, p.63-68, 2008. Disponível em: < <http://www.anuarios.com.br/upload/publicacaoCapitulo/pdfpt/pdf313.pdf> >. Acesso em: 24 mar. 2009.

FERREIRA, A. V. B. Fungos: os primórdios do sexo. **Ciênc. Hoje**, v. 37, n. 218, p. 34-41, 2005. Disponível em: <www.icb.ufmg.br/big/big623/artigo-%20sexo%20dos%20fungos.pdf> . Acesso em: 24 nov. 2008.

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, Cidade do México, v. 46, n. 1-2, p. 24-46, 2004.

GROOT, W. J.; WALDRAM, R. H.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. The effect of repeated temperature shock on baker's yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 37, n. 3, p. 396-398, 1992.

GUEIROS, R. S. **Otimização das técnicas de manipulação genética de leveduras industriais para aplicação na produção de álcool combustível**. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

IVORRA, C.; PÉREZ-ORTIN, J. E.; OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 64, p. 698-708, 1999.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol-production in Brazil. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1991.

LALUCE, C.; SOUZA, C. S.; ABUD, C. L.; GATTAS, E. A. L.; WALKER, G. M. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Hampshire, v. 29, n. 3, p. 140-144, 2002.

LALUCE, C.; TOGNOLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration and inoculums size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, 2009. In press

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 1-43. (Biotecnologia Industrial, 3).

LLOYD, D.; MORELL, S.; CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; JAMES, P. E.; TOWLANDS, C. C. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Sussex, v. 9, n. 8, p. 825-833, Aug. 1993.

LYND, L. R.; AHN, H. J.; ANDERSON, G.; HILL, P.; KERSEY, D. S.; KLAPATCH, T. Thermophilic ethanol production - investigation of ethanol yield and tolerance in continuous culture. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Berlin, v. 28-29, p. 549-569, Springer 1991.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, London, v.13, n. 2, p. 241-243, Mar. 1997.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 2005.

OLIVEIRA, R. **Protocolos das aulas práticas**. Mestrado em Supervisão Pedagógica do Ensino das Ciências. Escola de Ciência, Universidade do Minho. Braga, 2006. 11 f.

Disponível em:

< <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7493/1/Protocolos%20MSPEC.pdf>>. Acesso em: 7 abr. 2009.

O SUCESSO do Flex-Fuel. **Anuário Brasileiro da Cana-de-Açúcar**. Apresentação álcool, p.39-40, 2005. Disponível em:

<http://www.anuarios.com.br/port/2005/cana_de_acucar/pdfs/Cana_cap%2005_.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.

PARRO, J. E. A visão do setor petróleo. In: **PERSPECTIVAS do álcool combustível no Brasil**. São Paulo: IEE/USP, 1996. p. 166.

PERES, M. F. S.; SOUSA, S. R.; LALUCE, C. Obtaining strains of *Saccharomyces* tolerant to high temperatures and ethanol. In: SPENCER, J. F. T.; RAGOUT DE SPENCER, A. L. (Ed.). **Food microbiology protocols**. Totowa: Humana Press, 2001. Cap. 40, p. 355-367. (Methods in Biotechnology, 14).

PERES, M. F. S.; TININIS, C. R. C. S.; SOUZA, C. S.; WALKER, G. M.; LALUCE, C. Physiological responses of pressed baker's yeast cells pre-treated with citric, malic and succinic acids. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 21 p. 537-543, 2005.

PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras**. 2004. 292 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, 2004.

PIPER, P. W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339-356, Aug. 1993.

PRETORIUS, I. A. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking review. **Yeast**, Sussex, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PROCANA: os impressionantes números do setor (Safrá 2006/07). **Jornal Cana**. Disponível em: <<http://www.procana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

RETRATO da localização da produção sucroalcooleira brasileira. **Relatório Econômico**, n. 5, 20 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.siamig1.com.br/dmdocuments/Relat%C3%B3rio%20Econ%C3%B4mico%20n%C2%BA%20005%20-%2020-01-2009.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2009.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 422-430, 1999.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. Qualitative and quantitative methods for determining biological molecules. In: _____. **Biochemical techniques: theory and practice**. Atlanta: Waveland Press, 1990. Cap. 7, p. 235.

SALMON, J. M.; MURICO, J. C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 89-94, Jan. 1994.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2.

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

SOUZA, C. C.; THOMAZ, D.; CIDES, E. R.; OLIVEIRA, K. F.; TOGNOLLI, J.; LALUCE, C. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 23, p. 1667-1677, 2007.

STEWART, G. G.; D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSEL, I. Factors that influence the ethanol tolerance of brewer's yeast strains during high gravity wort fermentations. **Techn. Q. Master Brew Assoc. Am.**, Madison, v. 25, n. 2, p. 47-53, 1988.

SUMNER, E. R.; AVERY, S. M. Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mini-review. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 345-351, 2002.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on Very-High-Gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1519-24, May 1994.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Initiation of anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* by amino acids or nucleic acid bases: ergosterol and unsaturated fatty acids cannot replace oxygen in minimal media. **J. Ind. Microbiol Biotechnol.**, Hampshire, v. 21, n. 4-5, p. 247-253, 1998.

THORNTON, R. J. Wine yeast research in New-Zealand and Australia. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v.11, n. 4, p.327-345, 1991.

VENDA de flex-fuel representa 87,2% dos veículos venda dos veículos vendido em fevereiro. **Canal Rural**. 2009. Disponível em:
<<http://www.clicrbs.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&action=noticias&id=2432244§ion=>>>. Acesso em: 9 mar. 2009.

UENO, R.; URANO, N.; KIMURA, S. Effect of temperature and cell density on ethanol fermentation by a thermotolerant aquatic yeast strain isolated from a hot spring environment **Fish. Sci.**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 571-578, 2002.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Álcool combustível**: características. Disponível em:

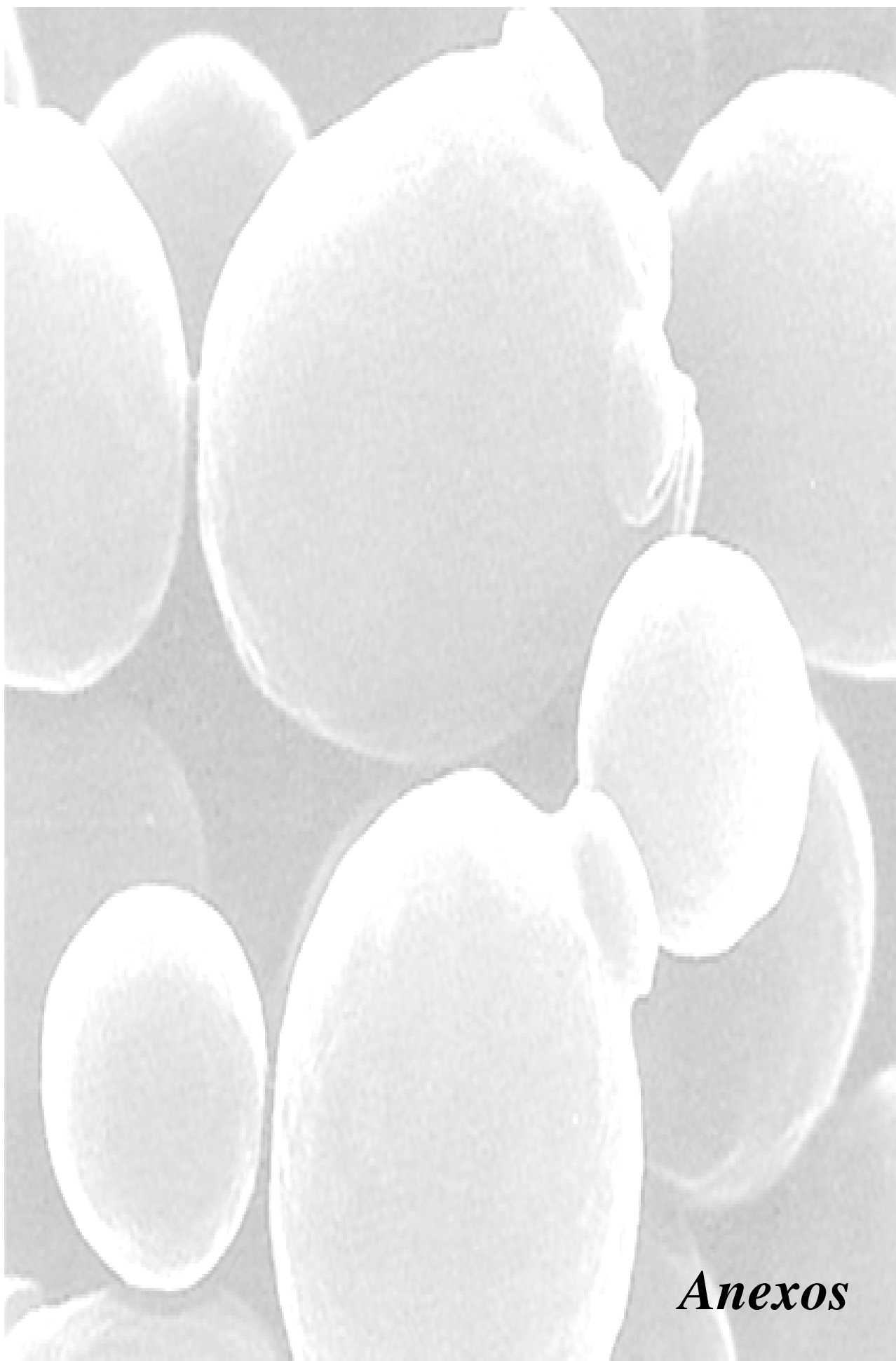
<<http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=UNICA%20em%20ação&SubSecao=álcool%20combustível&SubSubSecao=características&id=%20and%20id=1>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

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

ZEYL, C.; DEVISSER, J. A. G. M. Estimates of the rate and distribution of fitness effects of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.**, Baltimore, v. 157, n. 1, p. 53-61, Jan. 2001.

ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 407-421. 1999.

ZHAO, X. Q.; XUE, C.; GE, X. M.; YUAN, W. J.; WANG, J. Y.; BAI, F. W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. 55-60, 2009.



Anexos

ANEXO 1 -

Curva Padrão de Biomassa
(Espectrofotômetro Visível)

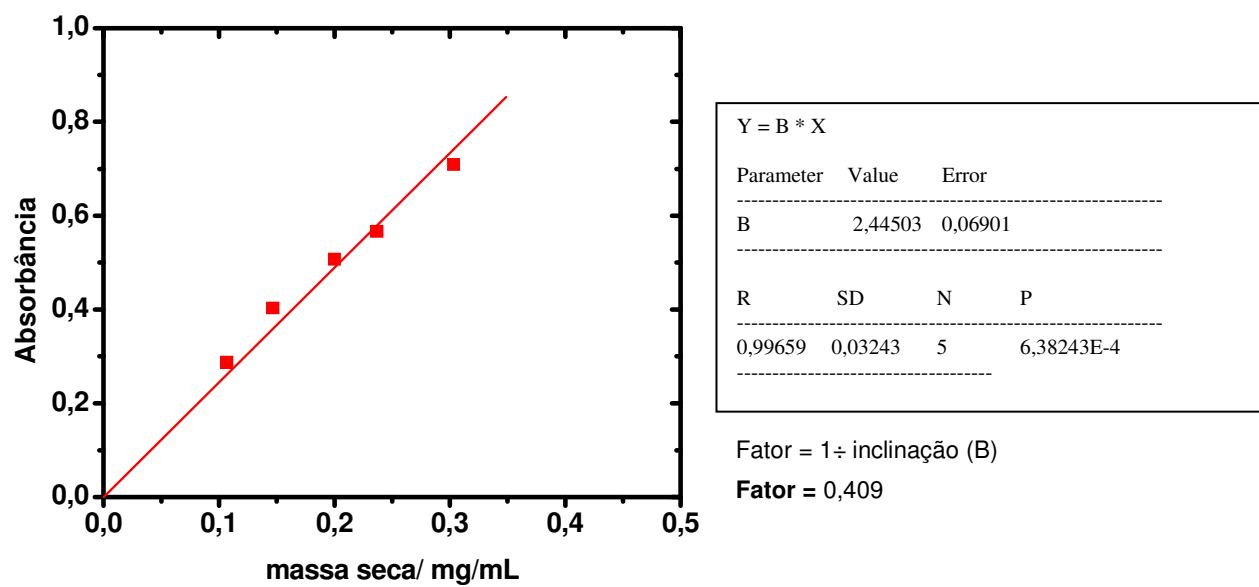
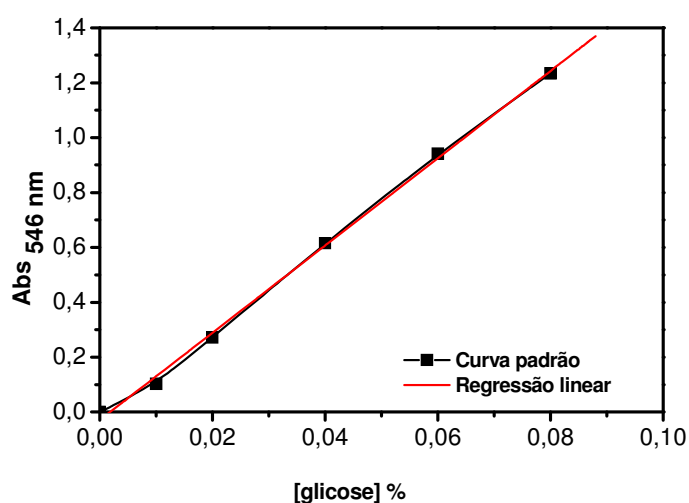


Figura 22 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura IQAr/45-1 com valores de absorbância. O coeficiente de correlação para a reta ($y = a + b.x$) foi de 0,9966, o coeficiente angular a foi de 2,44503 e o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,409 para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22. As células foram propagadas em meio sintético (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1998) contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose e enriquecido com 20 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

ANEXO 2 -

Curva Padrão de Glicose 0,2%
(Espectrofotômetro Visível)



Regressão Linear da Curva:

$$\text{Abs} = B * [\text{gli}]$$

Parametro	Valor	Erro		
Abs	-0,02898	0,01567		
B	15,89474	0,34904		
R	Dp	N	P	
0,99904	0,02406	6	<0.0001	

Figura 23 - Curva de solução de glicose 0,2% para a dosagem do açúcar residual pelo método de 3,5 DNS (MILLER, 1959). A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 15,89474$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,99904$) e fator de conversão de absorbância em concentração de açúcares redutores ($F = 0,063$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22), destinada a correlacionar a concentração de glicose e absorbância dos hidrolisados.

ANEXO 3 -

Curva Padrão de Proteína (Albumina 1,0%)
(Espectrofotômetro Visível)

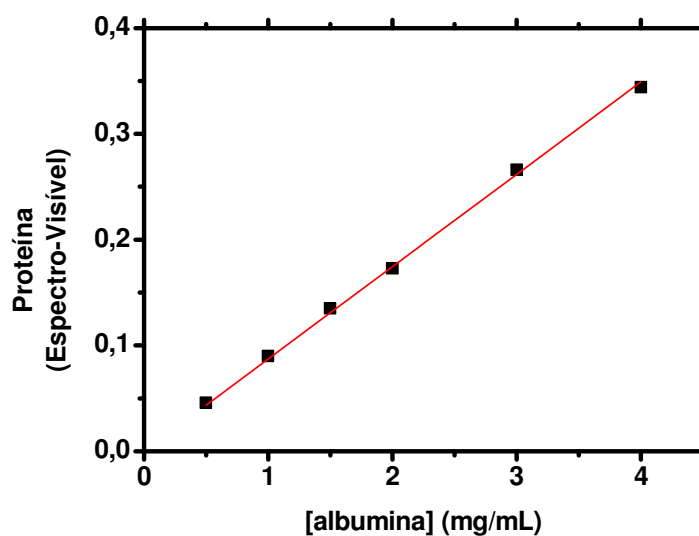


Figura 24- Curva-padrão de solução de soro albumina bovina para a dosagem do de proteína total pelo método do Biureto (**ROBYT; WHITE, 1987**). A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 0,08725$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,998$) e fator de conversão de absorbância em concentração de proteína ($F = 0,115$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22).

