

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

**Produção de etanol a 40-42°C em uma co-
cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e
*Issatchenkia orientalis***

JÉSSICA CAROLINA MEDINA GALLARDO

Dissertação de Mestrado
2010



JÉSSICA C. MEDINA GALLARDO

**PRODUÇÃO DE ETANOL A 40-42°C EM UMA
CO-CULTURA DE *Saccharomyces cerevisiae*
E *Issatchenkia orientalis***

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

Orientadora: **Profa. Dra. Cecília Lalue**

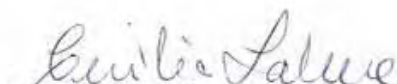
Araraquara
2010

JÉSSICA CAROLINA MEDINA GALLARDO

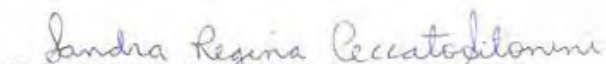
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Cecília Lalue (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Maria Célia Bertolini
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Sandra Regina Ceccato Antonini
Centro de Ciências Agrárias - UFSCar, Araras

*A DIOS,
por iluminar mi camino en cada paso que doy
con su infinita bondad, sabiduría y amor.*

*A mis padres Godofredo y Gabriela,
a quienes tanto admiro, mis ejemplos de vida...
por enseñarme a luchar incansablemente para conquistar mis sueños,
por el apoyo incondicional cuando decidí embarcarme en esta aventura,
por su gran amor, dedicación, comprensión, confianza y
por ayudarme a que este momento llegara.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida, pelas pessoas e oportunidades que ELE tem colocado no meu caminho dia a dia.

A minha orientadora Profa. Cecília Laluze pela dedicação, paciência, incentivo, confiança, carinho e pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Luiz Fernando, Karen, Vinicius, Meline, Daniel, Maria Olivia, Leonardo e Ismael, pela ajuda, colaboração, pelo convívio harmonioso, pelas conversas, brincadeiras e risadas.

A minha amiga Maria Olivia pela sua bela amizade, sua ajuda, confiança, pela palavra no momento certo e especialmente pela cumplicidade.

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

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

Aos meus pais, mesmo estando longe, souberam me acalmar confortando-me nos momentos mais tortuosos oferecendo palavras de incentivo e por todos os seus ensinamentos. Serei eternamente grata a vocês!

Ao meu irmão Flavio pela amizade, carinho e apoio incondicional.

Ao meu irmão Doaner e meu primo Paolo por torcerem sempre por mim.

Ao Julio César, pelo amor, compreensão e confiança.

As minhas “famílias” Medina e Gallardo pelo apoio e carinho.

A todos os meus amigos de Arequipa-Perú, que apesar da distância sempre me demonstraram sua amizade. Pelas lembranças que até hoje me acompanham e que me fazem reviver aqueles dias com vocês.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e colaboração.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Resumo

RESUMO

Uma levedura selvagem capaz de produzir etanol a temperaturas acima das toleradas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser útil ao processo de produção de etanol durante períodos de elevações da temperatura. Leveduras do gênero *Issatchenkia orientalis* são encontradas em processos industriais de fabricação de pães e bebidas alcoólicas. Esta levedura é capaz de converter glicose e frutose em etanol a temperaturas tão altas quanto 42°C. O presente trabalho teve como objetivo inicial selecionar as melhores linhagens da levedura *I. orientalis* quanto a sua capacidade de fermentar melaço de cana-de-açúcar e outras fontes de carbono a temperaturas maiores que 40°C. Um segundo objetivo consistiu em produzir etanol a partir de melaço utilizando a melhor linhagem de *I. orientalis* em co-cultura com a levedura *S. cerevisiae*. Para cumprir este propósito foram realizados, inicialmente, ensaios qualitativos de assimilação e fermentação com os isolados de *I. orientalis* da nossa coleção a 40°C. As linhagens ensaiadas mostraram diferentes características quanto a sua capacidade de assimilação (crescimento em meio sólido) e fermentação de sacarose e melaço (ensaio de Durham), apresentando intensidades variadas de crescimento, morfologias diferentes das células e colônias e formação de película no meio líquido. Estes ensaios qualitativos permitiram selecionar a linhagem 195B de *I. orientalis* para os estudos de fermentação em batelada simples. Esta linhagem foi capaz de assimilar melaço não hidrolisado, melaço hidrolisado, sacarose, frutose e glicerol a 40°C e de fermentar melaço não hidrolisado na mesma temperatura, além de produzir etanol em meio YPD a pH 2,5 e 40°C com pouca perda de viabilidade. Devido à incapacidade da linhagem 195B em fermentar a sacarose contida no melaço, foi estabelecida uma co-cultura desta linhagem com a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae*. O inóculo misto (1 parte de *S. cerevisiae* : 3 partes de *I. orientalis*) permitiu fermentar melaço a 42°C com pouca perda de viabilidade e com níveis de etanol finais da ordem de 63,0-68,0 g/L após 10-12h de fermentação usando uma concentração total de células iniciais de 10 mg/mL (massa seca), a qual foi equivalente a $9,61 \times 10^7$ células/mL de *S. cerevisiae* e $5,95 \times 10^8$ células/mL de *I. orientalis*.

Palavras-chave: *Issatchenkia orientalis*. *Saccharomyces cerevisiae*. Co-cultura. Etanol. Temperaturas elevadas. Melaço de cana-de-açúcar.

Abstract

ABSTRACT

Some wild yeasts that produce ethanol at temperatures above those usually tolerated by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* may be useful to the ethanol production process during periods of elevated temperatures. *Issatchenkia orientalis* is yeast found in industrial processes for manufacturing of bread and drinks. This yeast is capable of converting glucose and fructose into ethanol at temperatures as high as 42°C. The initial aim of the present work was the selection of the best strains of *I. orientalis* capable of fermenting sugarcane molasses and other carbon sources at temperatures above 40°C. A second objective was to produce ethanol from molasses using one of the best strain of *I. orientalis* in co-culture with a strain of *S. cerevisiae*. To accomplish these purposes qualitative assays of assimilation and fermentation at 40°C were carried out using the isolates of *I. orientalis* from our collection. Tested strains showed different characteristics regarding their ability to assimilate (growth on solid medium) and to ferment sucrose and molasses (Durham assay), showing a diversity of growth intensities, differences in cell and colony morphologies and film formation in the liquid media. These qualitative assays allowed us to select the strain 195B of *I. orientalis* for studies using simple batch fermentations. This strain was able to assimilate non-hydrolyzed molasses, hydrolyzed molasses, sucrose, fructose and glycerol at 40°C and to ferment non-hydrolyzed molasses at the same temperature. Moreover, this strain was able to produce ethanol at pH 2.5 and 40°C in YPD with little loss in viability. Due to the inability of strain 195B to ferment the sucrose present in molasses, a co-culture involving this strain and strain IQAr/45-1 of *S. cerevisiae* was established. The mixed inoculum (1 part of *S. cerevisiae* : 3 parts of *I. orientalis*) allowed to ferment molasses at 42°C with little loss in viability reaching final ethanol levels in the range of 63.0 to 68.0 g/L after 10-12h of fermentation using a total initial concentration cells of 10 mg/mL (w/v, dry mass), which was equivalent to 9.61×10^7 cells/mL of *S. cerevisiae* and 5.95×10^8 cells/mL of *I. orientalis*.

Keywords: *Issatchenkia orientalis*. *Saccharomyces cerevisiae*. Co-culture. Ethanol. High temperatures. Sugarcane molasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Matérias primas utilizadas na produção de etanol (BANCO..., 2009).....	23
Figura 2.	Esquema da produção de etanol de cana-de-açúcar (BANCO..., 2009)	27
Figura 3.	Processos de respiração e fermentação das leveduras.....	32
Figura 4.	Fluxograma de ensaios qualitativos realizados em diferentes meios a 40°C.....	51
Figura 5.	Sistema utilizado nas fermentações em batelada simples, conforme sugerido por Trevisan H. C. (SOUZA <i>et al.</i> , 2007).....	55
Figura 6.	Crescimento dos isolados de <i>I. orientalis</i> em melaço não hidrolisado solidificado (10%, ART): A, linhagem 96B (superfície lisa com borda regular); B, linhagem 110B (superfície lisa com borda regular); C, 195B (superfície rugosa com borda regular); D, linhagem 199B (superfície rugosa com borda irregular).....	67
Figura 7.	Placas mostrando a assimilação de glicerol em meio YNB após um dia de incubação a 30°C (A) e 40°C (B): 1 (33B), 2 (10B), 3 (<i>I. orientalis</i> NCAIM Y01030), 4 (<i>S. cerevisiae</i> IQAr/45-1), 5 (84B), 6 (96B), 7 (95B), 8 (195B), 9 (56B), 10 (181B-1), 11 (194B), 12 (110B), 13 (142B), 14 (192B), 15 (73B), 16 (14B), 17 (29B), 18 (105B).....	74
Figura 8.	Células (1000 X) das linhagens 181-B1 (A) e 110B (C) de <i>I. orientalis</i> e morfologia das colônias (40 X), após 3 dias de crescimento a 30°C em meio YM. As colônias foram rugosas e opalescentes para a linhagem 182-B1 (B), lisas e brilhantes para a linhagem 110B (D).....	75
Figura 9.	Curvas de tempo de fermentação das leveduras <i>S. cerevisiae</i> a pH 2,5 (-■-); <i>S. cerevisiae</i> a pH 4,5 (-□-); <i>I. orientalis</i> a pH 2,5 (-▲-) e <i>I. orientalis</i> a pH 4,5 (-△-) em meio YPD contendo 100 g/L glicose a 40°C.....	77
Figura 10.	Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) da linhagem 195B de <i>I. orientalis</i> em meio sintético contendo 120 g/L de sacarose (-■-) e no melaço 120 g/L ART (-●-) a 40°C: inóculo inicial de 14 mg/mL e incubação sob agitação de 80 rpm.....	79

- Figura 11.** Comparação entre culturas simples e mistas das leveduras *S. cerevisiae* (linhagem IQAr/45-1) e *I. orientalis* (linhagem 195B) fermentando melaço 160 g/L ART a 42°C: volume de meio no frasco (1V meio : 5V frasco), inóculo de 2 mg/mL e incubação sob agitação de 80 rpm..... 81
- Figura 12.** Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) variando o ART do melaço de 150 g/L ART (-■-), 190 g/L ART (-●-), 250 g/L ART (-▲-) e 280 g/L % ART (-▼-) em co-cultura de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* a 42°C: inóculo de 2 mg/mL e incubação sob agitação de 80 rpm..... 84
- Figura 13.** Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) obtidas variando-se a proporção do volume de meio e volume de frasco 1v_{meio}: 5v_{frasco} (-■-); 1v_{meio}: 1.8 v_{frasco} (-●-): melaço 160 g/L de ART, 2 mg/mL da cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* do inóculo constituído pela mistura de 1 parte de *S. cerevisiae* : 3 partes de *I. orientalis* e incubação sob agitação de 80 rpm a 42°C..... 85
- Figura 14.** Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) utilizando 2 mg/mL(-■-), 5 mg/mL (-●-) e 10 mg/mL (-▲-) da cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (1:3) fermentando melaço 160 g/L ART a 42°C sob agitação de 80 rpm..... 88
- Figura 15.** Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) obtidas variando a proporção de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* na cultura mista: proporção 1 : 7 (-■-), proporção 1 : 3 (-●-) e proporção 1 : 1 (-▲-) utilizando melaço 150 g/L e incubação sob agitação de 80 rpm a 42°C..... 89
- Figura 16.** Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) a 42°C (-■-) e 40°C (-●-) utilizando melaço 150 g/L ART e 10 mg/mL do inóculo constituído pela cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (proporção 1:3)..... 90
- Figura 17.** Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) variando o ART do melaço de 150

g/L (-■-), 190 g/L (-●-), 220 g/L (-▲-) em culturas mistas de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (proporção 1:3) a 42°C e agitação de 80 rpm..... 92

Figura 18. Células de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* após um dia de crescimento em meio YPD a 30°C..... 93

Figura 19. Variações na proporção de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* na co-cultura no decorrer da fermentação de melaço a 42°C..... 94

Figura 20. Comparação entre culturas mistas das leveduras *S. cerevisiae* + *I. orientalis* (-■-), *S. bayanus* + *I. orientalis* (-●-) e *K. marxianus* + *I. orientalis* (-▲-) fermentando melaço (150 g/L ART) a 42°C, inóculo de 10 mg/mL e sob agitação de 80 rpm..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição do melaço de cana-de-açúcar (Teclu <i>et al.</i> , 2009).....	25
Tabela 2.	Diferentes nomes utilizados para <i>I. orientalis</i>	35
Tabela 3.	Fermentação de glicose por linhagens de <i>I. orientalis</i> em meio YPD (ensaio de Durham) a pH 2,5 e 40°C.....	63
Tabela 4.	Fermentação de glicose em meio YPD a pH 4,5 e 40°C pelas linhagens de <i>I. orientalis</i> que fermentaram mais rápido a glicose a pH 2,5 num período de 13-40h (Tabela 3).....	64
Tabela 5.	Fermentação de glicose em meio YPD a pH 6,5 e 40°C utilizando-se os isolados que fermentaram a pH 4,5 no intervalo de 12-17h (Tabela 4).....	65
Tabela 6.	Crescimento das linhagens de <i>I. orientalis</i> em melaço não hidrolisado (10% ART) e solidificado por Agar e fermentação (Durham) no mesmo melaço líquido a 40°C.....	68
Tabela 7.	Crescimento das linhagens de <i>I. orientalis</i> em melaço hidrolisado contendo 10% ART (medido antes da hidrólise) a 40°C e formação de CO ₂ no mesmo meio líquido a 40°C.....	70
Tabela 8.	Assimilação de sacarose (1%, m/v) a 30°C em meio YNB e formação de CO ₂ em meio sintético contendo sacarose (10% m/v) a 40°C.....	72
Tabela 9.	Assimilação de glicerol (1%, m/v) e de frutose (1%, m/v) em meio YNB e temperaturas de 30°C e 40°C por algumas linhagens de <i>I. orientalis</i>	73
Tabela 10.	Comparação estatística da viabilidade e da conversão de substrato em produto utilizando culturas simples e mista de <i>S. cerevisiae</i> e <i>I. orientalis</i> (dados da Figura 11).....	82
Tabela 11.	Comparação estatística da conversão de substrato em produto utilizando concentrações crescentes de ART no melaço (dados da Figura 12).....	84
Tabela 12.	Comparação estatística da conversão de substrato em produto utilizando diferentes proporções de <i>I. orientalis</i> e <i>S. cerevisiae</i> no inóculo misto (dados da Figura 15).....	89

Tabela 13.	Comparação estatística da conversão de substrato em produto utilizando concentrações crescentes de ART no melaço (dados Figura 17).....	92
Tabela 14.	Variação do N° células/mL de <i>S. cerevisiae</i> e <i>I. orientalis</i> e da proporção das duas leveduras na cultura mista após 12 h de fermentação.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

SUMÁRIO

Introdução	20
1.1. Produção de etanol	21
1.2. Matérias primas para a produção de etanol	22
1.3. Etanol de cana-de-açúcar	24
1.3.1. Melaço de cana-de-açúcar.....	25
1.4. Processo de produção de etanol de cana-de-açúcar.....	25
1.5. Tipos de processos para a produção de etanol	27
1.6. As leveduras	28
1.6.1. Habitat	28
1.6.2. Morfologia.....	29
1.6.3. Citologia.....	29
1.6.4. Reprodução	30
1.6.5. Aplicações para as leveduras	31
1.7. Fermentação	31
1.7.1. Metabolismo da levedura para a produção de etanol	31
1.7.2. Fatores que afetam a fermentação alcoólica	32
1.8. Leveduras não- <i>Saccharomyces</i> envolvidas com a fermentação alcoólica.....	34
1.9. Tolerância a temperatura e etanol.....	37
1.9.1. Efeitos da temperatura sobre o processo de produção de etanol..	37
1.9.2. Vantagens de uma levedura termotolerante.....	39
1.9.3. Efeitos interativos do etanol e da temperatura sobre as leveduras	39
1.10. A diversidade microbiana em processos industriais.....	41
1.10.1. Sinergismo entre microrganismos.....	41
1.10.2. Culturas mistas para a produção de etanol.....	41

Objetivos.....	43
Materiais e Métodos	45
3.1. Leveduras e manutenção de culturas.....	46
3.2. Meios de cultura.....	46
3.2.1. Melaço de cana-de-açúcar e sua clarificação.....	46
3.2.2. Meio YPD.....	47
3.2.3. Melaço clarificado e não hidrolisado como meio de cultivo sólido e líquido.....	47
3.2.4. Melaço clarificado e hidrolisado com ácido como meio de cultivo sólido e líquido.....	48
3.2.5. Meio YNB sólido para ensaios de assimilação de fontes de carbono (Wickerham 1951 <i>apud</i> Kurtzman et al., 1998).....	48
3.2.6. Meio YM sólido e líquido para estudos de morfologia (Barnett <i>et al.</i> , 2000).....	48
3.2.7. Meio sólido contendo lisina para diferenciar leveduras <i>Saccharomyces</i> de não- <i>Saccharomyces</i>	49
3.2.8. Meio Sintético para ensaios de Durham e estudos em batelada simples.....	49
3.3. Procedimentos para a seleção qualitativa das melhores linhagens da levedura <i>I. orientalis</i>	50
3.3.1. Ensaio qualitativo do efeito do pH sobre a fermentação em meio YPD.....	51
3.3.2. Ensaios qualitativos de fermentação de diferentes fontes de carbono.....	52
3.3.3. Ensaios de assimilação em meio sólido.....	52
3.4. Morfologia de células e colônias.....	52
3.5. Ensaios de fermentação em batelada simples.....	53
3.5.1. Propagação dos inóculos.....	53
3.5.2. Fermentação de culturas únicas em bateladas simples.....	54

3.5.3. Fermentação em culturas mistas.....	55
3.5.4. Variações na proporção das diferentes células de levedura na cultura mista.....	56
3.6. Ensaio analíticos e microbiológicos.....	56
3.7. Cálculo do fator de conversão de substrato em produto.....	59
3.8. Tratamento estatístico.....	59
Resultados e Discussão.....	61
4.1. Ensaio qualitativos realizados com os isolados de <i>I. orientalis</i>	62
4.1.1. Efeito do pH inicial do meio YPD sobre a atividade de fermentação dos isolados.....	62
4.1.2. Ensaio qualitativos de assimilação e fermentação de melaço hidrolisado e não hidrolisado a 40°C.....	66
4.1.3. Ensaio de assimilação de sacarose em meio YNB e fermentação em meio sintético pelos isolados.....	70
4.1.4. Assimilação de outras de carbono em meio YNB.....	72
4.1.5. Morfologia das colônias.....	75
4.2. Efeito do pH inicial do meio sobre a fermentação em cultivos de batelada de alto inóculo.....	76
4.3. Otimização da fermentação em batelada simples utilizando-se a linhagem 195B de <i>I. orientalis</i> em culturas de baixo inóculo.....	78
4.3.1. Comparação das atividades fermentativas da linhagem IQAr/45-1 de <i>S. cerevisiae</i> com a atividade fermentativa da linhagem 195B de <i>I. orientalis</i>	78
4.3.2. Comparação entre a fermentação de melaço com a levedura <i>S. cerevisiae</i> , <i>I. orientalis</i> e a cultura mista destas duas leveduras a 42°C.....	80
4.3.3. Efeito do ART do melaço.....	82
4.3.4. Efeito do volume de meio no frasco.....	85

4.4. Fermentação de melaço a 42°C em cultura mista de <i>I. orientalis</i> e <i>S. cerevisiae</i> em bateladas de alto inóculo.....	86
4.4.1. Efeito da concentração do inóculo misto nas culturas de altas densidades de células.....	86
4.4.2. Efeito da proporção das leveduras no inóculo misto.....	88
4.4.3. Efeito da temperatura.....	90
4.4.4. Efeito do ART do melaço.....	91
4.4.5. Variações na proporção das células das duas leveduras na co-cultura.....	93
4.5. Ensaio de fermentação em bateladas simples utilizando inóculos mistos das leveduras <i>I. orientalis</i> (linhagem 195B) e outras leveduras não- <i>Saccharomyces</i> com características de termotolerância.....	95
5. Conclusões.....	97
Referências.....	99
Apêndice.....	109

Introdução

1.1. Produção de etanol

Com a elevação dos preços do petróleo e com a pouca disponibilidade de combustíveis alternativos para os transportes, o Brasil, a União Européia, os Estados Unidos e vários outros países estão apoiando amplamente a produção de biocombustíveis líquidos (etanol e biodiesel). Como uma fonte de energia renovável, os biocombustíveis poderiam ajudar a atenuar as mudanças climáticas, assim como também reduzir a dependência dos combustíveis fósseis nos setores de transporte e industrial (GOLDEMBERG, 2008). O acúmulo de CO₂ na atmosfera é gerado devido ao consumo de petróleo, carvão e queimadas, sendo este o principal causador do aquecimento global e alterações climáticas. Nas últimas décadas, o uso do etanol vem contribuindo para reduzir as emissões de CO₂ dos veículos em até 90% (WARD; SINGH, 2002).

Qualquer que seja sua origem, biomassa ou processos petroquímicos, o etanol é um combustível conhecido por liberar quantidades significativas de calor ao ser queimado. Contudo, o etanol apresenta algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis convencionais derivados de petróleo. A principal delas é o elevado teor de oxigênio, que constitui cerca de 40% de sua massa em composição (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). O etanol possibilita uma combustão limpa e um melhor desempenho dos motores, o que contribui para reduzir as emissões poluentes, mesmo quando o etanol é misturado à gasolina (GOLDEMBERG, 2008; BALAT *et al.*, 2009).

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

Desde então, a agroindústria canavieira brasileira tem se expandido, consolidando-se economicamente com indicadores positivos de sustentabilidade ambiental. A partir do Proálcool, deu-se vida nova ao setor, com investimentos em equipamentos, serviços e desenvolvimento de novas tecnologias, tanto na parte agrícola quanto para a industrial (BANCO..., 2009).

O Brasil dispõe de vantagens naturais para a produção de etanol, tais como, grandes áreas de terra arável e condições climáticas propícias à cultura da cana-de-açúcar. Ao longo da história, o Brasil tem sido um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar e atualmente é o maior exportador de etanol combustível do mundo (BALAT *et al.*, 2009). Além disso, vale destacar que a energia consumida para o processo produtivo das usinas do setor sucro-alcooleiro é proveniente do bagaço da cana. No ano 2008, o Brasil, junto aos Estados Unidos, foi responsável por 70% da produção mundial de bicomcombustíveis (UNIÃO..., 2008).

1.2. Matérias primas para a produção de etanol

O etanol pode ser produzido industrialmente a partir de dois tipos de matéria-prima: diretamente fermentáveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba ou matérias-primas amiláceas, não diretamente fermentáveis, como o milho e o trigo, cujo amido deve ser convertido em açúcares fermentescíveis antes da fermentação (ROSILLO-CALLE; WALTER, 2006; BALAT *et al.*, 2009). Um terceiro tipo de matéria-prima consiste na biomassa disponível em materiais como o bagaço e a palha, cujas cadeias celulósicas devem ser hidrolisadas para produzir uma solução fermentável de açúcares, bastante atrativa graças ao baixo custo da matéria-prima. Contudo, essa rota para a produção de etanol ainda não está disponível em escalas comerciais, embora haja expectativas de que nos próximos anos possa alcançar viabilidade econômica (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Atualmente, o bagaço é queimado para gerar energia para a própria usina, tornando-a auto-sustentável. A Figura 1 ilustra as diferentes rotas para a produção de etanol, considerando distintas matérias-primas.

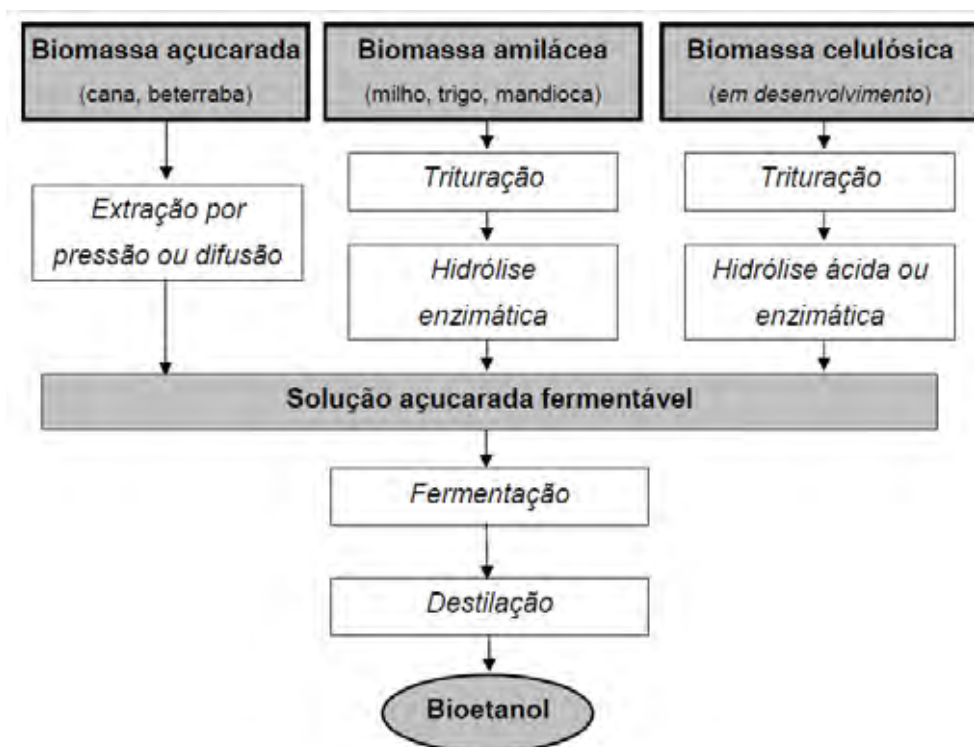


Figura 1. Matérias primas utilizadas na produção de etanol (BANCO..., 2009).

Como a fermentação é feita com base nos açúcares disponíveis na matéria-prima, os vegetais ricos em carboidratos são fontes para a produção de etanol. O milho é a matéria-prima mais utilizada nos Estados Unidos (BOTHAST; SCHLICHER, 2005; BALAT *et al.*, 2009), porém o etanol também pode ser produzido do trigo, do sorgo e da mandioca. A produção de biocombustível com tais matérias-primas amiláceas apresenta ao menos duas desvantagens em relação à cana-de-açúcar, sendo a primeira, a necessidade de liberação do amido por cozimento, enquanto a segunda consiste na utilização de enzimas industriais para a hidrólise do amido (BOTHAST; SCHLICHER, 2005). Segundo Sánchez e Cardona (2008) e Balat *et al.* (2009), este processo de produção de etanol é mais longo, complexo e exige uma maior quantidade de energia para produzir o mesmo volume de etanol, sendo o etanol produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar de menor custo. No caso americano, a energia extra é procedente de fontes fósseis, o que encarece o processo e reduz os benefícios ambientais dos biocombustíveis.

Entre os cultivos que produzem diretamente açúcar, além da cana-de-açúcar, a beterraba açucareira também tem sido utilizada para a produção de etanol a partir do mel residual de beterraba (melaço) sempre disponível como subproduto da sacarose (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Essa hortaliça tem uma raiz tuberosa que acumula quantidades elevadas de açúcar, podendo alcançar índices de produtividade agroindustriais bastante elevados, como observado em vários países europeus (BALAT *et al.*, 2009).

1.3. Etanol da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, oriunda das regiões temperadas quentes e tropicais da Ásia (WHEALS *et al.*, 1999), especialmente da Índia. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que dão origem à palha da cana.

Como um dos cultivos de maior importância em todo o mundo, a cana-de-açúcar ocupa mais de 20 milhões de hectares. O Brasil com uma área plantada de cerca de 7 milhões de hectares respondeu por 23,7 milhões de litros de etanol produzidos durante a safra 2009/2010 (UNIÃO..., 2008). O clima ideal para o cultivo da cana é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, o perfilhamento (formação de brotos) e o desenvolvimento vegetativo; seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e o consequente acúmulo de sacarose nos colmos. No contexto brasileiro, a produção de etanol de cana-de-açúcar é efetuada geralmente em unidades agroindustriais que produzem tanto etanol quanto açúcar, dando origem a melaços que podem, junto com o caldo de cana, compor mostos fermentáveis que alimentam as dornas como ilustrado na **Figura 2** (BANCO..., 2009).

1.3.1. Melaço de cana-de-açúcar

O melaço é resultante de uma etapa de centrifugação ou de decantação após a cristalização do açúcar no processo de produção de sacarose comercial (WHEALS *et al.*, 1999). É composto de açúcares redutores (glicose e frutose), sacarose não cristalizada, água, compostos não açúcares de origem orgânica (aminoácidos, vitamina, proteínas) e uma fração mineral composta principalmente de cálcio, magnésio, sódio e potássio (Tabela 1). A sua composição é muito variável, pois depende da qualidade e das condições de processamento da cana-de-açúcar (TECLU *et al.*, 2009).

O melaço é utilizado na fermentação para produção de etanol uma vez que apresenta alto teor de açúcar (50% em média), além de ser um subproduto da indústria açucareira relativamente barato e disponível em grandes quantidades (LIU *et al.*, 2008).

Tabela 1. Composição do melaço de cana-de-açúcar (TECLU *et al.*, 2009)

Componente	%
Água	17-25
Sacarose	30-40
Glicose	4-9
Frutose	5-12
Outros carboidratos	2-5
Cinzas	7-15
Compostos nitrogenados	2-6
Gorduras, esteróis, fosfolipídios	0,1-1
Fração mineral	$4,08 \times 10^{-3}$ - $4,38 \times 10^{-3}$
Ácidos não nitrogenados	2-8

1.4. Processo de produção de etanol de cana-de-açúcar

O objetivo deste tópico é dar uma visão do processo industrial da produção de etanol no Brasil, segundo estudos publicados pelo BNDES e CGEE (BANCO..., 2009). Como ilustrado na Figura 2, uma vez na usina, a cana é lavada e moída, sendo o caldo extraído sob pressão dos rolos das

moendas. Depois disto, o caldo é separado do bagaço e segue para a planta de energia da usina para ser utilizado como combustível. No Brasil, a extração por difusão tem sido adotada por usinas novas. Nos difusores, a cana picada e desfibrada passa por sucessivas lavagens com água quente, liberando por lixiviação seus açúcares. O caldo contendo os açúcares da cana pode, então, ser destinado à produção de açúcar ou etanol. Para a produção de açúcar, o caldo é tratado quimicamente, para a separação das impurezas, que são eliminadas por decantação e depois concentrado em evaporadores para a cristalização da sacarose. Nesse processo, nem toda a sacarose disponível na cana é cristalizada e a solução residual rica em açúcar (melaço) pode retornar mais de uma vez ao processo com o propósito de recuperar mais açúcar. O melaço final que não retorna ao processo contém ainda alguma sacarose e um elevado teor de açúcares redutores (glicose e frutose), podendo ser utilizado como matéria-prima para a produção do etanol. Desse modo, a produção de etanol de cana-de-açúcar pode se basear na fermentação tanto do caldo da cana, diretamente, quanto de misturas de caldo com melaço, sendo as misturas as mais frequentemente utilizadas no Brasil. Assim, o caldo tratado é misturado com o melaço, dando origem ao mosto que segue para as dornas de fermentação onde a levedura é adicionada, fermentado por um período de 8 a 10 horas a uma temperatura de 33-35°C, dando origem ao vinho ou mosto fermentado com uma concentração de 8-11%, v/v de álcool (WHEALS *et al.*, 1999). O processo de fermentação mais utilizado nas destilarias do Brasil é o *Melle-Boinot*, cuja característica principal consiste na recuperação das leveduras do vinho mediante sua centrifugação (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; WHEALS *et al.*, 1999). Assim, após a fermentação, as leveduras são recuperadas e tratadas para novo uso, enquanto o vinho é enviado para as colunas de destilação. Na destilação, o etanol é recuperado inicialmente na forma hidratada, com aproximadamente 96°GL, deixando a vinhaça ou vinhoto como resíduo. O etanol hidratado pode ser estocado como produto final ou pode ser enviado para a coluna de desidratação, onde o cicloexano é adicionado para facilitar a obtenção do etanol anidro.