ANEXO 4 -

Curva Padrão de Trealose
(Espectrofotômetro UV-Visível)

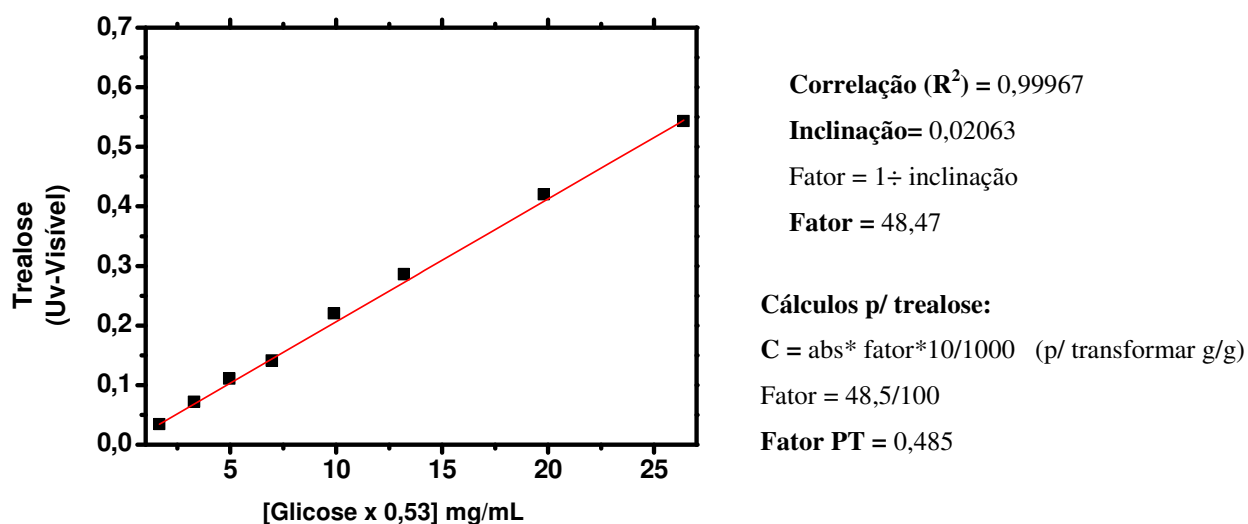
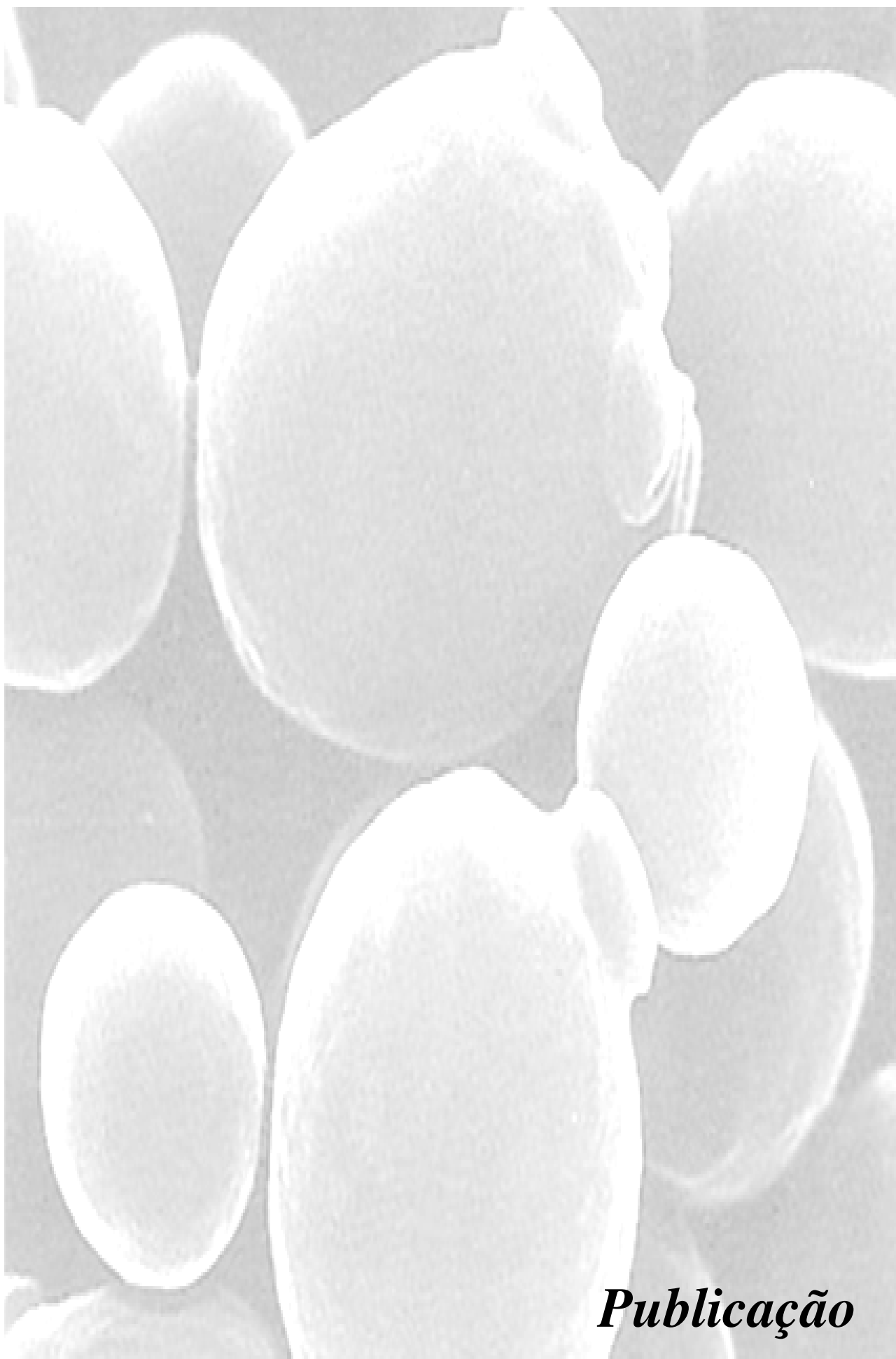


Figura 25 - Curva-padrão de solução de glicose para a dosagem de trealose. A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorbância em concentração de trealose ($F = 0,485$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382.



Publicação

Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability

Cecília Laluce · João Olímpio Tognoli ·
Karen Fernanda de Oliveira · Crista Serra Souza ·
Márcia Rezende Moraes

Received: 27 October 2008 / Revised: 16 January 2009 / Accepted: 19 January 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Aiming to obtain rapid fermentations with high ethanol yields and a retention of high final viabilities (responses), a 2^3 full-factorial central composite design combined with response surface methodology was employed using inoculum size, sucrose concentration, and temperature as independent variables. From this statistical treatment, two well-fitted regression equations having coefficients significant at the 5% level were obtained to predict the viability and ethanol production responses. Three-dimensional response surfaces showed that increasing temperatures had greater negative effects on viability

than on ethanol production. Increasing sucrose concentrations improved both ethanol production and viability. The interactions between the inoculum size and the sucrose concentrations had no significant effect on viability. Thus, the lowering of the process temperature is recommended in order to minimize cell mortality and maintain high levels of ethanol production when the temperature is on the increase in the industrial reactor. Optimized conditions (200 g/l initial sucrose, 40 g/l of dry cell mass, 30 °C) were experimentally confirmed and the optimal responses are 80.8 ± 2.0 g/l of maximal ethanol plus a viability retention of $99.0 \pm 3.0\%$ for a 4-h fermentation period. During consecutive fermentations with cell reuse, the yeast cell viability has to be kept at a high level in order to prevent the collapse of the process.

C. Laluce (✉) · M. R. Moraes
Department of Biochemistry and Biotechnological Chemistry,
Instituto de Química de Araraquara-UNESP,
Caixa Postal 355,
14801-070 Araraquara, São Paulo, Brazil
e-mail: claluce@iq.unesp.br

M. R. Moraes
e-mail: mrg@iq.unesp.br

J. O. Tognoli
Department Analytical Chemistry,
Instituto de Química de Araraquara-UNESP,
Caixa Postal 355,
14801-070 Araraquara, São Paulo, Brazil
e-mail: tognoli@iq.unesp.br

K. F. de Oliveira · C. S. Souza
Programa de Pós-Graduação Interinstituições em Biotecnologia,
Instituto de Biológicas Ciências,
Avenida Prof. Linus Pauling, 1730-Edifício ICB-IV,
São Carlos-Cidade Universitária,
CEP: 05388-900 São Paulo, São Paulo, Brazil

K. F. de Oliveira
e-mail: biotec@ibc.usp.br

C. S. Souza
e-mail: biotec@ibc.usp.br

Keywords RSM · Viability · Ethanol production ·
Temperature · Sugar concentration · Inoculum size

Introduction

High ethanol yields in a short fermentation time are an economically relevant factor in industrial ethanol production. However, this is dependent on the yeast strain, type of process (batch or fed-batch), cell density, temperature, and sugar concentration and enrichment of the medium with the proper nutrients, along with other factors that influence the microbial activity. Studies related to ethanol production have been carried out in complex and synthetic media. Although these have not yet being implemented on an industrial scale due to economical reasons, a synthetic medium exhibits favorable characteristics over the traditional complex or natural media since it is composed of pure chemicals in precisely known proportions (Zhang and Graham 1999).

High sugar concentrations can inhibit both yeast growth and fermentative activities. As described in literature (Casey and Ingledew 1985), ethanol inhibition becomes significant in the concentration range of 15–25% sugar (w/v), while complete inhibition of the fermentation has been reported at 40% glucose (w/v) in batch cultures (Holzberg and Margalit 1981).