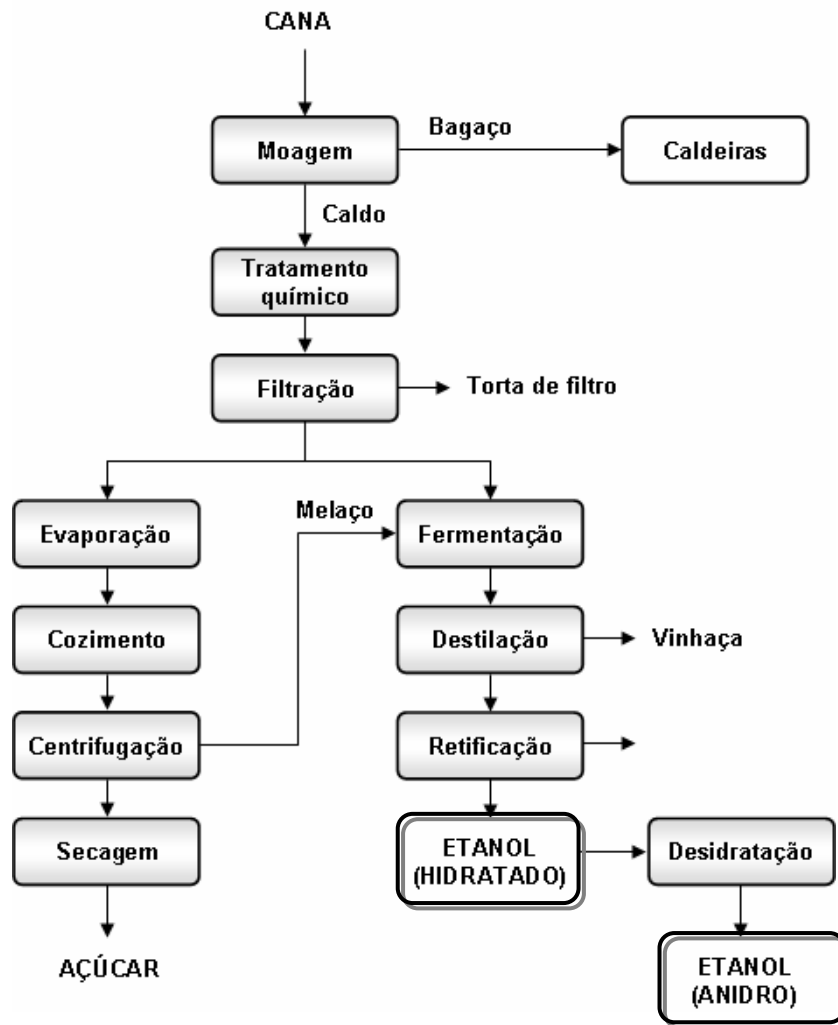


Figura 2. Esquema da produção de etanol de cana-de-açúcar (BANCO..., 2009).

1.5. Tipos de processos para a produção de etanol

Na fermentação em batelada simples o reator recebe inicialmente todo o meio de cultura esterilizado, é inoculado com o microrganismo e incubado, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo adiciona-se somente oxigênio. No caso de processos aeróbicos agitados, anti-espumante e ácido ou base são adicionados para controle do pH. Terminada a fermentação, descarrega-se o reator, e o meio fermentado segue para os tratamentos finais para a recuperação dos produtos de interesse. A principal característica deste tipo de processo é que o volume de meio do reator permanece sempre constante, no entanto a composição do meio

muda constantemente devido às mudanças no metabolismo celular que apresenta uma curva de crescimento típica (SCHMIDELL, 2001).

O processo de batelada descontínua, chamado também de batelada simples, apresenta as seguintes vantagens: fácil operação e controle do processo, menor risco de contaminação, construção e instrumentação simples e barata, além de ser adequado para processos de curta duração e sem reuso de células na seguinte fermentação. Por outro lado, na fermentação em batelada simples ocorre o esgotamento rápido dos nutrientes do meio com formação de níveis elevados de etanol, sendo estes tóxicos para a levedura (SCHMIDELL, 2001).

No presente trabalho, o tipo de processo de fermentação utilizado foi batelada descontínua ou simples. Entretanto, nas usinas brasileiras é utilizada a fermentação em batelada alimentada ou processo contínuo com reutilização de células (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; WHEALS *et al.*, 1999).

1.6. As Leveduras

A levedura é um dos microrganismos mais utilizados pelo homem ao longo do tempo sendo de vital importância para o ser humano na fabricação de alimentos e bebidas. Por esta razão, este microrganismo é um dos mais estudados pela ciência.

As leveduras são fungos do tipo ascomicetos ou basidiomicetos unicelulares, não-filamentosos e quimioheterotróficos que utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono (WALKER, 1998).

1.6.1. “Habitat”

Presentes em praticamente todos os “habitat” da terra: água, ar, solos; o “habitat” ideal para a proliferação das leveduras é o que apresenta altos teores de açúcar, como frutas, flores ou cascas de árvores (PELCZAR *et al.*, 1996). As leveduras são os agentes de transformação em processos biológicos como a conversão de açúcares resultantes da decomposição de vegetais em etanol. Algumas espécies

são patogênicas às plantas, aos animais e ao homem. A característica das leveduras de crescerem, onde apenas poucos microrganismos podem se desenvolver, e a sua existência em diferentes “habitat”, facilita seu isolamento e sua manutenção em culturas.

1.6.2. Morfologia

Segundo Kurtzman e Fell (1998), as células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas. Porém, a forma da levedura não é indício para identificação de espécies; não possuem flagelo e, em consequência disto, são imóveis. Suas dimensões mudam consideravelmente em função da espécie, nutrição, condições ambientais e idade entre outros fatores, variando entre 2-50 μm de comprimento e 1-10 μm de largura. As leveduras selvagens, geralmente, apresentam colônias cremosas, rugosas e/ou bordas irregulares, enquanto as leveduras de panificação (*Saccharomyces*) formam colônias cremosas, lisas, brilhantes com bordas regulares; as suas características morfológicas, além da coloração e diâmetro das colônias permitem a distinção entre as espécies.

1.6.3. Citologia

As leveduras são organismos eucariotos com um alto grau de organização, compartilhando semelhanças entre células animais e vegetais (PELCZAR *et al.*, 1996). A membrana plasmática está constituída por uma camada dupla de fosfolipídios e um arranjo de proteínas embebidas na bicamada lipídica, com proteínas de superfície fracamente ligadas à superfície da membrana. Além disto, diferem das membranas animais por apresentar ergosterol, ao invés de colesterol (WALKER, 1998). A estrutura lipoproteica da membrana é uma barreira efetiva para muitos tipos de moléculas. As moléculas que atravessam a membrana o fazem por difusão simples ou transporte ativo.

A membrana plasmática é envolvida por uma parede celular rígida responsável pela forma e integridade estrutural do organismo. A

parede celular constitui 15-25% do peso da célula sendo uma estrutura rígida constituída por várias camadas de polissacarídeos complexos e glicoproteínas, dentre os quais está a quitina, um polissacarídeo típico da estrutura da carapaça dos insetos e crustáceos (WALKER, 1998).

O citoplasma contém organelas típicas de uma célula eucariótica. Não apresenta cloroplastos, porem apresenta vacúolos que preenchem a maior porção do espaço intracelular (reservatório de nutrientes, de enzimas e produtos tóxicos), mitocôndrias (onde ocorre importante parte do metabolismo energético da célula), retículo endoplasmático e complexo de Golgi (PELCZAR *et al.*, 1996)..

O núcleo das células de levedura é delimitado por uma membrana nuclear dupla, contendo cromossomos lineares constituídos por cromatina. A transcrição do DNA e a síntese de proteínas ocorrem de forma semelhante a outros tipos celulares eucarióticos.

1.6.4. Reprodução

As leveduras caracterizam-se por apresentarem uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação (reprodução assexuada). Segundo PELCZAR *et al.* (1996), a esporulação em leveduras (reprodução sexuada) é um fator importante por desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies quando as condições do meio de cultivo se tornam extremamente desfavoráveis ao seu desenvolvimento.

A reprodução por brotamento ocorre quando a célula parental forma uma protuberância na sua superfície externa (broto). À medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto (KURZTMAN; FELL, 1998). O material da parede celular é então sintetizado entre o broto e a célula parental, separando-os. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam e formam uma pequena cadeia de células chamada de pseudo-hifa ou pseudo-micélio (WALKER, 1998).

1.6.5. Aplicações para as leveduras

Atualmente, as aplicações biotecnológicas das leveduras podem ser encontradas na tecnologia ambiental (tratamentos e/ou remediação de resíduos como esgotos domésticos e lixo, utilização de subprodutos industriais, controle biológico e bioabsorção de metais); como também nas pesquisas básicas (Metabolismo de drogas, Biologia celular e molecular, Bioquímica e Genética), nas indústrias de fermentação (vinhos, cerveja, saquê, pão e bioetanol), e na produção de agentes farmacêuticos de importância para a saúde humana (WALKER, 1998).

1.7. Fermentação

O processo fermentativo é uma das mais antigas reações bioquímicas conhecidas pelo homem. No Egito antigo, em torno de 5.000 a.C., já se usava a fermentação, porém sem conhecimento científico sobre o processo. Esses primeiros produtos eram feitos com base na fermentação natural de sucos de frutas, que deram origem aos primeiros tipos de vinhos. Apesar do uso desde a antiguidade, foi apenas em 1860 que o químico francês Louis Pasteur demonstrou cientificamente que a fermentação alcoólica era promovida por células de levedura (BARNETT, 2003). Pasteur inaugurava o campo da ciência que conhecemos hoje como Bioquímica. Ao final do século XIX, a produção de etanol já era um processo amplamente utilizado, inclusive para fins combustíveis; tanto que Henry Ford, pioneiro da indústria automobilística, projetou automóveis para rodar com etanol (SONGSTAD *et al.*, 2009).

1.7.1. Metabolismo da levedura para a produção de etanol

O metabolismo celular das leveduras apresenta uma sequência ordenada de reações bioquímicas dependentes de sistemas enzimáticos. O metabolismo nas leveduras é resultante de dois processos fundamentais: o catabolismo e o anabolismo. No catabolismo, os microorganismos promovem a degradação da matéria orgânica produzindo grandes quantidades de energia (sob a forma de

ATP); enquanto no anabolismo, ocorre a síntese de novas moléculas mais complexas a partir de moléculas simples (com consumo de ATP).

A Figura 3 ilustra os fenômenos catabólicos nas leveduras envolvidos na produção de etanol: a respiração e a fermentação. O processo de fermentação rende energia a este microrganismo (duas moléculas de ATP) e gera como subprodutos C_2H_5OH e CO_2 . Na respiração aeróbica o açúcar ($C_6H_{12}O_6$) é completamente oxidado em CO_2 e H_2O , produzindo como saldo energético 38 moléculas de ATP. Ambos os processos metabólicos, fermentativo e respiratório, são muito importantes em processos industriais (WALKER, 1998).

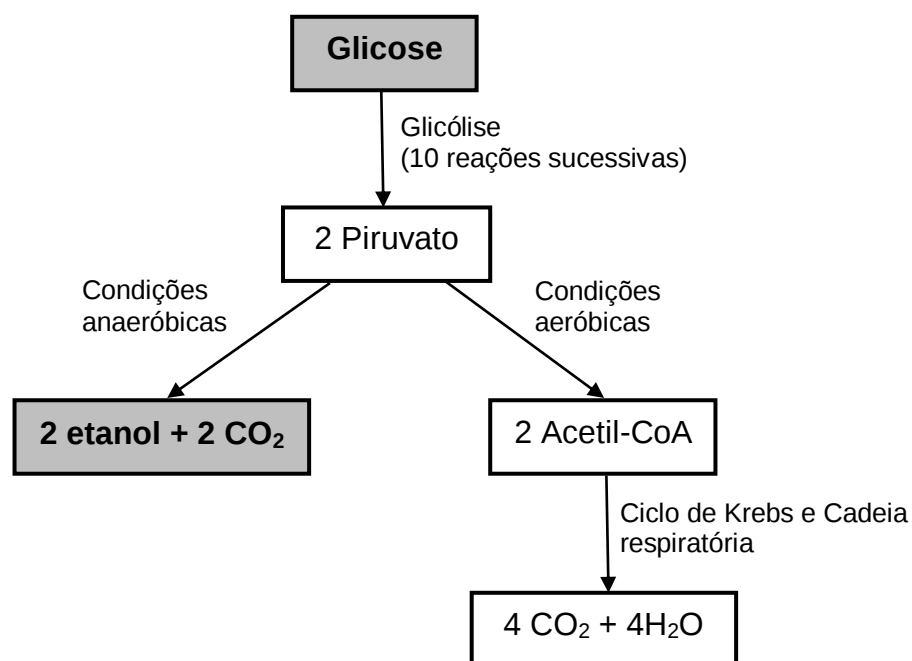


Figura 3. Processos de respiração e fermentação das leveduras.

1.7.2. Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Todos os organismos vivos crescem e se desenvolvem sob certas condições ambientais. O ambiente é um fator determinante da evolução de organismos e que induz a seleção de mecanismos que permitam a sua sobrevivência e adaptação às mudanças. Para atingir esse objetivo as células microbianas adotam estratégias que as levam a modificar o seu metabolismo, regulando a sua taxa de crescimento e, assim,

sobreviver em condições adversas. No entanto, em determinadas ocasiões essas mudanças são muito severas chegando a ser letais para a célula. As condições de temperatura, umidade, acidez, entre outras variam com as dimensões do ambiente e com a passagem do tempo deslocando, muitas vezes, das condições ótimas para o crescimento e reprodução das leveduras (FOLCH-MALLOL *et al.*, 2004). Os principais fatores que afetam a fermentação alcoólica são os seguintes (WALKER, 1998):

- a) **Composição do meio:** as leveduras necessitam de quatro elementos básicos para seu crescimento e proliferação: C, H, O, e N, além de outros elementos em menor quantidade: P, S, Mg, Fe, Ca, Zn, Cu, Mb, Na.
- b) **Acidez do meio:** a maioria de leveduras cresce a pH 4,5 – 6,5. Variações no pH do meio podem levar à diminuição ou perda total da atividade catalítica das enzimas envolvidas na produção de etanol. Quando o pH externo cai muito aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol, esse efeito é acentuado na presença de ácidos orgânicos fracos pois ocorre um aumento da forma não-dissociada do ácido, diminuindo o pH interno da célula.
- c) **Oxigênio:** é o substrato gasoso mais importante para o metabolismo, no entanto em alta concentração pode ser inibitório para a produção de etanol (efeito Pasteur).
- d) **Pressão osmótica:** atua alterando o volume celular. Quando submetida a altas concentrações de açúcares e/ou sais (hiperosmolaridade) a célula perde água, enquanto que uma diminuição na concentração dos solutos no meio, (hipoosmolaridade) resulta em um rápido crescimento celular, uma vez que a membrana plasmática aumenta sua permeabilidade.
- e) **Contaminação:** a presença de outros microorganismos estranhos ao processo pode levar ao consumo e talvez ao esgotamento dos

nutrientes do meio, levando à produção de outros metabólitos que não são de interesse.

- f) **Teor alcoólico:** altas concentrações de etanol são inicialmente inibitórias para a levedura chegando a ser letais, pois alteram a estrutura lipídica da membrana e inibem o transporte de glicose, diminuindo assim a viabilidade celular.
- g) **Temperatura:** representa um dos fatores mais importantes que pode levar à inibição do crescimento da levedura e da produção de etanol. Altas temperaturas provocam a desnaturação das proteínas e ácidos nucleicos.

1.8. Leveduras não-*Saccharomyces* envolvidas com a fermentação alcoólica

As leveduras são utilizadas em muitos processos industriais como a produção de bebidas alcoólicas, biomassa e vários produtos metabólicos (saborizantes, medicamentos e outros), sendo a levedura do gênero *Saccharomyces* responsável pela conversão dos açúcares em etanol na maioria dos processos industriais acima mencionados. No entanto, leveduras que não formam parte do inóculo inicial são normalmente encontradas nos processos de fermentação. Essas leveduras são denominadas de leveduras selvagens ou leveduras não-*Saccharomyces*, pois elas proliferam ao longo do processo já que a fermentação ocorre em condições não estéreis, facilitando a contaminação por diversos microrganismos.

Leveduras selvagens dos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* e *Metschnikowia* podem ser encontradas em processos de produção de cerveja (VAN DER AA KÜLHE; JESPERSEN, 1998), fermentação espontânea de vinhos, fermentados naturais de alimentos e bebidas obtidas por fermentação natural em países da África e Ásia (AIDOO *et al.*, 2006).

Linhagens de *Issatchenkia orientalis* foram isoladas e identificadas pela primeira vez por Kudryavtsev *et al.* (1960) de sucos e bagaços de

frutas. As células de *I. orientalis* apresentam uma forma elipsoidal ou alongada, formando colônias lisas ou rugosas. Apresenta 1 ou 2 esporos arredondados ou esféricos por asco. A reprodução vegetativa é por brotamento (KURTZMAN, 1980).

Candida krusei é considerada a forma assexuada de *I. orientalis*, desde que as “type strain” ou linhagens de referencia assim como vários isolados de ambas leveduras apresentam 93-100% de similaridade na sequência complementar de bases do DNA (KURTZMAN, 1980). A Tabela 2 indica os diferentes nomes utilizados para *I. orientalis*.

Tabela 2. Diferentes nomes utilizados para *I. orientalis*.

Nome	Referência
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Kudryavtsev, 1960
<i>Candida krusei</i>	Kurtzman, 1980
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Boidin <i>et al.</i> , 1965
<i>Saccharomyces krusei</i>	Barnett <i>et al.</i> , 2000

Segundo Barnett *et al.* (2000), *I. orientalis* assimila glicose, frutose, glicerol, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, etanol, etilamina e lisina, porém não assimila sacarose, lactose, galactose, maltose e xilose. Na verdade, é uma levedura que fermenta glicose, mas não fermenta sacarose, xilose, maltose, lactose e galactose. No entanto, Kurtzman (1980) e Hisamatsu *et al.* (2006) observaram assimilação de sacarose por linhagens de *I. orientalis*. Foi observado um crescimento entre 25-40°C, porém algumas linhagens também crescem entre 42-45°C (BARNETT *et al.*, 2000; KURTZMAN, 1980)

Por outro lado, linhagens de *Issatchenkia orientalis* ou *Candida krusei*, foram detectadas em uma variedade de processos tais como: a) durante a fase tumultuosa e tardia da fermentação natural de vinhos, atuando de forma cooperativa frente à levedura *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar o consumo de açúcar residual (CLEMENTE-JIMENEZ *et al.*, 2004); b) em fermentação de tequila (LACHANCE, 1995); c) em massas

tradicionais de pães azedo produzindo compostos aromatizantes (ALMEIDA; PAIS, 1996); d) em fermentados naturais de alimentos africanos como *Ogi* (OMENU *et al.*, 2007) e *Kenkey* (JERSPERSEN *et al.*, 1994); e) na produção de cachaça (GOMES *et al.*, 2007); f) em bolos chineses (LIMTONG, 2002); g) em iogurte (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2002) e outros produtos de laticínio.

Um isolado de *I. orientalis* foi obtido do melaço de cana-de-açúcar mostrando-se capaz de crescer bem a pH 2,0 e a 39°C (LEE *et al.*, 2002). Além disto, a levedura *I. orientalis* é mais resistente ao ácido láctico e acético que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HALM *et al.*, 2004; CASEY; DOBSON, 2003). Uma linhagem de *I. orientalis* foi capaz de produzir 9% de etanol em meio ácido (pH 2,5) contendo 20% de glicose e uma concentração de 1-5% de sulfato de sódio (HISAMATSU *et al.*, 2006), demonstrando assim sua tolerância aos ácidos e sais. A presença desta levedura reduziu o teor de ácido málico em até 95% em meio YNB a pH 2-3 e contendo 2% deste ácido como fonte de carbono (SEO *et al.*, 2007). *I. orientalis* também foi utilizada na detoxificação de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar reduzindo o teor de inibidores tais como ácido acético, furfural e guaiacol (ZHANG *et al.*, 2008).

Segundo Visser *et al.* (1990), quando leveduras de diversos gêneros foram transferidas de condições aeróbicas para anaeróbicas somente algumas leveduras foram capazes de crescer em meio complexo contendo glicose como fonte de carbono e com concomitante produção de etanol. Estas leveduras foram *A. elluris*, *E. nana*, *H. valbyensis*, *I. orientalis*, *K. apiculata*, *K. polysporus*, *P. transvaalensis*, *S. cerevisiae*, *S. ludwigii*, *S. pombe*, *W. fluorescens* e *W. saturnus*. Assim, a levedura *I. orientalis* é capaz de crescer e fermentar em condições anaeróbicas.

Linhagens de *I. orientalis* resultaram do enriquecimento da cultura de um fermentador contínuo alimentado por xarope de caldo de cana após dois meses de operação no nosso laboratório. No final do processo células alongadas foram observadas e um trabalho de isolamento e identificação mostraram que tais isolados (70) seriam linhagens de *I. orientalis* (SOUZA, 2004).

1.9. Tolerância a temperatura e etanol

A temperatura é um das variáveis ambientais mais importantes que exerce forte efeito sobre as atividades metabólicas dos microrganismos. A temperatura ótima de crescimento da maioria de leveduras está ao redor de 25-30°C, dependendo do “habitat” natural da espécie. A maioria das leveduras é classificada como mesofílicas e capazes de crescer entre 10-48°C (WATSON, 1987). Os processos industriais de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas ocorrem na faixa de temperatura de 25-35°C, mas para manter essa faixa de temperatura é necessário o uso de sistemas de refrigeração, pois nenhuma levedura termo-tolerante tem sido testada em larga escala. No entanto, várias pesquisas de laboratório foram feitas nas ultimas décadas na procura de leveduras tolerantes a altas temperaturas. Anderson *et al.* (1986), isolaram uma linhagem de *Kluyveromyces marxianus* capaz de fermentar xapore da cana-de-açúcar a 43°C, com uma produção de 6% (m/v) de etanol, porém com perdas na viabilidade (30-50%). Outras linhagens de *K. marxianus* mostraram-se capazes de crescer a temperaturas tão altas quanto 52°C e produzir etanol na faixa de 5.0-5.5% (m/v) a 50°C (BANAT *et al.*, 1992). Limitong *et al.* (2007) reportou um isolado de *K. marxianus* capaz de produzir altos nível de etanol (6,78%, m/v) a 40°C mas foram necessárias 36 h de fermentação.

Um isolado de *I. orientalis* obtido em nosso laboratório mostrou uma temperatura ótima de 42°C para a produção de etanol (6,9 % v/v) em meio YPD rico em nutrientes contendo glicose como fonte de carbono (SOUZA, 2004).

1.9.1. Efeitos da temperatura sobre o processo de produção de etanol

A produção de etanol combustível apresenta limitações econômicas especialmente em países de climas quentes como o Brasil. Isto ocorre por causa da alta energia requerida para manter o processo de fermentação em temperaturas entre 25°C e 35°C, onde a produção

de etanol é máxima e a letalidade das células de levedura é menor (BANAT *et al.*, 1992).

Sree *et al.*, (2000) estudou os efeitos do aumento da temperatura sobre a produção de etanol em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Quando se aumentou a temperatura de 30° para 40°C em meio contendo 150 g/L de glicose, a concentração de etanol produzido pelos melhores mutantes diminuiu de 75,2 g/L para 55,0 g/L. Elevando-se a concentração de glicose no meio para 350 g/L, a produção de etanol pelos mesmos mutantes e na mesma faixa de temperatura, também diminuiu de 83,8 g/L para 38,5 g/L, deixando uma concentração de açúcar residual no meio da ordem de 75,0-80,0 g/L. Não há nenhuma menção quanto a perda de viabilidade destes mutantes. A linhagem 63M da levedura *S. cerevisiae*, construída em nosso laboratório, produziu até 10,1% (v/v) de etanol a 40°C a partir de sacarose (200 g/L), porém com perdas na viabilidade muito elevadas (SOUZA *et al.*, 2007).

A exposição a temperaturas elevadas provoca a quebra das ligações de hidrogênio, resultando na desnaturação das proteínas e dos ácidos nucléicos, aumenta a fluidez da membrana e reduz a permeabilidade desta pelos nutrientes essenciais, além de diminuir a atividade respiratória da célula e a divisão celular. As leveduras mostram uma resposta rápida de defesa quando expostas a temperaturas elevadas, como a síntese das proteínas do choque térmico ou “heat-shock proteins” (Hsps). Observa-se também um grande acúmulo de trealose (KIM *et al.*, 1996), glicerol (ALDIGUIER *et al.*, 2004) e outros metabólitos secundários, assim como de algumas enzimas catalase e superóxido dismutase mitocondrial (WALKER, 1998). Torija *et al.* (2003) estudou o efeito da temperatura sobre a fermentação de vinho por várias linhagens de *S. cerevisiae* e observou que com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C houve um aumento da perda de viabilidade e na produção de metabólitos secundários como glicerol, ácido acético e succínico.

1.9.2. Vantagens de uma levedura termotolerante

Uma economia significativa nos custos de produção tornar-se evidente, se a temperatura do fermentador puder ser mantida a $\geq 40^{\circ}\text{C}$ (ABDEL-BANAT *et al.*, 2010). Além disso, os custos de recuperação do etanol também são menores e a contaminação do processo fermentativo é diminuída quando opera a temperaturas elevadas. Para isto, uma linhagem capaz de produzir altos níveis de etanol e manter a viabilidade celular em temperaturas elevadas é requerida (D'AMORE *et al.*, 1989).

Uma levedura selvagem capaz de produzir etanol a temperaturas acima daquelas toleradas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser útil ao processo de produção de etanol durante períodos de elevações da temperatura. Um isolado de *Kluyveromyces marxianus* termotolerante mostrou-se capaz de produzir etanol num fermentador de 60 m^3 utilizando melaço de cana-de-açúcar e temperaturas variando de $30\text{-}40^{\circ}\text{C}$, com produção de etanol na faixa de $6,0\text{--}7,2\%$ (m /v). Isto ocorreu com a vantagem adicional de diminuir a exigência da refrigeração e, conseqüentemente, os custos de produção (SINGH *et al.*, 1998).

1.9.3. Efeitos interativos do etanol e da temperatura sobre as leveduras

As linhagens utilizadas nos processos industriais de produção de etanol apresentam limites de tolerância ao álcool, a temperatura e a alta pressão osmótica do meio (BERTOLINI *et al.*, 1991). As leveduras industriais devem responder às condições de estresse e se adaptar rapidamente alterando suas atividades metabólicas para evitar grandes perdas em viabilidade (ZHAO; BAI, 2009). A procura de uma levedura termotolerante e álcool-tolerante com capacidade de produzir altos níveis de etanol tem aumentado nos últimos anos por ser de interesse econômico para as indústrias.

O etanol e a temperatura têm vários efeitos sobre a levedura e sobre o processo de fermentação. Assim, níveis de produção de etanol e

viabilidade celular são bons indicadores da termotolerância e álcooltolerância em um processo de produção de etanol. Manter a viabilidade no final da fermentação é importante por causa da reutilização de células empregada em destilarias brasileiras, processo que diminui os custos de propagação do inóculo, assim como, o tempo de produção (SOUZA *et al.*, 2007). A linhagem 78I de *S. cerevisiae* isolada em nosso laboratório foi capaz de produzir 5-6% (v/v) de etanol a partir de 10% (ART, açúcar redutor total) de xapore de cana-de-açúcar, a uma temperatura de 40°C e manter uma viabilidade alta (75-90%) até o final do processo (PERES *et al.*, 2001).

A produção de altos níveis de etanol requer uma linhagem tolerante a altas concentrações de açúcar e altos níveis de etanol externo. Peres *et al.* (1998) utilizaram uma linhagem de *S. cerevisiae* resistente a elevados níveis de etanol adicionado (8%, v/v) para a fermentação em batelada simples com alta concentração de açúcar redutor (19%, m/v) em meio rico.

O efeito inibitório do etanol pode ser letal para a levedura, pois altera a estrutura lipídica da membrana plasmática, da membrana mitocondrial e nuclear. Em geral, a exposição a concentrações elevadas de etanol aumenta a fluidez das membranas levando a perdas em sua estrutura e função. O etanol, não somente inibe o crescimento e a reprodução celular, como também reprime o sistema de transporte da glicose, limitando a produção de etanol (WALKER, 1998). A toxicidade do etanol aumenta com a elevação da temperatura (ALDIGUIER *et al.*, 2004). Outro efeito importante do etanol pode estar relacionado com sua ação sobre a invertase, enzima responsável pela quebra da sacarose nos açúcares fermentescíveis, glicose e frutose. A invertase perde 50% da sua atividade após 30 minutos em presença de 120 g/L de etanol a uma temperatura de 30°C (ZECH; GORISCH, 1995).

1.10. A diversidade microbiana em processos industriais

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente, pois deles dependem a estabilidade dos ecossistemas, sendo também importantes na fabricação de alimentos e bebidas. A grande diversidade dos microrganismos e ainda a sua distribuição explica o porquê eles estão envolvidos com tantos processos industriais. A compreensão dos efeitos das interações entre os microrganismos é essencial para o melhoramento de um processo industrial. Assim, existem vários tipos de interações microbianas, tais como: comensalismo, competição por alimento, predação, parasitismo, sinergismo entre outros (FLEET, 2003).

1.10.1. Sinergismo entre microrganismos

O sinergismo é uma interação positiva entre os microorganismos que permite a sobrevivência equilibrada de duas ou mais espécies no mesmo nicho ecológico ou dentro de um reator industrial (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006). O sinergismo consiste na produção de uma enzima ou substância específica por um organismo a qual é utilizada pelo outro de forma que a sobrevivência de ambos torna-se possível sob certas condições. Co-culturas de microrganismos ocorrem geralmente na fermentação de alimentos, bebidas e do próprio etanol combustível. Contudo, muitos estudos precisam ser desenvolvidos sobre as interações microbianas para obter os produtos desejados e poder controlar melhor os processos de produção.

1.10.2. Culturas mistas para a produção de etanol

O processo industrial de produção de etanol combustível é realizado sob condições não estéreis, portanto diferentes espécies de leveduras provenientes da matéria prima e/ou do próprio ambiente podem ser encontradas durante o processo de fermentação. Geralmente são espécies como *Hanseniaspora*, *Candida*,

Metschnikowia, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia* que sobrevivem junto com a levedura *Saccharomyces* com predominância dependente da fase do processo. A sobrevivência e persistência dessas espécies dependerão da interação entre elas, assim como, das condições de fermentação. Quando em co-culturas com *Saccharomyces cerevisiae*, as leveduras não-*Saccharomyces* parecem ser menos tolerantes a baixas concentrações de oxigênio. O crescimento e consequente consumo de oxigênio por *S. cerevisiae* nos primeiros estágios da fermentação pode contribuir para a morte precoce dessas leveduras (FLEET, 2003). A maioria de leveduras não-*Saccharomyces* não são tolerantes a concentrações de etanol superiores a 5-7% (v/v) e isto explica a sua morte quando a fermentação avança além do seu estágio médio. No entanto, em culturas mistas junto com *S. cerevisiae*, *I. orientalis* foi capaz de produzir 7,8% (v/v) de etanol na fermentação de vinho além de reduzir até 70% do ácido málico desta bebida (KIM *et al.*, 2008).