Typical yeast fermentations require temperatures between 30 and 35 °C to maximize ethanol production (Danore et al. 1989). Yeast strains used for the commercial production of ethanol usually produce lower levels of ethanol at high temperatures. Concentrations of ethanol above 3% (w/v) lead to decreases in the maximal temperature of growth (Casey and Ingledew 1986). Strains isolated from Brazilian alcohol plants have produced high levels of ethanol in batch cultures operating within the range of 35 to 40 °C in a rich medium containing sucrose, yeast extract, and peptone (Laluce et al. 1991), but losses in viability were greater at 40 °C.

Ethanol is well known as an inhibitor of microbial growth. The rate of ethanol production and its accumulation within cells of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations leads to sharp drops in viability (Dasari et al. 1990). In addition, the loss in viability leads to decreases in the activity of the alcohol dehydrogenase due to high levels of internal ethanol (Nagodawithana et al. 1974). Rapid fermentation also enhances thermal death (Loureiro and van Uden 1986; Nagodawithana and Steinkraus 1976). Nevertheless, some strains of *S. cerevisiae* show tolerance to ethanol and can be adapted to high concentrations of alcohol (Alexandre et al. 1994). A tolerant strain of yeast isolated from a Brazilian alcohol plant was able to produce ethanol in batch cultures having up to 8% (v/v) ethanol added initially as described by Pires and Laluce (1998). Any natural strain of *S. cerevisiae* is able to tolerate up to 14–16% (v/v) of ethanol excreted into the medium (Casey et al. 1983) or even up to 21% (v/v), depending on the nutritional supplementation (Thomas and Ingledew 1992). Ethanol also induces cell lysis (Jones 1989) due to the formation of cross-linked peptidoglycan, which is aggravated by increasing the temperature to above 35 °C.

Statistical methods can either identify or quantify the various interactions occurring between the independent variables and the corresponding microbial responses. Mathematical models generated by the statistical methods allow the prediction of process responses such as ethanol production and viability. In the present work, experimental design and response surface methodology (RSM) were used to study the effects of increasing inoculum size, sucrose concentration, and temperatures on rapid fermentations with small variations in viability during ethanol production in synthetic medium (Thomas et al. 1998). Rapid fermentation was defined as a fermentation in which the ethanol

level increases from zero to 9.5% (v/v) in 6-h or less (Nagodawithana et al. 1974).

Materials and methods

Microorganism

The hybrid strain 63M used in this study was constructed using genetic segregants derived from industrial isolates of *S. cerevisiae* (Laluce et al. 2002). This yeast was able to grow overnight on yeast-peptone-dextrose (YPD) plates at 40 °C (Souza et al. 2007). A stock culture was stored at 4 °C on solid YPD medium with transfers to fresh medium every 4 months.

Inoculum propagation

For the inoculum propagation, the synthetic medium described by Thomas et al. (1998) was modified by replacing the glucose with sucrose (carbon source) and by adding 2% yeast extract to improve cell proliferation. Separate solutions containing salts, trace elements, vitamins, growth, and survival factors were prepared as described by the authors (Thomas et al. 1998) and then mixed to give the concentration of each ingredient as required for the final medium: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaCl , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KI , MnSO_4 , CuSO_4 , Na_2MoO_4 , CoCl_2 , FeCl_2 , biotin, calcium pantothenate, folic acid, *myo*-inositol, niacin, *p*-aminobenzoic acid, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamine hydrochloride, ergosterol, and Tween 80. The propagation was carried out in 250-ml Erlenmeyer flasks, initially containing 50 ml of synthetic medium (Thomas et al. 1998), which were inoculated with fresh culture to start the propagation with an initial cell density of 0.85 g/l. After 16-h propagation at 30 °C in a rotary shaker operating at 125 rpm, cells were harvested by centrifugation at $5,000\times g$ for 2 min at 4 °C. The harvested cells were resuspended in sterilized water and the washed cell pellet was separated by centrifugation. In the next step, the washed cells were again resuspended in sterilized water, resulting in a highly concentrated yeast cream (160 g/l in dry weight or 48%, v/v), which was used to start the high cell density fermentations.

Fermentation procedures

The synthetic medium (Thomas et al. 1998) containing ammonium sulfate (nitrogen source) and other ingredients as described above, except glucose (carbon source replaced with sucrose), was used to study the effects of the independent variables (sucrose, temperature, and inoculum) on viability and ethanol formation during the fermentation.

Appl Microbiol Biotechnol

Yeast extract was not added to this medium. A solution twice as concentrated (50 ml) containing the different medium ingredients was prepared and sterilized as described by the authors (Thomas et al. 1998) and then mixed before adding different amounts of sucrose or inoculum as follows: sucrose concentration varying from 100 to 200 g/l in the final medium, inoculum amounts varying from 30 g/l (around 9%, v/v) to 40 g/l (dry weight), and fermentation temperature varying from 30 to 40 °C. The pH of the medium was also adjusted to 4.5 prior to inoculation. Erlenmeyer flasks were sealed closed using perforated rubber stoppers to which a glass tube was inserted to allow the fermentation gas to escape from the 100 ml of final medium. A second glass tube was inserted to the rubber stopper to collect samples from the bottom of the Erlenmeyer flasks during the fermentation. The flasks were then transferred to a rotary shaker operating at 100 rpm for the duration of the fermentation period.

Analytical assays

The determinations were cell viability using the methylene-blue method (Lee et al. 1981); total reducing sugar in acid hydrolysates (1.2 M HCl for 10 min at 60 °C), using the 3,5-dinitrosalicylic acid method (Miller 1959); and ethanol concentration using a gas chromatograph (model CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brazil). For the biomass assays, cells were washed by vacuum filtration and dried at 105 °C until constant weight and expressed as grams per liter in the final medium.

Experimental design

The RSM is a technique (Box and Wilson 1951) that consists of the following: (1) the designing of experiments that will yield adequate and reliable measurements of the response of interest, (2) the determining of a mathematical model that best fits the data obtained from the design, and (3) the determining of optimal values for the experimental factors that will give maximal or minimal values for the responses. In the present study, the dependent variables were ethanol production (F_1) and viability (F_2), which were assayed after 4-h fermentation periods. The independent

variables were temperature (X_1), sucrose concentration (X_2), and inoculum size (X_3), as shown in Table 1. This table also shows that 35 °C, 150 g/l sucrose, and 35 g/l inoculum were adopted as central points to predict the dependent variables. A 2^3 full-central-composite design with replication at the central point and having six axial points ($\alpha=6$) was used for the optimization, with the data being obtained from a total of 20 experiments carried out in triplicate. Data analysis was performed using the MINITAB statistical software package (version 14.0) with a level of significance of 5% and a confidence level of 95% ($p=0.05$).

Statistical analysis of data by RSM

RSM is a sequential procedure with the initial aim of allowing the researcher to rapidly and efficiently obtain data near optimum values. It includes a full factorial central composite design and regression analysis. In the present work, response surface models were fitted to the ethanol production and viability using the MINITAB software package (version 14.0). The experimental results of the RSM were fitted via the response surface regression procedure using the following second-order polynomial equation:

$$F_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3, \quad (1)$$

where the following can be found: F_i is the predicted response; X_1 , X_2 , and X_3 are the independent variables; b_0 is the intercept term; b_1 , b_2 , and b_3 are the linear effects; b_{11} , b_{22} , and b_{33} the square effects; and b_{12} , b_{23} , and b_{13} are the interaction terms. F represents viability (F_1 , percent) or ethanol production (F_2 , grams per liter), while X_1 (temperature), X_2 (sucrose concentration), and X_3 (inoculum concentration) were independent values. This equation represents an empirical model, in which the response functions allow the estimation of responses due to changes in the dependent variables. This model was regressed given two-fitted model equations, one for viability response (Eq. 2) and the other for the ethanol production (Eq. 3) as described in Table 3 ("Results" section).

Table 1 Levels of real and coded values of independent variables utilized in the 2^3 full central composite design

Independent variables	Symbols	Range of natural levels				
		-1.682	-1.000	0.000	+1.000	+1.682
Temperature (°C)	X_1	30	32	35	38	40
Initial sucrose concentration (g/l)	X_2	100	120	150	180	200
Yeast inoculum size (g/l)	X_3	30	32	35	38	40

Application variance analysis to the fitted models

The adequacy of the fitted model equations was evaluated by application variance analysis (ANOVA), using the MINITAB software package (version 14). If the model is not satisfactory, a more complex model with a better fit is required, and this is indicated by the analysis of variance. In this work, the *F* test for regression was taken as significant at a significance level of 5% or a 95% confidence level ($p=0.05$) for both ethanol production and viability responses. If the *F* test is significant for its lack of fit, then a more complicated model is needed. Both the *t* test (measuring how large the coefficient is in relation to its standard error) and *p* values (reflecting the chance of getting a larger *t* value and also indicating the patterns of the interaction among the variables) were used to confirm the significance factor of the model equations.

Surface and contour plots

The response surface was plotted to understand the interactions between variables and to determine each variable's optimum response level. In the present work, surface and contour plots of key variables were derived from linear (plain surface graphs) and quadratic (curved surfaces) models, fitting experimental data to calculate optimal responses for ethanol production and viability. The plots were obtained with the aid of the STATISTICA software package (version 7.0). The simultaneous interactive effects of the independent variables are shown by the three figures described in the "Results" section.

Optimization of response and model validation

The "Response Optimizer" option of the MINITAB software package (version 14) was used to search for a combination of the factors involved that jointly optimize ethanol production with the retention of a high viability. The range of viability used for optimization was between 80% and 100% and for ethanol between 68 and 100 g/l. Desirability is a measure of how well the optimal solution satisfies the aim of the responses. A desirability of one indicates complete satisfaction, while a desirability of zero indicates that the response is not acceptable. In order to validate the optimized conditions (40 g/l biomass in dry weight, 30 °C, 200 g/l sucrose) derived from the use of the "Response Optimizer", experiments were carried out in triplicate to obtain time curves for viability, ethanol production, biomass, and total residual sugar.

Results

Using factorial design and RSM, variations in viability and ethanol production were predicted as functions of the

variations in inoculum size, sucrose concentration, and temperatures.

Factorial planning

Table 2 shows the predicted and experimental data related to both the ethanol production and the viability responses, which were obtained using a factorial design. Twenty experiments were carried out in 4-h fermentation periods using different combinations of the independent variables. The highest predicted values of ethanol (77.2 g/l) and viability (87.5%) were observed in run 10, in which real values of viability and ethanol were 87.2% and 77.0 g/l, respectively. High real values of viability (around 92%) were also observed in runs 14 and 19, but the real levels of ethanol were much lower (54.6 g/l in run 14 and 68.7 g/l in run 19). Real and predicted data obtained can be low, as follows: 65.9% viability and 55.2 g/l ethanol in run 7 and 59.1% viability and 60.1 g/l ethanol in run 8, as shown in Table 2. High temperatures (38 °C in run 7 and 40 °C in run 8, as shown in Table 2) inhibited the ethanol production and killed the cells, as is indicated by the low values of viability.

Model fitting using RSM

Using the data shown in Table 2, the proposed polynomial experimental model (Eq. 1, "Materials and methods") was regressed, resulting in two expanded equations or fitted models, which are shown in Table 3, and these exhibit maximal viability (Eq. 2 or Y_1 model) and ethanol production (Eq. 3 or Y_2 model). The *R*-squared value (R^2 , coefficient of correlation resulting from the regression of the model equation) provides a way to evaluate how much the measured variability could be explained by the experimental factors and their interactions in the observed responses. The matching quality of data, provided by the model equations (Eq. 2 for viability and Eq. 3 for ethanol production as shown in Table 3), indicates that 98.7% of the variability ($R^2=0.987$) in the viability response and 98.6% ($R^2=0.986$) in the ethanol production response can be explained by the models. Regression also provides a way to evaluate the nature and the degree of correlation between dependent and independent variables. The closer the R^2 value is to 1.00, the stronger the model and the better the response predictions (Häaland 1989). The R^2 value is always between zero and one. For the ethanol production model, a $R^2=0.986$ was obtained, indicating the adequacy (or a high probability) of this model. The adjusted R^2 (adj. R^2), which was derived from the sample size and from the number of terms in the model equation, corrects the predicted R^2 value. In the present case, the differences between values of R^2 and adj. R^2 are small, and thus, they are in reasonable agreement.

Table 2 Experimental and predicted values of ethanol and viability resulting from the application of the 2^3 full-factorial-composite design

Runs	Independent variables (real values)			Yeast cell viability (%)		Ethanol (g/l)	
	Temperature (°C)	Sucrose (g/l)	Inoculum (g/l)	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	3.5	200	3.5	79.9	79.8	73.6	73.6
2	3.5	150	3.0	79.6	81.0	64.4	65.5
3	3.5	100	3.5	75.8	77.3	45.8	45.6
4	3.8	180	3.2	70.5	69.6	68.7	68.1
5	3.5	150	3.5	78.4	78.9	67.8	67.2
6	3.0	150	3.5	96.3	96.3	62.8	63.4
7	3.8	120	3.2	65.9	64.6	55.2	55.5
8	4.0	150	3.5	59.1	60.4	60.1	59.3
9	3.5	150	4.0	81.0	81.0	70.7	69.4
10	3.2	180	3.8	87.2	87.5	77.2	77.0
11	3.8	120	3.8	69.9	69.0	51.0	51.5
12	3.5	150	3.5	80.1	78.9	69.0	67.2
13	3.5	150	3.5	77.4	78.9	65.7	67.2
14	3.2	120	3.2	92.2	91.2	54.6	53.6
15	3.5	150	3.5	77.1	78.9	65.7	67.2
16	3.2	120	3.8	89.5	89.3	55.6	56.3
17	3.5	150	3.5	80.5	78.9	67.7	67.2
18	3.5	150	3.5	80.1	78.9	67.3	67.2
19	3.2	180	3.2	92.0	91.9	68.7	68.3
20	3.5	180	3.8	71.4	71.4	68.9	70.1

Positive signs in terms of the fitted equations (Eqs. 2 and 3 in Table 3) represent synergistic effects, while negative signs indicate antagonistic effects. Interactive, linear, and squared effects can be observed among independent variables. The linear equation model (Eq. 2, Table 3) shows the linear and negative effects of the temperature (X_1) and inoculum (X_3), as well as the positive effect of the interaction between temperature (X_1) and inoculum size (X_3). Effects of independent variables on ethanol production are related to a greater number of terms, as shown in Eq. 3 (Table 3). This equation shows the linear and positive effects of sucrose concentration (X_2) and temperature (X_1) on ethanol production. In addition, Eq. 3 (Table 3) shows a negative interaction between temperature (X_1) and inoculum size (X_3), but a positive interaction between sucrose concentration (X_2) and inoculum size (X_3) are also shown. Negative and quadratic effects of temperature (X_1^2) and

sucrose concentration (X_2^2) can also be observed in Eq. 3 (Table 3).

Analysis of variance (ANOVA) for the fitted models

The two fitted equations (Table 3), resulting from the analysis of variance, were a linear equation (Eq. 2) for viability and a quadratic equation (Eq. 3) for ethanol production. Table 4 describes the F values (statistical significance of the model) and p values for the viability (Eq. 2) and the ethanol production (Eq. 3) models. The regression F values were high enough to indicate statistical significance and that most of the variations in the response variables can be explained by the regression equations. Concerning the R^2 value (Table 3), both Eqs. 2 and 3 were highly significant and adequate to represent the true relationship between the three independent variables.

Table 3 Best-fit equations for viability and ethanol production responses resulting from the complete 2^3 factorial design

Response	Best-fit equations	Regression	R^2	adj. R^2
Viability (Y_1)	$Y_1 = 509.379 - 10.00X_1 - 10.723X_3 + 0.172X_1X_3$	Linear	0.987	0.975
Ethanol (Y_2)	$Y_2 = -481.349 + 23.060X_1 + 0.798X_2 - 0.229X_1^2 - 0.003X_2^2 - 0.187X_1X_3 + 0.017X_2X_3$	Quadratic	0.986	0.974

X_1 temperature, X_2 initial sucrose concentration, X_3 inoculum, F Fisher test for regression, R^2 coefficient of determination, adj. R^2 adjusted R^2

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for the linear model of viability and the squared model of ethanol production using strain 63M of *S. cerevisiae* and 4–8 fermentation periods

Responses	Sources of variations	Seq sum of squares	Adj sum of squares	Degrees of freedom	Adj mean of squares	F ratio	p Values
Viability (Fitted Eq. 2)							
	Regression	1,604.98	1,604.98	9	178.33	83.60	0.000
	Linear	1,563.83	25.03	3	8.34	3.91	0.044
	Square	9.30	9.30	3	3.10	1.45	0.285
	Interaction	31.84	31.85	3	10.62	4.98	0.023
	Residual error	21.33	21.33	10	2.13	—	—
	Lack-of-fit	10.16	10.16	5	2.03	0.91	0.540
	Pure error	11.17	11.17	5	2.24	—	—
	Total model	1,626.31	—	19	—	—	—
Ethanol (Fitted Eq. 3)							
	Regression	1,185.92	1,185.92	9	131.77	80.43	0.000
	Linear	988.78	91.79	3	30.60	18.68	0.000
	Square	154.33	154.33	3	51.44	31.40	0.000
	Interaction	42.82	42.82	3	14.27	8.71	0.004
	Residual error	16.38	16.38	10	1.64	—	—
	Lack-of-fit	7.85	7.85	5	1.57	0.92	0.535
	Pure error	8.53	8.53	5	1.71	—	—
	Total model	1,202.31	—	19	—	—	—

Seq sequential, Adj adjusted

Concerning viability (Eq. 2), the regression *F* test was highly significant ($p=0.000$), as shown in Table 4. As the significance of the regression *F* test shows a value of 5% ($p=0.05$), the *F* test was significant for the linear regression ($p<0.05$), but not for the lack of fit and the square ($p>0.05$) of the linear model for viability (Table 4). However, the value of adj. $R^2=0.975$ obtained for the viability indicates a well-fitted model, as shown in Table 3.