Vários autores têm estudado a produção de etanol empregando co-culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces*. Jeon *et al.* (2007) desenvolveu um sistema de biorreatores em série utilizando um processo contínuo de co-cultivo de *Aspergillus niger* e *S. cerevisiae* para a produção de etanol a partir de amido. O etanol produzido atingiu um nível de 2,78% (v/v), cerca de 80% do máximo teórico produzido a partir de 55 g/L de glicose. Um isolado de *S. cerevisiae* produziu maiores níveis de etanol a 35°C quando em co-cultura com *Cândida tropicalis* (proporção celular de 1:2) para a produção de *tchapalo*, uma cerveja da África feita do sorgo (N'GUESSAN *et al.*, 2010). Por outro lado, co-culturas de bactérias e leveduras também têm sido estudadas como no caso da produção de *Kefir*, bebida láctea fermentada. *Lactobacillus kefiranofaciens*, principal responsável pela produção desta bebida, quando cultivado em culturas mistas junto com *S. cerevisiae* não só reduz a concentração de ácido láctico, mas também aumenta o crescimento celular e a produção do *Kefir* (CHEIRSILP *et al.*, 2003).

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho consistiu em buscar alternativas para fermentar o melaço de cana-de-açúcar a temperaturas maiores que 40°C utilizando culturas mistas de leveduras.

Objetivos específicos

- a) Avaliar as linhagens da levedura *Issatchenkia orientalis* quanto a sua capacidade de assimilação e fermentação de diferentes fontes de carbono a elevadas temperaturas.
- b) Selecionar a melhor linhagem da levedura *Issatchenkia orientalis* para ser utilizada em culturas mistas associada à levedura *S. cerevisiae* na fermentação de melaço não hidrolisado a elevadas temperaturas.

O presente trabalho foi planejado para ser executado em três etapas: a) uma primeira etapa para avaliação qualitativa da capacidade dos isolados de *I. orientalis* de fermentar e assimilar fontes de carbono (sacarose, frutose e glicerol) e melaço da cana-de-açúcar a temperatura elevadas e pH ácido; b) uma segunda etapa na qual foi estudada a atividade fermentativa de uma linhagem selecionada de *I. orientalis* em fermentações em batelada agitadas simples; c) e a terceira etapa na qual utilizou-se co-culturas das leveduras *I. orientalis* e *S. cerevisiae* visando a produção de etanol a 42°C.

Material e Métodos

3.1. Leveduras e manutenção de culturas

Foram utilizadas as seguintes leveduras:

- a) 70 linhagens da levedura *Issatchenkia orientalis*, isoladas de um fermentador contínuo de cinco estágios operando a temperaturas elevadas (LALUCE *et al.*, 2002), estes isolados são: 10B, 13B, 14B, 16A, 16B, 22B, 25B, 26B, 29B, 33B, 49B, 55B, 56B, 57B, 59B, 62B, 63A, 63B, 69B, 73B, 75B, 78B, 79B, 80B, 82B, 84B, 95B, 96B, 101B, 102B, 105B, 106B, 110B, 112B, 113B, 114B, 116B, 118B, 119 B, 122B, 126B, 128B, 130B, 136B, 142B, 144B, 145B, 146B, 148B, 151B, 154B, 156B, 157B, 159B, 161B, 162B, 164B, 166B, 167B, 169B, 170B, 171B, 172B, 173B, 181B-1, 192B, 194B, 195B, 198B, 199B.
- b) A linhagem IQAr/45-1 da levedura híbrida *Saccharomyces cerevisiae* (protocolo N° 01808004893, INPI Brasil).
- c) A linhagem Y01030 de *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev da coleção de cultura NCAIM (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism).
- d) A linhagem CBS 712 da levedura *Kluyveromyces marxianus* (Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands).
- e) A linhagem CBS 7045 da levedura *Saccharomyces bayanus* (Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands).
- f) O isolado de *I. orientalis* 195B foi selecionado no presente trabalho para os estudos de fermentação em batelada simples.

As culturas em uso foram estocadas em meio contendo glicerol -80°C e em meio YPD sólido a 4°C com transferências a cada quatro meses.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Melaço de cana-de-açúcar e sua clarificação

A matéria-prima utilizada no presente trabalho foi o melaço de cana-de-açúcar, doado pela Usina Zilor, contendo 80-90° Brix. Esta matéria-prima passou por um processo de clarificação antes de seu uso.

Para tal, o melaço em estoque foi diluído duas vezes e em seguida foi clarificado da seguinte forma: o pH foi ajustado a 4,5 com H_2SO_4 6M antes de ser submetido ao aquecimento pelo vapor da autoclave cuja válvula foi mantida aberta por 30-40 minutos. Em seguida, deixou-se decantar os resíduos sólidos por uma noite e coletou-se o sobrenadante (LALUCE *et al.*, 1991). Após a clarificação, foi realizada a dosagem de açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores livres (AR). O melaço clarificado foi estocado a 4°C.

3.2.2. Meio YPD

Este meio foi utilizado para manutenção de culturas, obtenção de colônias isoladas e para estudo do efeito do pH sobre a fermentação utilizando-se o ensaio de Durham. A composição deste meio é a seguinte:

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

Os componentes do meio foram dissolvidos em água e o ágar foi adicionado por ultimo. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm e ainda quente foi distribuído em placas de Petri ou em tubos pequenos com tampa de rosca. Estes Tubos foram inclinados para resfriamento e solidificação.

3.2.3. Melaço clarificado e não hidrolisado como meio de cultivo sólido e líquido

O melaço clarificado foi diluído em água destilada, após o ajuste do pH para 4,5 com H_2SO_4 o meio foi distribuído em tubos ou em frascos de Erlenmeyers. Os tubos e frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm. Para os ensaios de crescimento em placa de Petri, foi adicionado ágar 2% (m/v) para a solidificação do meio.

3.2.4. Melaço clarificado e hidrolisado com ácido como meio de cultivo sólido e líquido

O melaço clarificado foi hidrolisado com HCL 5N em banho de água a 60°C durante 10 minutos. O pH do meio foi ajustado para 4,5 e a seguir, foi distribuído em volumes de 8 mL em tubos com tampa de rosca, os quais foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm. Para os ensaios de crescimento em placa de Petri adicionou-se ágar 2% (m/v) para a solidificação do meio durante o resfriamento.

3.2.5. Meio YNB sólido para ensaios de assimilação de fontes de carbono (WICKERHAM 1951 *apud* KURZTMAN; FELL, 1998)

A composição do meio é:

Base nitrogenada de levedura	0,67%
Fonte de carbono a ser ensaiada	1%
Ágar	2%

Foram preparadas soluções estoques mais concentradas das fontes de carbono e da base nitrogenada de levedura, essas soluções foram esterilizadas por filtração através de uma membrana de éster de celulose Millipore® de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade e mantidas a 4°C. A suspensão do ágar em água foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm e em seguida, adicionou-se o volume necessário das soluções estoques para se obter as concentrações finais desejadas.

3.2.6. Meio YM sólido e líquido para estudos de morfologia (BARNETT *et al.*, 2000)

A composição deste meio é:

Extrato de malte seco	0,3%
Extrato de levedura	0,3%
Peptona	0,5%

Glicose	1,0%
---------	------

Os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada, apresentando um pH de aproximadamente 5,5. A seguir o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm. Para os ensaios de crescimento em placa de Petri, a solidificação do meio foi conseguida com a adição de ágar (2%, m/v).

3.2.7. Meio sólido contendo lisina para diferenciar leveduras *Saccharomyces* de não-*Saccharomyces*

Utilizou-se o meio descrito por LODDER AND KREGER-VAN RIJ, 1952 *apud* KURTZMAN; FELL (1998). A composição do meio é:

KH ₂ PO ₄	0,1%
MgSO ₄ .4H ₂ O	0,005%
Glicose	2,0%
Lisina	0,056%
Ágar	2,0%

Foram preparadas soluções estoques mais concentradas de todos os componentes do meio, essas soluções foram esterilizadas por filtração através de uma membrana de éster de celulose Millipore® de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade e mantidas a 4°C. O meio contendo ágar foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm, em seguida, adicionou-se o volume necessário das soluções estoques para se obter as concentrações finais desejadas.

3.2.8. Meio Sintético para ensaios de Durham e estudos em batelada simples

A composição do meio sintético utilizado é a seguinte (THOMAS *et al.*, 1998): 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 g.L⁻¹ de MnSO₄;

10,0 μM de CuSO_4 ; 1,5 μM de Na_2MoO_4 ; 1,5 μM de CoCl_2 ; 1,23 μM de FeCl_3 . Os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada e a seguir o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm. As seguintes soluções de vitaminas foram esterilizadas por filtração através de uma membrana de éster de celulose Millipore® de 25 mm de diâmetro e 0,22 μm de porosidade e foram adicionadas ao meio estéril: 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de biotina, 2,0 mg.L^{-1} de pantotenato de cálcio, 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ácido fólico, 10 mg.L^{-1} de myo-inositol, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de niacina, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ácido *p*-aminobenzóico, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de piridoxina, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de riboflavina e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de tiamina. Adicionou-se também 0,004% ergosterol e 0,4% Tween 80.

3.3. Procedimentos para a seleção qualitativa das melhores linhagens da levedura *I. orientalis*

O procedimento descrito na Figura 4 foi utilizado para determinar a atividade fermentativa e de crescimento a 40°C dos isolados de *I. orientalis* utilizando diferentes fontes de carbono, bem como o efeito do pH sobre a fermentação. As culturas estoques dos isolados de *I. orientalis* (70 isolados) foram ensaiadas em meio YPD para estudos da tolerância a valores baixos de pH, em melaço não hidrolisado a pH 4,5 e em meio YNB contendo sacarose; os isolados que apresentaram crescimento e atividade fermentativa nesses meios foram selecionados e ensaiados em melaço hidrolisado e em meio YNB contendo frutose e glicerol.

Tanto nos ensaios de assimilação quanto nos ensaios de fermentação foram utilizadas as seguintes linhagens de referência: linhagem NCAIM Y01030 de *Issatchenkia orientalis* e a linhagem IQAr/45-1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

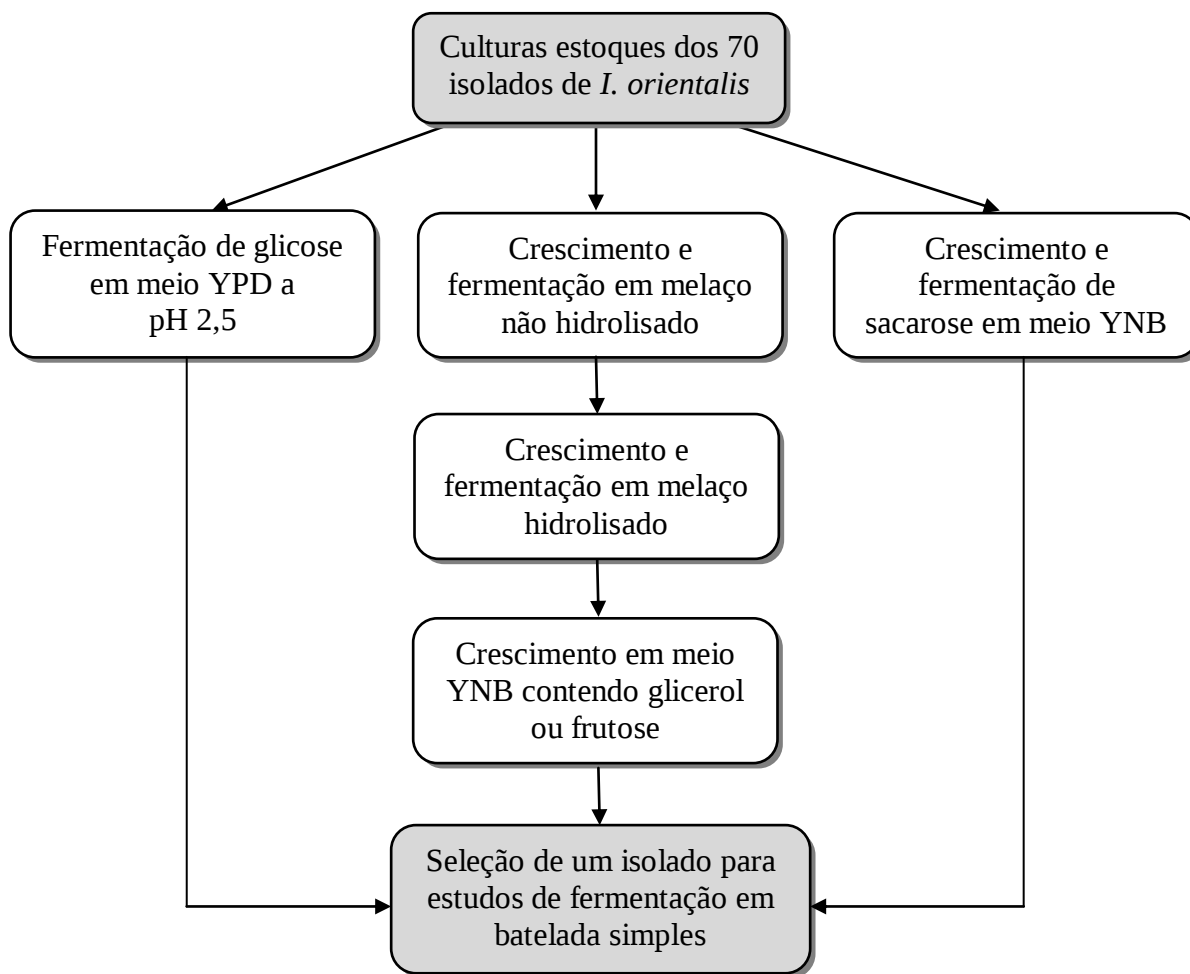


Figura 4. Fluxograma de ensaios qualitativos realizados em diferentes meios a 40°C.

3.3.1. Ensaio qualitativo do efeito do pH sobre a fermentação em meio YPD

Os ensaios foram realizados em tubos com tampa de rosca contendo tubos de Durham (0,7cm x 3,5cm) invertidos (BARNETT *et al.*, 2000). O pH do meio na faixa de 2,5 a 6,5 foi ajustado com H₂SO₄ e NaOH antes da esterilização em autoclave a 121°C por 20 min. a 1 atm de pressão. Foi adicionado um volume de 8 mL de meio YPD líquido (10% m/v de glicose) em cada tubo de ensaio. Os tubos foram inoculados com uma alça de platina cheia de células da cultura estoque das diferentes linhagens de *I. orientalis*, seguido de agitação e incubação em banho de água a 40°C, sendo a fermentação acompanhada por 1 a 4 dias.

3.3.2. Ensaios qualitativos de fermentação de diferentes fontes de carbono

Os ensaios foram realizados em tubos de Durham contendo meio sintético (THOMAS *et al*, 1998), melaço hidrolisado e melaço não hidrolisado (10% m/v, ART). A concentração de sacarose no meio sintético (substituiu a glicose como fonte de carbono no meio original) foi elevada para 10% (m/v). O pH dos meios foi ajustado para 4,5 antes da esterilização em autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm. Os tubos de ensaio contendo 8 mL de meio foram inoculados com uma alça cheia de células da cultura estoque fresca das diferentes linhagens de *I. orientalis* e, a seguir, foram incubados em banho-maria a 40°C durante 1 a 3 dias. O “screening” das linhagens foi baseado no tempo gasto para o preenchimento do tubo de Durham com CO₂.

3.3.3. Ensaios de assimilação em meio sólido

Todos os isolados de *I. orientalis* foram semeados sobre placas de Petri contendo os meios sólidos: melaço hidrolisado, melaço não hidrolisado e YNB (WICKERHAM 1951 *apud* KURZTMAN; FELL, 1998) contendo sacarose. Algumas linhagens também foram inoculadas em YNB contendo glicerol. Volumes de 500 µl de água destilada esterilizada foram adicionados em todos os poços da base do replicador, a seguir adicionou-se uma alça de células de leveduras diferentes em cada poço do replicador. Após a replicação as placas foram incubadas a 30°C e 40°C durante 1 a 3 dias.

3.4. Morfologia de células e colônias

Tubos de ensaio com tampa de rosca contendo o meio YM líquido (BARNETT *et al.*, 2000) foram inoculados com uma alça cheia de células das culturas estoques dos isolados de *I. orientalis*. As culturas frescas foram diluídas (diluições em série) e amostras de 0,1-0,2 ml das suspensões diluídas de células foram semeadas em placas de Petri

contendo meio YM sólido para formação de colônias isoladas (>50 colônias por placa). Os tubos e as placas foram incubados a 30°C durante 3 dias para observação das colônias (lisas ou rugosas e tipo de bordas) em estereoscópio com um aumento de 40X (Quimis Modelo Q734ZT, acoplado a uma câmera digital Quimis SDC-312) e para observação das células em microscópio de contraste de fase com um aumento de 1000x (modelo MPS 60, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany).

3.5. Ensaio de fermentação em batelada simples

3.5.1. Propagação dos inóculos

Os inóculos foram propagados em meio YPD e em melaço tanto nos experimentos com *Issatchenkia orientalis* quanto *Saccharomyces cerevisiae*.

Propagação do inóculo em meio YPD e meio sintético: o pré-inóculo foi propagado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YPD. Os frascos foram inoculados com uma alça cheia de células da cultura fresca e incubados por 12-15h a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação a 4700 rpm por 5 min (centrifuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo) e suspensas em 100 mL de água esterilizada. Essa suspensão de células foi transferida para o meio sintético (Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio) enriquecido com a adição de 2% (m/v) de extrato de levedura e 10% (m/v) de glicose. Os frascos contendo as culturas do inóculo foram incubados durante 12-15 h em mesa giratória operando a 30°C e 125 rpm (Incubadora refrigerada com agitação, Tecnal TE 421). Após a propagação, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas com água destilada estéril e finalmente suspensas em água para formar o leite de levedura (40-50 mg/mL) a ser utilizado como inóculo das fermentações realizadas em meio sintético.

Propagação do inóculo em melaço: O pré-inóculo foi propagado em frascos Erlenmyers de 250 mL contendo 100 mL de melaço 5% ART. Os frascos foram inoculados com uma alça cheia de células da cultura fresca e incubados por 12-15h a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação a 4700 rpm por 5 min (centrifuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo) e suspensas em 100 mL de água esterilizada. Essa suspensão de células foi transferida para frascos Erlenmyers de 250 mL contendo 100 mL de melaço 10% ART. Os frascos contendo as culturas do inóculo foram incubados durante 12-15 h em mesa giratória operando a 30°C e 125 rpm (Incubadora refrigerada com agitação, Tecnal TE 421). Após a propagação, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas com água destilada estéril e finalmente suspensas em água para formar o leite de levedura (40-50 mg/mL) a ser utilizado como inóculo das fermentações realizadas em melaço.

3.5.2. Fermentação de culturas únicas em bateladas simples

A melhor linhagem da levedura *I. orientalis* (selecionada nos ensaios qualitativos) foi ensaiada quanto a capacidade de fermentar melaço 10% ART e meio sintético contendo 10% m/v de sacarose a 40°C, ambos meios com pH 4,5. A linhagem IQAr/45-1 da levedura *S. cerevisiae* foi ensaia em paralelo em experimentos realizados nas mesmas condições. Os ensaios foram feitos em frascos Erlenmeyer de 125 mL nos quais uma proporção de 1 volume de meio : 5 partes volume de frasco foi utilizada sob agitação de 80 rpm. Os frascos foram vedados ou fechados por meio de uma rolha de borracha perfurada contendo dois tubos de vidro para permitir a amostragem, a saída do CO₂ durante a fermentação e para minimizar a evaporação do etanol a temperaturas elevadas (Figura 5). Os experimentos foram realizados em duplicata e curvas de tempo de fermentação foram obtidas para a viabilidade celular, biomassa, concentração de etanol e concentração de açúcares residuais.



Figura 5. Sistema utilizado nas fermentações em batelada simples, conforme sugerido por Trevisan H. C. (SOUZA *et al.*, 2007).

3.5.3. Fermentação em culturas mistas

Para os ensaios em culturas mistas foi utilizado o mesmo sistema de fermentação ilustrado acima (Figura 5), os frascos contendo melaço a pH 4,5 foram inoculados com duas leveduras: o isolado 195B da levedura *I. orientalis* e a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae*. Em alguns experimentos, a linhagem IQAr/45-1 foi trocada pelas linhagens CBS 712 da levedura *Kluyveromyces marxianus* e pela linhagem CBS 7045 da levedura *Saccharomyces bayanus*. As condições de fermentação tais como a porcentagem de açúcar no melaço (ART), a temperatura de fermentação, a proporção volume de frasco: volume de meio, a quantia de inóculo e a proporção das leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* no inóculo foram avaliadas e padronizadas. Os experimentos foram realizados em duplicata e curvas de tempo de fermentação foram obtidas para a viabilidade celular, biomassa, concentração de etanol e concentração de açúcares residuais.

3.5.4. Variações na proporção das diferentes células de levedura na cultura mista

Após a padronização das condições de fermentação em batelada simples, determinaram-se as variações da proporção das leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* no decorrer da fermentação. As amostras retiradas do fermentador a cada duas horas foram diluídas e inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD e meio de assimilação de lisina (LODDER; KREGER-VAN RIJ, 1952 *apud* KURTZMAN; FELL, 1998), a seguir as placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. A proporção das duas leveduras no inóculo inicial foi expressa em m/m e em N°cels/mL.

3.6. Ensaio analíticos e microbiológicos

Os seguintes ensaios foram realizados em duplicata:

3.6.1. Biomassa celular

Foi determinada por medidas de densidades óticas e convertidas a valores de massa seca (mg/mL) pela seguinte formula:

Sendo '*f*' o fator de conversão obtido da curva padrão de crescimento feita para cada levedura (ver Figura 21 e 23 no apêndice).

Nos experimentos realizados com culturas mistas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis*), o número de células por mL (n°cel/mL) no inóculo inicial foi determinado pela seguinte formula utilizando para isto a câmara de Neubauer e microscópio com aumento de 40X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany):

Foram feitas curvas padrões correlacionado a absorbância com o número de células por mL (Figura 22 e 24 no apêndice), tanto para *S. cerevisiae* quanto para *I. orientalis*.

Procedimento: as amostras foram diluídas 50 vezes em água destilada e as absorbâncias foram medidas a 570nm (Espectrofotômetro marca Bioespectro SP-22).

3.6.2. Viabilidade celular

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

Composição do reagente azul de metileno:

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

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

Procedimento: a suspensão de células foi diluída 50-100 vezes no reagente azul de metileno, após 5 minutos de contato com o corante, realizou-se a contagem das células utilizando para isto a câmara de Neubauer e microscópio com aumento de 40X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

3.6.3. Açúcar Redutor total

Determinado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1951). Foi obtida uma curva padrão usando-se uma solução de glicose 0,2%, (m/v) para relacionar a absorbância com a concentração de açúcar nos hidrolisados (ver Figura 25 nos anexos).

Composição do reagente DNS:

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

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

Procedimento: as amostras dos reatores foram centrifugadas a 10400 rpm por 3 minutos a 4°C (centrifuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo), o resíduo celular foi descartado enquanto o sobrenadante foi diluído em água destilada, hidrolisado em HCl 6M por 7 minutos a 60°C e neutralizado com NaOH 2,4M. As medidas de absorbância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro a 546nm (Espectrofotômetro marca Bioespectro SP-22). A quantidade de açúcar redutor total foi expressa em g/L e calculada pela seguinte formula, com base na curva padrão:

3.6.4. Açúcar Redutor livre

Foi determinado como descrito acima, omitindo-se a hidrólise ácida antes da adição do reagente do ácido 3,5-dinitrosalicílico. O volume final de reação foi o mesmo para a dosagem dos açúcares redutores livres e totais.

3.6.5. Medidas de etanol

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

Procedimento: o sobrenadante das amostras foi diluído 10 vezes em água destilada, 4 μ L desta solução foram injetados no cromatógrafo para obter as medidas de concentração de etanol.

3.6.6. Medidas de pH

Foram obtidas com o uso de um pHmetro (pHmetro Hanna Instruments).

3.7. Cálculo do fator de conversão de substrato em produto

O fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi calculado pela seguinte formula (SCHMIDELL, 2001):

$$\frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$$

Onde P_f é a concentração de etanol final da curva de tempo, P_0 é a concentração inicial de etanol, S_f é a concentração de açúcar final e S_0 é a concentração inicial de açúcar.

3.8. Tratamento estatístico

3.8.1. Comparação entre médias: test t

O teste *t student* foi utilizado para a comparação entre as médias dos valores obtidos nos experimentos. Antes de se aplicar o teste *t*, verificou-se a homogeneidade das variâncias das amostras, usando o teste F. O teste *t* forneceu o valor da probabilidade *p*, calculado usando-

se um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) em todos os casos. O valor de p maior que o nível de significância ($p>0,050$), implica o aceite da *hipótese nula*, de que as médias comparadas são iguais e um valor de p menor que o nível de significância ($p<0,050$), a *hipótese nula* de que as duas médias comparadas são iguais é rejeitada. Os cálculos estatísticos foram calculados utilizando os programas Excel e OriginPro 8

3.8.2. Comparação entre proporções: teste do qui-quadrado (χ^2)

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para a comparação entre as medidas de viabilidade. Este teste foi realizado no programa Excel que forneceu o valor da probabilidade p do teste χ^2 com um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). O valor de p maior que o nível de significância ($p>0,050$), implica o aceite da *hipótese nula*, de que as proporções comparadas são iguais e um valor de p menor que o nível de significância ($p<0,050$), a *hipótese nula* de que as duas proporções comparadas são iguais é rejeitada.

Resultados e Discussão

As leveduras utilizadas no presente trabalho foram identificadas em um trabalho anterior como sendo pertencentes à espécie *Issatchenkia orientalis* (SOUZA, 2004). Como foram obtidas de um fermentador contínuo operando a altas temperaturas por um longo período de tempo decidimos obter informações adicionais sobre as características fisiológicas e morfológicas destas leveduras com a finalidade de utilizá-las em fermentações a altas temperaturas.

4.1. ENSAIOS QUALITATIVOS REALIZADOS COM OS ISOLADOS DE *I. orientalis*

4.1.1. Efeito do pH inicial do meio YPD sobre a atividade de fermentação dos isolados

O meio YPD foi selecionado para se obter dados mais próximos aos esperados para as matérias primas industriais que são mais ricas que o meio sintético. Os ensaios qualitativos de fermentação de glicose foram realizados visando selecionar as melhores cepas com base no pH do meio na faixa de 2,5 a 6,5 (Tabelas 3-5). As melhores cepas seriam aquelas que fermentassem mais rápido a pH 2,5.

A Tabela 3 mostra um tempo de fermentação de 21 horas (enchimento completo do tubo de Durham com CO₂) a 40°C e a pH 2,5 para as linhagens 75B, 167B, 181B-1, porém as linhagens 29B e 195B chegaram a fermentar em um tempo inferior (13 horas) nas mesmas condições. Conforme esperado, a levedura *S. cerevisiae* não cresceu (crescimento não medido, mas observado visualmente) nem fermentou no meio YPD a pH 2,5, já que o seu pH ótimo de fermentação está na faixa de 4,0 a 5,0. Por outro lado, a linhagem controle de *I. orientalis* teve uma resposta de fermentação fraca (cerca de 1/3 do tubo de Durham preenchido com gás) a partir de 21 horas. Assim, alguns isolados da espécie *I. orientalis* fermentaram melhor que a “type strain” NCAIM Y01030.

Vários autores têm estudado a capacidade de crescimento e fermentação a pH ácidos por linhagens de *I. orientalis* (LEE *et al.*, 2002; HISAMATSU *et al.*, 2006; SEO *et al.*, 2007). A tolerância a acidez é um fator muito importante nos processos industriais de produção de etanol, pois diversos ácidos são formados e excretados no meio durante a fermentação, sobretudo pelas bactérias contaminantes, sendo as bactérias lácticas e acéticas as mais abundantes no processo. Isolados de *I. orientalis* tem sido reportados como mais resistentes a estes ácidos do que a levedura *S. cerevisiae* (HALM *et al.*, 2004; CASEY; DOBSON, 2003). Quando o pH externo baixa bastante (2,5 - 3,5) a forma protonada dos ácido fracos penetram maciçamente nas células da levedura *S. cerevisiae* e o pH interno cai inviabilizando as células (DORTA *et al.*, 2006). A levedura *I. orientalis* parece dispor de mecanismos não conhecidos de proteção de seu pH interno. A metabolização rápida destes ácidos parece fazer parte destes mecanismos de proteção.

Tabela 3. Fermentação de glicose por linhagens de *I. orientalis* em meio YPD (ensaio de Durham) com pH 2,5 e 40°C.

Linhagens	Formação do CO ₂ em função do tempo ^(a)			
	13 h.	21 h.	30h.	40h.
<i>I. orientalis</i> (NCAIM Y01030) ^(p)	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> (IQAr/45-1)	-	-	-	-
29B ^(p) , 195B ^(p) ,	++	++	++	++
75B ^(p) , 167B ^(p) , 181B-1 ^(p)	+	++	++	++
192B ^(p) , 194B, 199B ^(p) .	-	-	+	++
79B ^(p) , 95B, 96B, 130B ^(p) , 148B ^(p) , 156B ^(p) , 166B ^(p) , 161B ^(p) , 169B ^(p)	-	-	-	+
10B, 13B, 14B, 16A, 16B, 22B, 25B, 26B, 49B, 55B, 56B, 57B, 59B, 62B, 63A, 63B, 69B, 73B, 78B, 80B, 82B, 84B, 101B, 102B, 105B, 106B, 110B, 112B, 113B, 114B, 116B, 118B, 119B, 122B, 128B, 136B, 142B, 144B, 145B, 146B, 151B, 154B, 157B, 159B, 162B, 164B, 170B, 171B, 172B, 173B, 198B,	-	-	-	-

^(a) Formação de CO₂: (++) = enchimento completo dos tubos com gás; (+) = enchimento de um 1/3 do volume dos tubos de Durham com gás; (-) = sem formação de gás.

^(p) Formação de película positiva.

As melhores linhagens selecionadas com pH 2,5 são apresentadas na Tabela 4. Estas linhagens (29B, 195B, 75B, 167B, 181B-1) que fermentaram em um tempo máximo de 21 horas (Tabela 3) passaram a fermentar mais rápido (12-15h) a pH 4,5. A elevação do pH favoreceu a fermentação de glicose por estas linhagens. Isto indica que a diminuição de pH reduz a velocidade de fermentação. A linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* fermentou mais rápido (a partir de 15 horas) do que a linhagem “type strain” de *I. orientalis* (17 horas), porém de forma mais lenta que as linhagens mais tolerantes à acidez (12 horas) com pH 4,5. Assim, as linhagens da levedura *I. orientalis* mais tolerantes com pH 2,5 parecem apresentar uma atividade fermentativa maior que a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* na faixa de pH de 2,5 a 4,5.

Tabela 4. Fermentação de glicose em meio YPD com pH 4,5 e 40°C pelas linhagens de *I. orientalis* que fermentaram mais rápido a glicose a pH 2,5 num período de 13-40h (Tabela 3).

Linhagens	Formação do CO ₂ em função do tempo ^(a)			
	12 h.	15h.	17h.	24h.
<i>I. orientalis</i> (NCAIM Y01030) ^(p)	+	+	++	++
<i>S. cerevisiae</i> (IQAr/45-1)	+	++	++	++
75B ^(p) , 79B ^(p) , 95B, 110B, 195B ^(p)	++	++	++	++
29B ^(p) , 96B, 161B ^(p) , 167B ^(p) , 181B-1 ^(p)	+	++	++	++
145B ^(p) , 194B	+	+	++	++
101B	-	-	+	++
130B, 148B, 156B, 166B, 169B, 192B, 199B	-	-	-	-

^(a) Formação de CO₂: (++) = enchimento completo dos tubos com gás; (+) = enchimento de um 1/3 do volume dos tubos de Durham com gás; (-) = sem formação de gás.

^(p) Formação de película positiva.