Concerning ethanol production (Eq. 3 in Table 3), the *F* test for the regression (Table 4) was also highly significant ($p=0.000$). As the significance of the regression *F* test shows a level of 5% ($p=0.05$), the *F* test was significant for both the linear and square regressions ($p<0.05$), but not for the lack of fit ($p>0.05$). Thus, a well-fitted model was obtained for the equation of ethanol production, as indicated by the adj. R^2 value of 0.974 shown in Table 3. In addition, the value of adj. $R^2=0.974$ for ethanol production also indicates a well-fitted model in Table 3.

Table 5 shows the regression coefficients, standard errors of coefficients, *t* values, and *p* values for the models representing viability (Eq. 2) and ethanol production (Eq. 3). Concerning viability, Table 5 shows that the linear effects of temperature (X_1) and inoculum size (X_5) on viability (Eq. 2) were negative and significant at a 5% probability level (p value <0.05). The linear effect of sucrose concentration (X_2) on viability was negative but

not significant ($p>0.05$). Concerning interactions between variables, positive but not significant interactions (p value >0.05) were noted between temperature (X_1) and sucrose concentration (X_2 , $p>0.05$), so the coefficient X_1X_2 was omitted from Eq. 2 as described in Table 3 for viability. On the other hand, the interactions between sucrose concentration (X_2) and inoculum size (X_5) were negative but not significant, so that X_2X_5 was also omitted from Eq. 2.

In relation to ethanol production, Table 5 shows that the quadratic effects (Eq. 3 in Table 3) of temperature (X_1) and sucrose concentration (X_2) were significant ($p<0.05$), while the effect of inoculum size (X_5) was positive, although not significant ($p>0.05$). Positive and significant interactions were observed between sucrose concentration (X_2) and inoculum size (X_5), while a negative but significant interaction was observed between temperature (X_1) and inoculum size (X_5). Despite the negative coefficient, the interactive effects between temperature (X_1) and sucrose concentration (X_2) were not significant (p value >0.05), as shown in Table 5.

Three-dimensional surface and contour plots for ethanol production and viability

Figures 1, 2, and 3 show the three-dimensional response surfaces resulting from the fitted equations to investigate

Table 5 Regression coefficients, standard errors, *t* test, and significance level for the models representing ethanol production responses and viability responses as a function of variations in the independent variables in 2^3 full-central-composite design

Terms of model equations	Regression coefficient	Standard error	<i>t</i> Test	<i>p</i> Value
Viability				
Constant	509.379	114.244	4.459	0.001
X_1 (temperature)	-10.000	3.707	-2.697	0.022
X_2 (sucrose)	-0.098	0.312	-0.315	0.759
X_3 (inoculum)	-10.723	3.707	-2.892	0.016
X_1X_1	-0.020	0.043	-0.460	0.655
X_2X_2	-0.000	0.000	-0.322	0.754
X_3X_3	0.082	0.043	1.929	0.083
X_1X_2	0.012	0.006	2.082	0.064
X_1X_3	0.172	0.057	3.002	0.013
X_2X_3	-0.007	0.006	-1.259	0.237
Ethanol production				
Constant	-481.391	100.116	-4.808	0.001
X_1 (temperature)	23.030	3.240	7.004	0.000
X_2 (sucrose)	0.798	0.273	2.918	0.015
X_3 (inoculum)	3.709	3.240	1.142	0.280
X_1X_1	-0.229	0.037	-6.112	0.000
X_2X_2	-0.003	0.000	-7.947	0.000
X_3X_3	0.010	0.037	0.280	0.785
X_1X_2	-0.006	0.005	-1.182	0.264
X_1X_3	-0.187	0.030	-3.718	0.004
X_2X_3	0.017	0.005	3.304	0.008

Significance at 5% probability level; R^2 of 0.987 for ethanol production and 0.986 for viability; R^2 adjusted for ethanol production was 97.4% and 94.5% for viability

Conf. coefficients

the interactions between variables and to determine the optimal values of each factor for maximal retention of viability (linear model in Eq. 2) and ethanol production (quadratic model in Eq. 3).

The interactive effects between temperatures (X_1) and sucrose concentration (X_2) on viability and ethanol production, using 35 g/l inoculum as the central point, are shown in Fig. 1. The two response surface graphs show that increases in temperature had greater negative effects on viability (Fig. 1b) than on ethanol production (Fig. 1a). Increasing sucrose concentrations (X_2) improved ethanol production (Fig. 1a) with small effects on viability (Fig. 1b). The best value of viability (Fig. 1b) was 90% at 32 °C, while the corresponding value of ethanol produced was around 74 g/l. At 30 °C, the amount of ethanol produced was lower.

The interactive effects between temperatures (X_1) and inoculum size (X_3) are shown in Fig. 2, using 150 g/l

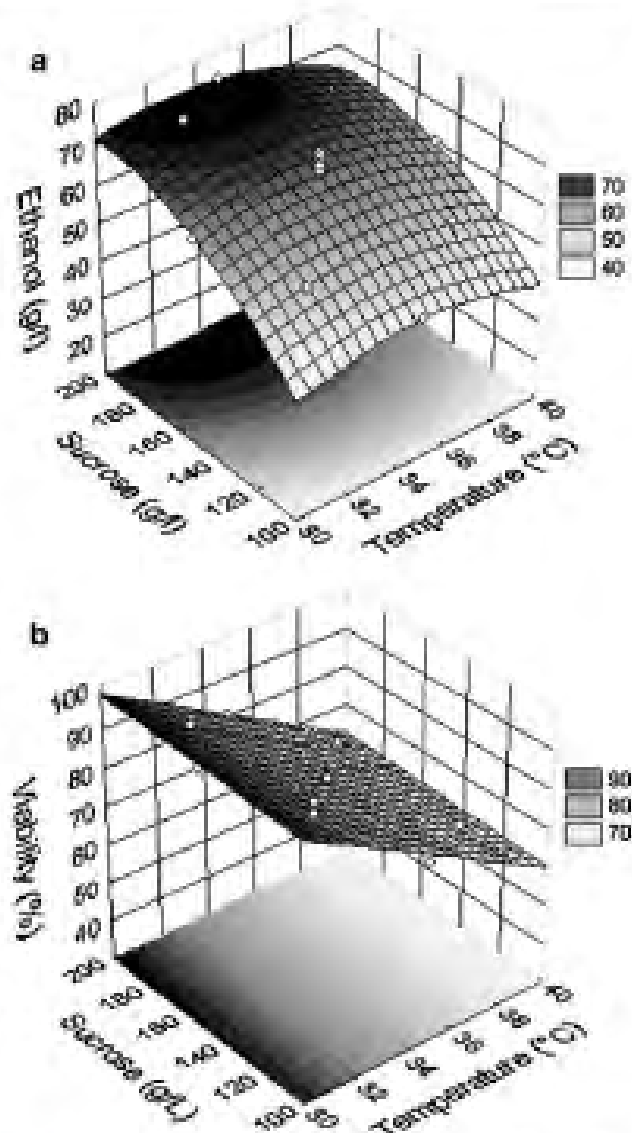


Fig. 1 Response surface curves and contour plot lines showing the variations in ethanol production (a quadratic model) and viability (b linear model) as functions of the interactive effects between temperature (X_1) and sucrose concentration (X_2) when 35 g/l inoculum is used as the central point

sucrose as the central point. The two response surface graphs show that the increases in temperature (X_1) had a greater negative effect on viability (Fig. 2b) than on ethanol production (Fig. 2a). It was observed that increasing the inoculum size (X_3) improved ethanol production (Fig. 2a) with little or no effect on viability (Fig. 2b). The maximal value of ethanol was seen to around 32 °C (around 73 g/l ethanol), while the corresponding viability was 90%. The maximal viability was obtained with 40 g/l inoculum at 30 °C, but the ethanol accumulated was lower. Thus, increases in temperature improved ethanol production (Fig. 2a) up to a threshold temperature of 32 °C, and then