A elevação do pH para 6,5 (Tabela 5) não teve efeito significativo sobre a fermentação (fermentação em 14-17 horas) com as linhagens que concluíram a fermentação em 12-15 horas a pH 4,5 (75B, 79B, 95B, 110B, 195B, 29B, 96B, 161B, 167B, 181B-1). Assim, o pH afetou a fermentação

com menores efeitos na faixa de pH de 4,5-6,5. Contudo, foram selecionadas duas cepas (29B e 195B) que fermentaram muito rapidamente na faixa de pH de 2,5-4,5 (12 horas), porém estas formaram película. Por outro lado, notou-se que se pode fermentar rápido com pH 4,5 e sem formação de película com três isolados que são as linhagens 95B, 110B, e 96B (fermentação completa em 12h), mas estas linhagens não fermentaram com pH 2,5 e portanto são reportadas como menos resistentes à acidez. Foram poucas as linhagens que não formaram película no meio YPD a temperatura de 40°C. A formação de películas ligadas à parede dos tubos ou na superfície do meio é uma característica indesejável por retirarem células do meio. Nos reatores industriais é comum a presença de finas películas na superfície do meio, isto ocorre porque a membrana celular de algumas células de levedura possui propriedades hidrofóbicas que fazem possível a sua adsorção às bolhas de CO₂ produzido durante a fermentação, favorecendo assim a subida das células até a superfície do meio, este fenômeno é denominado de flotação (PALMIERI *et al.*, 1996). Esta característica de formar películas é comum das leveduras utilizadas em cervejaria (WALKER, 1998).

Tabela 5. Fermentação de glicose em meio YPD com pH 6,5 e 40°C utilizando os isolados que fermentaram a pH 4,5 no intervalo de 12-17h (Tabela 4).

Linhagens	Formação do CO ₂ em função do tempo ^(a)		
	14 h.	17h.	20h.
<i>I. orientalis</i> (NCAIM Y01030) ^(p)	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i> (IQAr/45-1)	++	++	++
29B ^(p) , 75B ^(p) , 79B ^(p) , 95B, 96B, 110B, 161B ^(p) , 167B ^(p) , 181B-1 ^(p) , 195B^(p)	++	++	++
105B ^(p) , 145B ^(p) ,	+	++	++
101B, 106B, 194B	-	+	++

^(a) Formação de CO₂: (++) = enchimento completo dos tubos com gás; (+) = enchimento de um 1/3 dos tubos com gás; (-) = negativa.

^(p) Formação de película positiva.

A fermentação em meio YPD líquido e pH ajustado para 2,5-6,5 (Tabelas 3-5) variou com as linhagens entretanto as fermentações mais rápidas ocorreram a pH 4,5 para um número maior de linhagens que a pH 2,5. A maioria das linhagens não fermentaram a pH 2,5, porém algumas poucas linhagens (29B, 195B, 75B, 167B, 181B-1) fermentaram tanto a pH 4,5 quanto a 2,5. Como se observa nas tabelas anteriores, a linhagem 195B que foi selecionada para este estudo, fermentou na faixa de pH 2,5-6,5 apesar da formação de película.

4.1.2. Ensaio qualitativos de assimilação e fermentação de melaço hidrolisado e não hidrolisado a 40°C

A Tabela 6 apresenta os seguintes resultados: a) crescimento em melaço solidificado; b) crescimento em melaço líquido; c) formação de película sobre o melaço líquido e d) fermentação (ensaio de Durham) utilizando melaço não hidrolisado 10% (m/v, ART).

Crescimento em melaço solidificado

Apesar da temperatura elevada, intensidades de crescimento fracas, médias e fortes foram observadas nas placas de Petri contendo melaço depois de 24 horas de incubação para todas as linhagens ensaiadas, as quais também mostraram superfícies lisas e rugosas com bordas irregulares e regulares ao redor da zona de crescimento, como ilustrado na Figura 6. Setores de massa celular emergiram fora das bordas da zona de replicação para algumas linhagens de *I. orientalis*. Ilustram-se na Figura 6 colorações variáveis devido à incorporação diferencial dos pigmentos melanoides (compostos orgânicos de alto peso molecular formados durante o aquecimento do caldo de cana) presentes no melaço (linhagens 96B e 110B com coloração clara e linhagens 195B e 199B com coloração escura). Assim as linhagens com colônias rugosas incorporaram os pigmentos com uma maior intensidade do que as linhagens com colônias lisas.

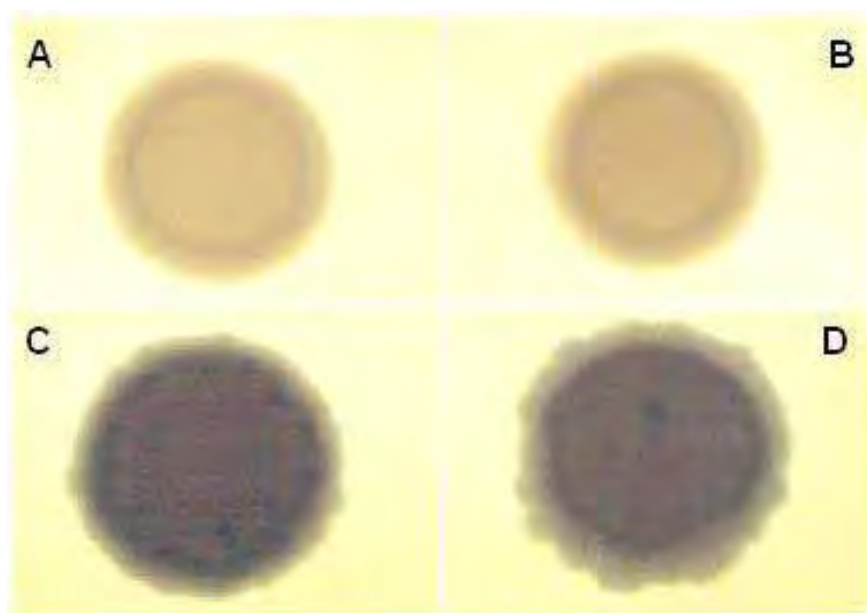


Figura 6. Crescimento dos isolados de *I. orientalis* em melaço não hidrolisado solidificado (10%, ART): A, linhagem 96B (superfície lisa com borda regular); B, linhagem 110B (superfície lisa com borda regular); C, 195B (superfície rugosa com borda regular); D, linhagem 199B (superfície rugosa com borda irregular).

Crescimento em melaço líquido

Todos os isolados de *I. orientalis* assim como as linhagens controles de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* mostraram crescimento em melaço líquido (Tabela 6), o qual não foi medido, porém observado visualmente e avaliado com base na turbidez do meio.

Formação de película

A formação de películas foi observada sobre a superfície dos meios líquidos para a maioria das leveduras, sendo que as linhagens que apresentaram uma superfície lisa com bordas regulares em meio sólido não formam película durante os ensaios de fermentação, sugerindo uma relação entre a morfologia das colônias das células e a capacidade de formar películas.

Fermentação (ensaio de Durham)

A fermentação foi mais rápida (12h) para 73% dos isolados (40 isolados para um total de 70 leveduras). A “type strain” da *I. orientalis* e a

linhagem IQAr/45-1 da levedura *S. cerevisiae* também mostraram ensaio positivo de fermentação após 12 h (ver Tabela 6) .

Como as leveduras do gênero *Issatchenkia orientalis* não assimilam sacarose (BARNETT *et al.*, 2000), os ensaios positivos de crescimento e assimilação do melaço não hidrolisado podem ser atribuídos à utilização dos açúcares redutores livres (glicose e frutose) presentes no melaço em baixas concentração (2 a 3%). Por outro lado, as fermentações bastante rápidas (12h) indicam que as leveduras apresentam um bom desempenho a temperaturas elevadas (40°C) apesar da quantidade baixa de açúcar fermentável.

Tabela 6. Crescimento das linhagens de *I. orientalis* em melaço não hidrolisado (10% ART) e solidificado por Agar e fermentação (Durham) no mesmo melaço líquido a 40°C.

Linhagens	Crescimento e morfologia em melaço solidificado			Formação CO ₂ em melaço líquido (12 h.)	
	Intensidade (Um dia)	Superfície	Bordas	Ensaio Durham ^(a)	Película ^(b)
<i>I. orientalis</i> (NCAIM Y01030)	Forte	R	r	++	+
<i>S. cerevisiae</i> (IQAr/45-1)	fraco	L	r	++	-
10B, 16A, 16B, 26B, 29B, 55B, 56B, 57B, 62B, 63A, 69B, 73B, 78B, 79B, 84B, 105B, 112B, 116B, 118B, 126B, 130B, 136B, 142B, 145B, 146B, 148B, 154B, 157B, 161B, 162B, 164B, 166B, 167B, 169B, 170B, 198B, 199B	Forte	R	i	++	+
13B, 22B, 59B, 63B, 82B, 172B, 173B, 181B-1	médio	R	i	+	+
14B, 25B, 49B, 80B, 102B, 128B, 159B, 171B, 195B	Forte	R	r	++	+
113A, 114B, 119B, 122B, 144B, 156B, 192B	médio	R	r	+	+
96B, 101B, 106B, 110B, 194B	Forte	L	r	++	-

^(a)Ensaio Durham: (++) = enchimento completo dos tubos com gás; (+) = enchimento de um 1/3 do volume dos tubos com gás; (-) = negativo. ^(b)Formação de película: (+) positiva; (-) = negativa. Morfologia: R = rugosa; L = lisa. Bordas: i = irregular; r = regular.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados de crescimento (meio solidificado com ágar) e de fermentação (meio líquido) das linhagens em melaço hidrolisado (hidrólise ácida com HCl a 60°C) contendo um teor de 10% ART, medido antes da hidrólise. As linhagens ensaiadas não fermentaram em melaço líquido e a 40°C. Comparando-se as Tabelas 6 e 7, conclui-se que as condições de hidrólise possivelmente geraram inibidores de fermentação para todas as leveduras inclusive para a levedura *S. cerevisiae* (IQAr/45-1). No entanto, foi observado crescimento (crescimento não medido, porém observado visualmente e baseado na turbidez do meio) para 20 isolados (10B, 14B, 29B, 33B, 56B, 73B, 75B, 79B, 105B, 145B, 154B, 161B, 167B, 169B, 1995B, 199B, 95B, 96B, 110 B e 194B) e formação de películas no meio líquido para outros, assim como crescimento nos pontos de replicação sobre o meio sólido após um dia de incubação. Deste modo, o hidrolisado de melaço contém inibidores de fermentação (principalmente compostos furânicos), mas não de crescimento. Vários autores têm descrito a formação de compostos inibidores da fermentação e do crescimento (furfural, hidroximetilfurfural-HMF, ácido acético, fórmico e levulínico) quando o material lignocelulósico é submetido à hidrólise ácida (KLINKE *et al.*, 2004; GRAY *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007). Alguns destes compostos tóxicos do hidrolisado de bagaço de cana (HMF) também foram detectados no melaço (MAKAWI *et al.*, 2009). Apesar de o melaço conter a maior parte dos nutrientes essenciais para os microrganismos, ele também está constituído de íons metálicos (cálcio, sódio, ferro, magnésio, cobre, etc.) e colóides em suspensão, os quais em grandes concentrações podem ser tóxicos e inibitórios para as células (LIU *et al.*, 2008).

Tabela 7. Crescimento das linhagens de *I. orientalis* em melaço hidrolisado contendo 10% ART (medido antes da hidrólise) a 40°C e formação de CO₂ no mesmo meio líquido a 40°C.

Linhagens	Crescimento e morfologia em melaço solidificado		Evolução CO ₂ em melaço líquido (12 h.)	
	Intensidade (Um dia)	Superfície	Ensaio Durham ^(a)	Formação película ^(b)
<i>I. orientalis</i> (NCAIM Y01030)	Forte	R	-	+
<i>S. cerevisiae</i> (IQAr/45-1)	fraco	L	-	-
10B, 14B, 29B, 33B, 56B, 73B, 75B, 79B, 105B, 145B, 154B, 161B, 167B, 169B, 195B, 199B	Forte	R	-	+
13B, 16A, 16B, 25B, 26B, 55B, 56B, 57B, 73B, 80B, 84B, 110B, 102B, 112B, 116B, 118B, 119B, 126B, 128B, 130B, 136B, 142B, 146B, 148B, 157B, 164B, 172B, 171B, 198B, 199B	fraco	R	ND	ND
95B, 96B, 101B, 194B	Forte	L	-	-
101B, 106B, 198B	fraco	L	ND	ND

^(a) Ensaio Durham: (-) = negativo; ND = não determinado.

^(b) Formação de película: (+) positiva; (-) = sem formação de gás; ND = não determinado. Morfologia: R = rugosa; L = lisa. Bordas: i = irregular; r = regular.

4.1.3. Ensaio de assimilação de sacarose em meio YNB e fermentação em meio sintético pelos isolados

O YNB é um meio utilizado em ensaios de assimilação no qual o crescimento indica ocorrência de assimilação do nutriente ensaiado (BARNETT *et al.*, 2000). Apesar de *Issatchenkia orientalis* não assimilar e fermentar sacarose 1% como descrito pela taxonomia clássica (BARNETT *et al.*, 2000), foi decidido ensaiar a utilização deste açúcar como fonte de carbono elevando-se a sua concentração para 10% (condução mais próxima das usina) para certificarmos se os resultados seriam negativos para todos os isolados ensaiados no presente trabalho. Assim, a assimilação de

sacarose foi estudada em meio sólido YNB e a fermentação desta foi realizada em meio sintético líquido. A Tabela 8 descreve os resultados dos ensaios de assimilação de sacarose mostrando diferentes intensidades de biomassa acumulada nos pontos de replicação no meio YNB contendo 1% (m/v) sacarose e os ensaios de fermentação no meio sintético contendo 10% (m/v) sacarose. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (IQAR/45-1) e a “Type strain” da levedura *Issatchenkia orientalis* apresentaram intensidades de crescimento tanto fortes quanto médias, após três dias de incubação, enquanto que a fermentação da sacarose foi observada após 48 horas sem a formação de película na superfície dos meios e paredes dos tubos. A maioria das leveduras assimilou sacarose nos pontos de replicação após três dias de incubação a 30°C, mostrando superfícies rugosas e lisas. Apenas três linhagens apresentaram superfície lisa e bordas regulares ao redor das áreas de replicação. As intensidades de crescimento variaram de fraca, média a forte (10B, 16A, 16B, 62B, 73B, 78B, 84B, 95B, 128B, 142B, 195B, 198B, 199B). Cerca de 30 isolados fermentaram sacarose 10% (44% dos isolados), incluindo a linhagem 195B selecionada para os de fermentação em batelada simples.

Por outro lado, a fermentação e assimilação dos açúcares exigiram tempos mais longos (três dias a 40°C) quando o substrato foi sacarose (Tabela 8) do que quando o meio nutriente foi o próprio melaço (Tabela 7), o qual forneceu respostas positivas (assimilação e fermentação) em apenas 12-15 h. Os resultados positivos de assimilação de sacarose foram uma grande surpresa, uma vez que o meio sintético e YNB não contêm açúcares livres. Decidiu-se assumir que estas linhagens assimilam com maior dificuldade a sacarose que os açúcares livres presentes no melaço, no entanto os ensaios foram positivos para algumas linhagens certamente devido ao uso de alta concentração de açúcar no meio.

Tabela 8. Assimilação de sacarose (1%, m/v) a 30°C em meio YNB e formação de CO₂ em meio sintético contendo sacarose (10% m/v) a 40°C.