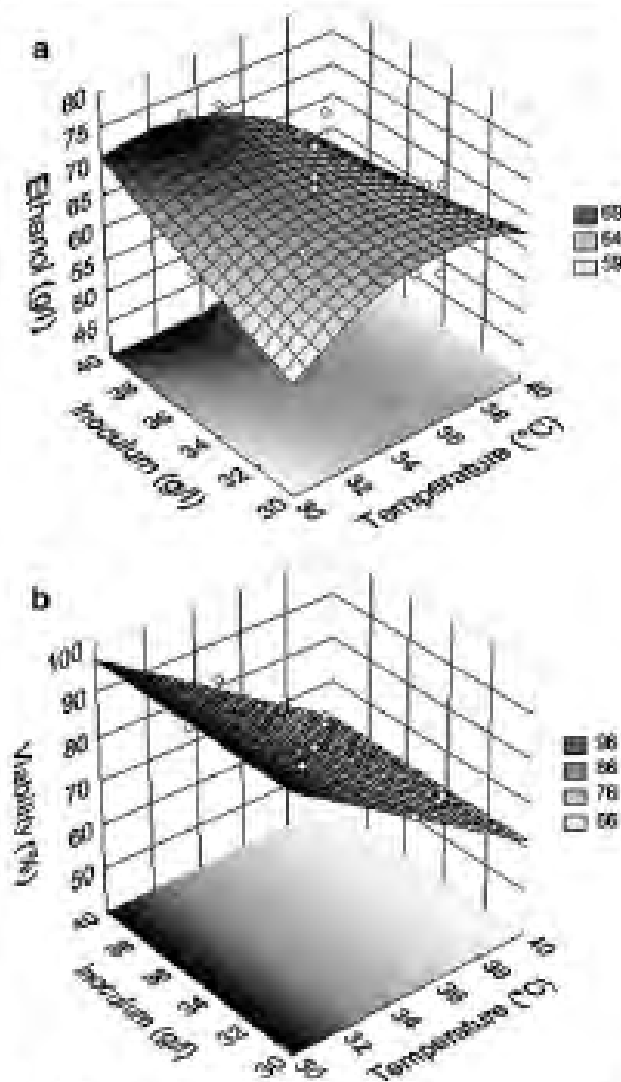


Fig. 2 Response surface curves and contour plot lines showing the variations in ethanol production (a quadratic model) and viability (b linear model) as functions of the interactive effects between sucrose concentration (X_2) and inoculum size (X_1) when 35 °C is used as the central point

ethanol levels decreased above this temperature showing negative effects on viability (Fig. 2b). The viability (Fig. 2b) did not increase with the inoculum size (X_1).

The interactive effects between amounts of sucrose (X_2) and inoculum (X_1) are shown in Fig. 3, using 35 °C as the central point. The two response surface graphs show that increases in sucrose concentration (X_2) had a greater positive effect on ethanol production (Fig. 3a) than on viability (Fig. 3b). In addition, sucrose concentration (X_2) and inoculum size (X_1) did not have impacting effects on viability (Fig. 3b), as is also shown in Fig. 2. The maximal value of ethanol produced was around 8.0 g/l, while the corresponding viability was around 80%.

Optimization and experimental validation of the models

The determination of the optimal values of the factors that affected the ethanol production and viability (dependent variables) was attempted using the Response Optimizer of the MINTAB software package (version 14). Based on the Response Optimizer, the predicted optimal fermentation conditions were as follows (Table 6): 200 g/l sucrose, 30 °C, and 40 g/l inoculum.

The experimental validation of these three optimal conditions (predicted values) was carried out in shaken flasks, and the corresponding time curves of the fermentation process are shown in Fig. 4. The experimental responses (Fig. 4 and Table 6) were: $99.0 \pm 3.0\%$ viability and 80.8 ± 2.0 g/l ethanol

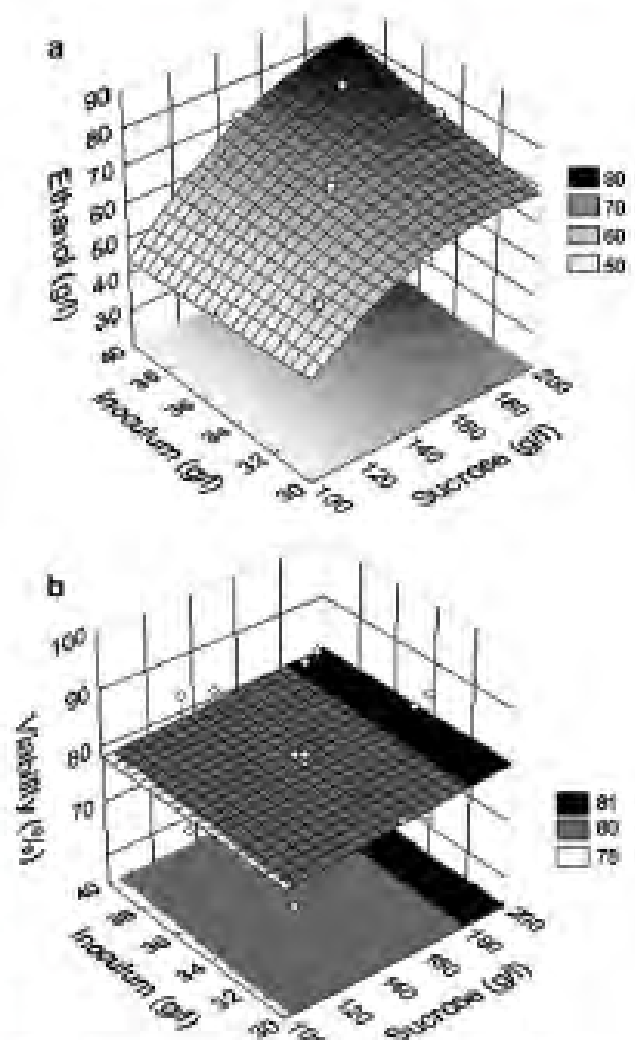


Fig. 3 Response surface curves and contour plot lines showing the variations in ethanol production (a quadratic model) and viability (b linear model) as functions of the interactive effects between the inoculum size (X_1) and sucrose concentration (X_2) when 35 °C is used as the central point

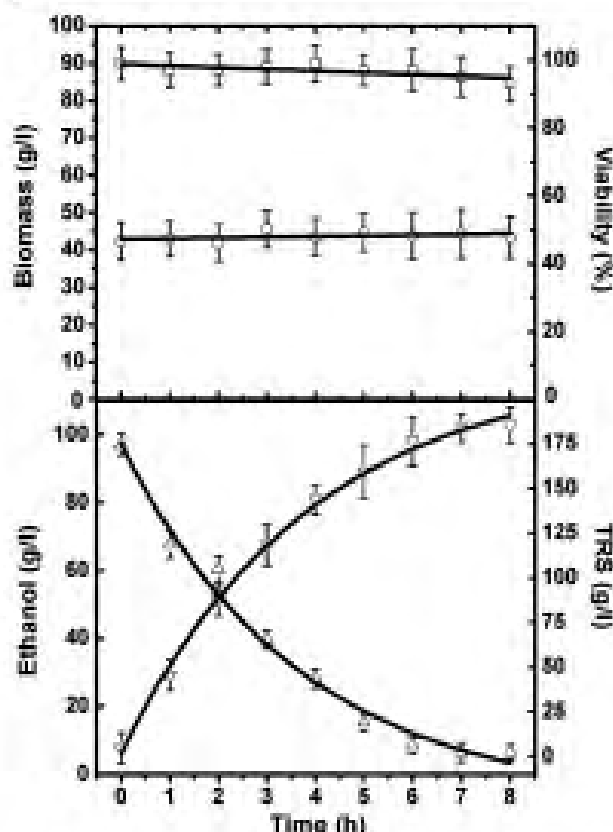


Fig. 4 Kinetics of growth and fermentation by strain 63M under the best conditions as indicated by the MINITAB's Response Optimizer (software package, version 14): biomass (circles), viability (squares), ethanol (upside-down triangles), total reducing sugar or TRS (right-side-up triangles)

in a 4-h fermentation. In a 7-h fermentation, the responses were (Fig. 4): 102.1 ± 4.0 g/l ethanol and $95.0 \pm 2.2\%$ viability. The initial biomass (Fig. 4) was 42.4 ± 2.0 g/l and the final biomasses were 43.4 ± 2.2 g/l in 4 h and 44.5 ± 2.8 g/l in 7 h of fermentation.

Discussion

An economically relevant factor associated with industrial ethanol production is to obtain high ethanol yields over a succession of fast fermentation cycles, in which cells from one cycle are used as inoculum of the next fermentation cycle. The retention of high viabilities during the fermentation cycles is a prerequisite to carry out a long-lasting succession of fermentation cycles. In the present study, short fermentation times were obtained by using high amounts of inoculum to start simple batch fermentations at high cell density. However, conditions for growth and metabolism at high cell densities are less favorable due to hindered access to nutrients, space limitations, and cell interactions (Jarzechowski et al. 1989). In addition, variation in temperature often occurs in the summertime due to fluctuations in the temperature of the cooling water of the bioreactors mainly in tropical climates. To this end, the optimization of independent variables (temperature, sucrose concentration, and inoculum size) and the corresponding responses (ethanol produced and viability retention) were obtained in the present work using a 2^3 full-central-composite design.

A factorial design (Table 2) involving predicted and experimental data indicated that the variations in viability at the end of the fermentation did not necessarily reflect the variations in ethanol production. High levels of viability were obtained, but the corresponding levels of ethanol can be much lower than expected. This was due to the kind of interactive effects between the independent variable. In literature (Dasari et al. 1990), increases in viability have been described as related to decreases in ethanol yields due to the inhibitory effects of ethanol.

In the present work, two fitted equations (Eqs. 2 and 3) were obtained, and they were highly significant and adequate to represent the true relationship between the

Table 6 Response optimization using the Response Optimizer of the MINITAB software package (version 14)

Parameters	Goal	Lower	Target	Upper	Weight
Viability (%)	Maximal	80	90	100	1
Ethanol (g/l)	Maximal	68	83	100	1
Global solution					
Temperature = 30 °C					
[Sucrose] = 200 g/l					
[Inoculum] = 40 g/l					
Predicted responses					
Viability = 90.00%, desirability = 1.000					
Ethanol = 82.65 g/l, desirability = 0.9770, composite desirability = 0.9884					
Experimental responses					
Viability = $99.0 \pm 5.4\%$					
Ethanol = 80.8 ± 4.3 g/l					

three independent variables, as shown by the R^2 values, as shown for ethanol production and viability. The interactive effects between the process variables can be synergistic or antagonistic, as shown by the regression coefficients (Table 5) and responses surface graphs.

Concerning the interaction between ethanol accumulation and inoculum size, the response surface graph showed that increasing ethanol yields can be obtained using increasing inoculum sizes. As also described in literature (D'Amore et al. 1989), the rate and level of ethanol produced increased with the increases in inoculum sizes. In addition, Vega et al. (1987) proposed a mathematical model, which showed that increasing amounts of inoculum decreased the severity of ethanol inhibition. However, a high level of inoculum leads to rapid fermentation that may not always be favorable to the process depending on the strain and levels of ethanol produced. In the present work, the interaction between sugar concentration and inoculum sizes led to increases in the levels of the ethanol produced due to a strong and positive interaction between sugar concentration and inoculum size in high-cell-density cultures.

As observed in this work, interactions between sucrose concentration and inoculum size did not affect the final viability of the process in high-cell-density cultures. However, growth inhibition and cell mortality can be observed due to the increases in ethanol toxicity in media with high sugar concentration, and this toxicity is aggravated at high temperatures (Gubb and Mason 1993; present work). In addition, correlations between the drops in viability and a massive leakage of intracellular metabolites, which were particularly severe above 10% ethanol in the media, have been described (Cot et al. 2007). If consecutive and/or abrupt drops in viability frequently occur, the fate of the fermentation process is its own collapse. When this happens, the entire process has to be restarted, incurring great economic losses for distilleries.

The experimental assays confirmed the reliability of the two mathematical models proposed to predict the variations in viability and ethanol production during fermentation in the present work. Despite the very low biomass accumulated at the end of the fermentation processes in the validation experiments (Fig. 4), the value of the final viability was kept at a high value ($95.0 \pm 2.2\%$) for the 7-h fermentation, indicating that the cell population was alive in a quasistationary phase. A succession of fermentation cycles with cell reuse (cells from one cycle used to inoculate the next cycle) is not possible when significant drops in cell mass or viability are observed during the fermentation cycles. Nevertheless, a succession of fermentation cycles can be carried out over months at the industrial scale when cell proliferation is observed, and this indicates that the yeast cell population has been kept robust and healthy during the fermentation processes.

Values of optimized responses (viability and ethanol production) depend on the type of process (batch or continuous process), yeast strain, and other independent variables (nutrients and their concentrations, aeration, agitation, and so on), and these were not involved in this optimization study. Using a batch culture, kinetics of ethanol production from molasses was optimized by other authors (Rivera et al. 2006), showing that the maximal value of biomass (X_{max}) was obtained at 28 °C and P_{max} (ethanol) at 31 °C. In the present work, the experimental validation of the statistical data carried out in batch cultures (Fig. 4) showed a maximal ethanol production (102.1 ± 4.0 g/l) from 200 g/l sucrose after 7 h of fermentation at 30 °C without drops in viability (Fig. 4), but variations in biomass were not observed due to the high number of cells used as inoculum.

As indicated in the present work, it seems feasible to predict the effects of sugar concentration, temperature, and inoculum size on viability and ethanol production for the operation of alcohol plants using statistical methodologies. When the sugar concentration increases, the process temperature has to be decreased in order to prevent drops in viability due to the ethanol-induced lethality of increasing amounts of ethanol produced by the yeast cells. Thus, the lowering of the process temperature is recommended in order to minimize cell mortality and maintain high levels of ethanol production when the temperature is increasing in the industrial reactor.

The batch cultures used in the present work have some limitations, mainly related to high sugar concentrations and ethanol yields. To overcome these problems, the fed-batch culture techniques have often been employed. In a pulse fed-batch culture using the same yeast strain as was used in the present work, high ethanol yields were obtained without significant variations in viability at temperatures as high as 37 °C (Souza et al. 2007).

Acknowledgments We are grateful to FAPESP for research grant no. 2005/02840-0.

References

- Alexandre H, Roussaux I, Charpentier C (1994) Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem* 20:173–183
- Box GEP, Wilson KB (1951) On the experimental attainment of optimum condition. *J R Stat Soc* 13:1–45
- Carey GP, Ingledew WM (1985) Reevaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewer's yeast. *J Am Soc Brew Chem* 43:75–83
- Carey GP, Ingledew WM (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *Crit Rev Microbiol* 13:219–280
- Carey GP, Magnus CA, Ingledew WM (1983) High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. *Biotechnol Lett* 5:429–434

- Cot M, Lorez M, François J, Benabib L (2007) Physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res* 7:22–32
- D'Amore T, Celotto G, Russell L, Stewart GG (1989) Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme Microb Technol* 11:411–416
- Douat G, Worth MA, Connor MA, Parnment NB (1990) Reasons for the apparent difference in the effects of produced and added ethanol on culture viability during rapid fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 35:109–122
- Guthrie CF, Mawson AJ (1993) Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnol Lett* 15:621–626
- Hadard PD (1989) Statistical problem solving. In: Hadard PD (ed) *Experimental design in biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp 1–18
- Hokberg IB, Margalith P (1981) Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 13:133–140
- Jurelski AR, Malinowski JI, Costa G (1989) Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. *Biotechnol Bioeng* 34:1225–1230
- Jones RP (1989) Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microb Technol* 11:130–153
- Laluce C, Palmieri MC, Lopes da Cruz RC (1991) Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperature and high cell densities. *Biotechnol Bioeng* 37:528–536
- Laluce C, Sousa CS, Abad CL, Costa EAL, Walker GM (2002) Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:140–144
- Lee SS, Robinson FM, Wang HY (1981) Rapid-determination of yeast viability. *Biotechnol Bioeng Symp* 11:641–649
- Loureiro V, van Uden N (1986) Roles of the specific growth rate and the ethanol concentration in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 28:1443–1445
- Miller GL (1959) Use of dimethylglycine reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Nagodawithana TW, Steinhaus KH (1976) Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “rapid fermentations”. *Appl Environ Microbiol* 31:158–162
- Nagodawithana TW, Castellano C, Steinhaus KH (1974) Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. *Appl Microbiol* 28:383–391
- Pereira MPS, Laluce C (1998) Ethanol tolerance of thermotolerant yeast cultivated on mixtures of sucrose and ethanol. *J Ferment Bioeng* 85:388–397
- Rivers EC, Costa AC, Ando DIP, Mangeri F, Maciel MRW, Maciel Filho R (2006) Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperatures. *Process Biochem* 41:1682–1687
- Souza CS, Thomas D, Cides ER, Oliveira KF, Tognelli JO, Laluce C (2007) Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1667–1677
- Thomas KC, Ingledew WM (1992) Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 10:61–68
- Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM (1998) Initiation of anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* by amino acids or nucleic acid bases: ergosterol and unsaturated fatty acids cannot replace oxygen in minimal media. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21:247–253
- Vega JL, Navarro AR, Chaves EC, Gaddy JL (1987) Effects of inoculum size on ethanol inhibition, modeling and other fermentation parameters. *Biotechnol Bioeng* 29:633–638
- Zhang J, Gresham R (1999) Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:407–421