Linhagens	Crescimento (3 dias)	Biomassa nos pontos de replicação		Evolução CO ₂ (48 h.) ^(a)
		Superfície	Bordas	Ensaio Durham
<i>I. orientalis</i> (linhagem NCAIM Y01030)	médio	R	i	+
<i>S. cerevisiae</i> (IQAR/45-1)	forte	L	r	+
10B, 16A, 16B, 62B, 73B, 78B, 84B, 95B, 128B, 142B, 195B, 198B, 199B.	forte	R	i	+
13B, 14B, 22B, 25B, 26B, 29B, 49B, 79B, 82B, 130B, 136B, 144B, 145B, 172B, 173B, 181B-1, 192B.	médio	R	i	+
55B, 56B, 57B, 59B, 63A, 63B, 69B, 75B, 80B, 102B, 112B, 114B, 116B, 118B, 119B, 126B, 146B, 148B, 151B, 154B, 156B, 157B, 159B, 161B, 162B, 164B, 166B, 167B, 169B, 170B	fraco	R	i	ND
194B	forte	L	r	+
96B, 101B	fraco	L	r	ND
106B, 110B, 122B	-	-	-	ND

^(a) Ausência de película em todos os casos. ND = não determinado.
Morfologia: R = rugosa; L = lisa. Bordas: i = irregular; r = regular.

4.1.4. Assimilação de outras fontes de carbono em meio YNB

A literatura descreve a utilização de frutose e glicerol pela levedura *I. orientalis* (BARNETT *et al.*, 2000). No entanto se fez necessário confirmar estas características para os isolados utilizados no presente trabalho.

Os isolados que cresceram melhor em melaço não hidrolisado foram ensaiados quanto a capacidade de assimilar glicerol e frutose. Os resultados dos ensaios de assimilação de glicerol e frutose a 30°C e 40°C foram apresentados na Tabela 9. Conforme esperado, a levedura *S. cerevisiae*

(IQAr/45-1) não assimilou glicerol, porém assimilou frutose. Por outro lado, as leveduras da espécie *I. orientalis* assimilaram frutose mais rápido do que o glicerol a 30°C, pois a 40°C a assimilação de ambas fontes de carbono foi equivalente. Isto indica, que a assimilação de glicerol foi estimulada pela elevação da temperatura a 40°C para algumas linhagens de *I. orientalis*. A Figura 7 ilustra os efeitos da temperatura sobre o crescimento em glicerol, sendo estes dependentes das linhagens e da temperatura variando da seguinte forma:

- a) Aumento do crescimento a 40°C (em relação ao crescimento a 30°C) foram observados para as seguintes isolados de *I. orientalis*: linhagem 84B, 96B, 195B, 181B-1, 194B, 192B, 73B, 14B, 29B e 105B.
- b) Redução do crescimento a 40°C: linhagem NCAIM Y01030 da *I. orientalis*.
- c) Sem efeito: linhagem 33B, 10B, linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae*, 95B, 56B, 110B, e 142B.

Tabela 9. Assimilação de glicerol (1%, m/v) e de frutose (1%, m/v) em meio YNB e temperaturas de 30°C e 40°C por algumas linhagens de *I. orientalis*.

Linhagens	Fontes de Carbono	Crescimento após dois dias de replicação	
		30°C	40°C
<i>I. orientalis</i> (strain NCAIM Y01030)	Glicerol	(+)	(++)
	Frutose	(++)	(++)
<i>S. cerevisiae</i> (IQAr/45-1)	Glicerol	(-)	(-)
	Frutose	(++)	(++)
33B, 10B, 14B, 29B, 56B, 73B, 84B, 95B, 96B, 105B-R, 110B, 142B, 181B-1, 192B, 194B, 195B	Glicerol	(+) ^(a)	(++) ^(a)
	Frutose	(++)	(++)

^(a) negativo para as linhagens 33B, 56B e 110B.

Crescimento: (++) = forte; (+) = fraco; (-) = negativo.

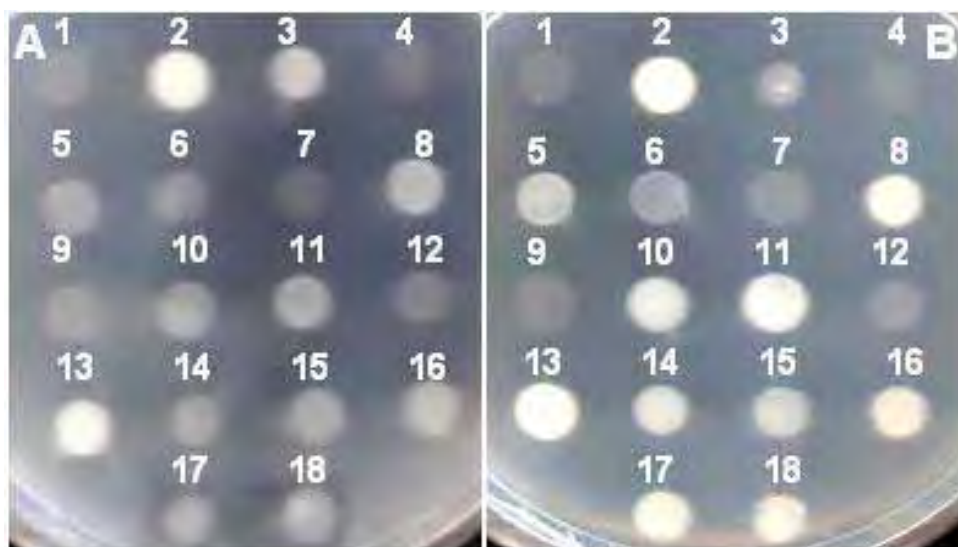


Figura 7. Placas mostrando a assimilação de glicerol em meio YNB após um dia de incubação a 30°C (A) e 40°C (B): 1 (33B), 2 (10B), 3 (*I. orientalis* NCAIM Y01030), 4 (*S. cerevisiae* IQAr/45-1), 5 (84B), 6 (96B), 7 (95B), 8 (**195B**), 9 (56B), 10 (181B-1), 11 (194B), 12 (110B), 13 (142B), 14 (192B), 15 (73B), 16 (14B), 17 (29B), 18 (105B).

O glicerol é um subproduto inevitável do processo de transesterificação na produção de biodiesel e das indústrias de fabricação de sabão. O biodiesel apresenta várias vantagens sob os combustíveis a base de petróleo, motivo pelo qual ele tem atraído muita atenção recentemente. O glicerol gerado é atualmente aplicado, por exemplo, na indústria de cosméticos. Contudo o recente aumento na produção de biodiesel dificulta a utilização eficiente de tanto glicerol formado. Nas ultimas décadas, a conversão de glicerol por microrganismos tem sido foco de várias investigações (ITO *et al.*, 2005). Os dados obtidos com algumas linhagens de *I. orientalis* sugerem a possível utilização destas leveduras para o consumo de glicerol a elevadas temperaturas para obtenção de biomassa de leveduras para diversos fins. Além disto, o glicerol externo formado durante a fermentação alcoólica é altamente indesejável. Uma levedura que assimila glicerol estaria re-utilizando este subproduto.

4.1.5. Morfologia das colônias

A Figura 8 ilustra as diferenças em morfologias das colônias e das células de duas linhagens da levedura *I. orientalis*. As células aparecem alongadas e de comprimentos variáveis, sobretudo quando as bordas das colônias são rugosas ou irregulares como é o caso da linhagem 181-B1 (Figura 7B). A coloração das colônias variou de brancas opacas a brancas brilhantes. A morfologia das células crescidas em meio YM líquido foram bastante semelhantes à morfologia das células da linhagem CBS 5147 de *I. orientalis* descrita na literatura (BARNETT *et al.*, 2000).

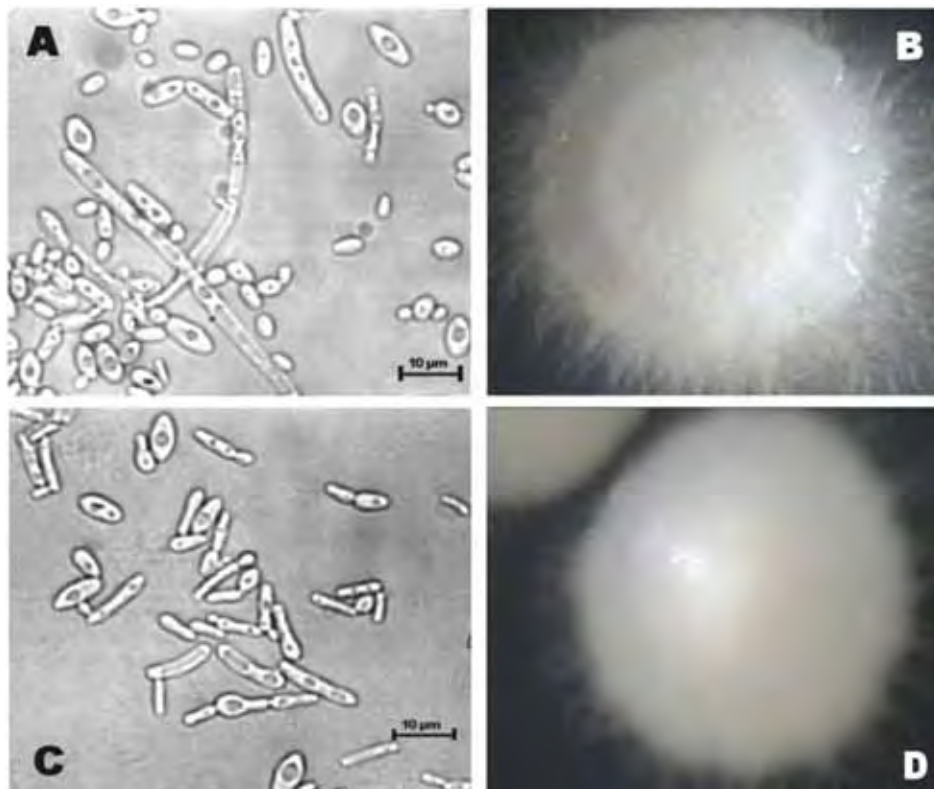


Figura 8. Células (1000 X) das linhagens 181-B1 (A) e 110B (C) de *I. orientalis* e morfologia das colônias (40 X), após 3 dias de crescimento a 30°C em meio YM. As colônias foram rugosas e opalescentes para a linhagem 182-B1 (B), lisas e brilhantes para a linhagem 110B (D).

4.2. EFEITO DO pH INICIAL DO MEIO SOBRE A FERMENTAÇÃO EM BATELADA USANDO CULTIVOS DE ALTO INÓCULO

Após a realização dos ensaios qualitativos de fermentação e assimilação de distintas fontes de carbono, selecionou-se a linhagem 195B de *I. orientalis* para os estudos de produção de etanol a temperaturas elevadas utilizando o meio rico YPD e melaço de cana-de-açúcar. O processo de fermentação escolhido foi batelada simples, pois é preciso conhecer o comportamento da levedura em sistemas fechados para depois levar essas condições de fermentação a escalas maiores.

Para confirmar a tolerância da levedura *I. orientalis* à acidez (dados obtidos nos ensaios qualitativos de fermentação, Tabela 3) foram realizados experimentos em batelada simples em meio YPD contendo 100 g/L de glicose a 40°C. A linhagem 195B de *I. orientalis* e a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* produziram 43 g/L de etanol a pH 4,5, porém a retenção da viabilidade no final do processo foi maior para *I. orientalis* (94%). A Figura 9B ilustra a perda total de viabilidade pelas células de *S. cerevisiae* quando o pH do meio foi diminuído para 2,5; consequentemente a produção de etanol foi reduzida nessas condições de fermentação.

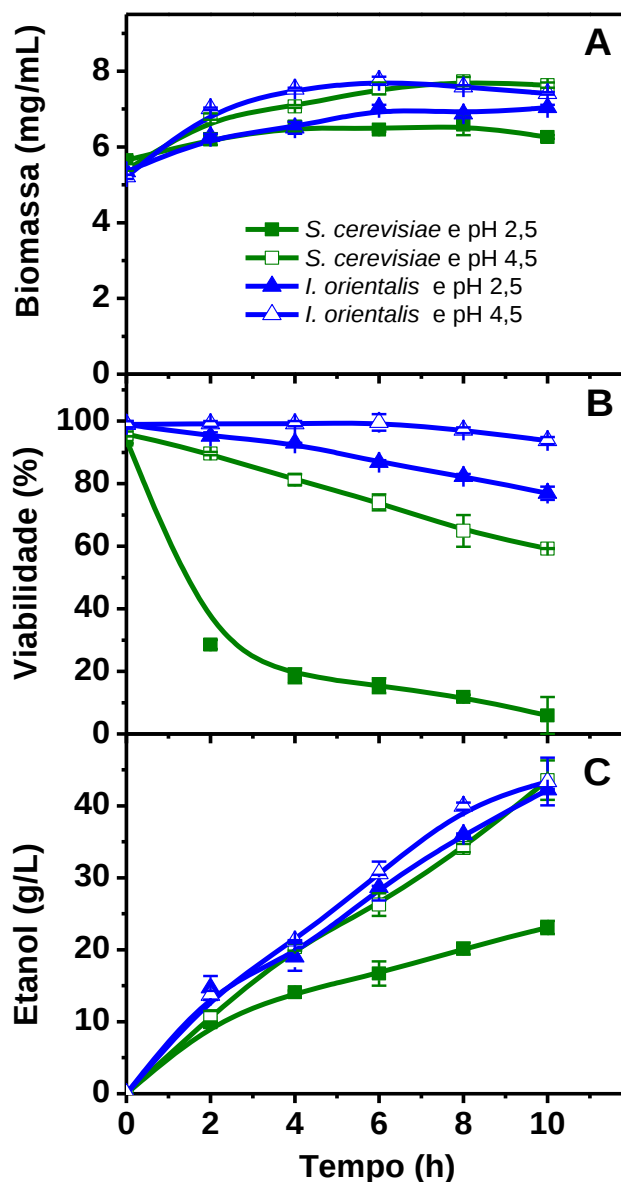


Figura 9. Curvas de tempo de fermentação das leveduras *S. cerevisiae* a pH 2,5 (-■-); *S. cerevisiae* a pH 4,5 (-□-); *I. orientalis* a pH 2,5 (-▲-) e *I. orientalis* a pH 4,5 (-△-) em meio YPD contendo 100 g/L glicose a 40°C.

Neste experimento foi obtida uma concentração final de etanol da ordem de 43% (v/v) a pH 2,5 e a 40° C com uma viabilidade celular de 77% no final da fermentação, mostrando não somente a tolerância de *I. orientalis* à acidez como também às temperaturas elevadas.

Na verdade esta capacidade de fermentar a pH baixo não representa uma grande novidade pois, Thalagala *et al.* (2009) descrevem linhagens de *I. orientalis* que fermentaram glicose proveniente da hidrolise ácida de resíduos lignocelulósicos a pH 2-3 e níveis de etanol na faixa de 2,0-2,5% (v/v) foram

atingidos. Por outro lado, níveis mais altos de etanol da ordem de 9% foram obtidos em cinco dias de fermentação a partir de glicose 20%, pH 2,5 e a 30°C. Deste modo, a linhagem 195B de *I. orientalis* parece ser ainda mais promissora pois foi capaz de produzir 5,5 % v/v (43 g/L) de etanol a pH 2,5 e temperatura de 40°C em apenas 10 horas de fermentação.

4.3. FERMENTAÇÕES EM BATELADA SIMPLES UTILIZANDO A LINHAGEM 195B DE *I. orientalis* EM CULTURAS DE BAIXO INÓCULO

4.3.1. Comparação da atividade fermentativa da linhagem 195B de *I. orientalis* em meio sintético e melaço

A linhagem 195B da levedura *I. orientalis* mostrou-se capaz de fermentar e assimilar sacarose nos ensaios qualitativos realizados em meio sintético (Tabela 8). Por isto, decidiu-se ensaiar esta levedura em batelada simples utilizando o meio sintético líquido contendo sacarose (120 g/L) e também melaço diluído 120 g/L (ART). As curvas de tempo obtidas para a produção de etanol e consumo de açúcares confirmam claramente a deficiência de *I. orientalis* quanto a fermentação de sacarose no meio sintético (Fig 9C e 9D). No entanto, foi observada uma produção de etanol da ordem de 19 g/L com consumo parcial dos açúcares redutores totais quando a levedura foi inoculada no melaço. Ocorreu crescimento no melaço, pois ele é um meio muito mais rico em nutrientes, porém a produção de etanol foi muito baixa. O baixo teor de etanol produzido por *I. orientalis* foi certamente devido ao açúcar redutor livre (30 g/L) presente no melaço em baixa concentrações.

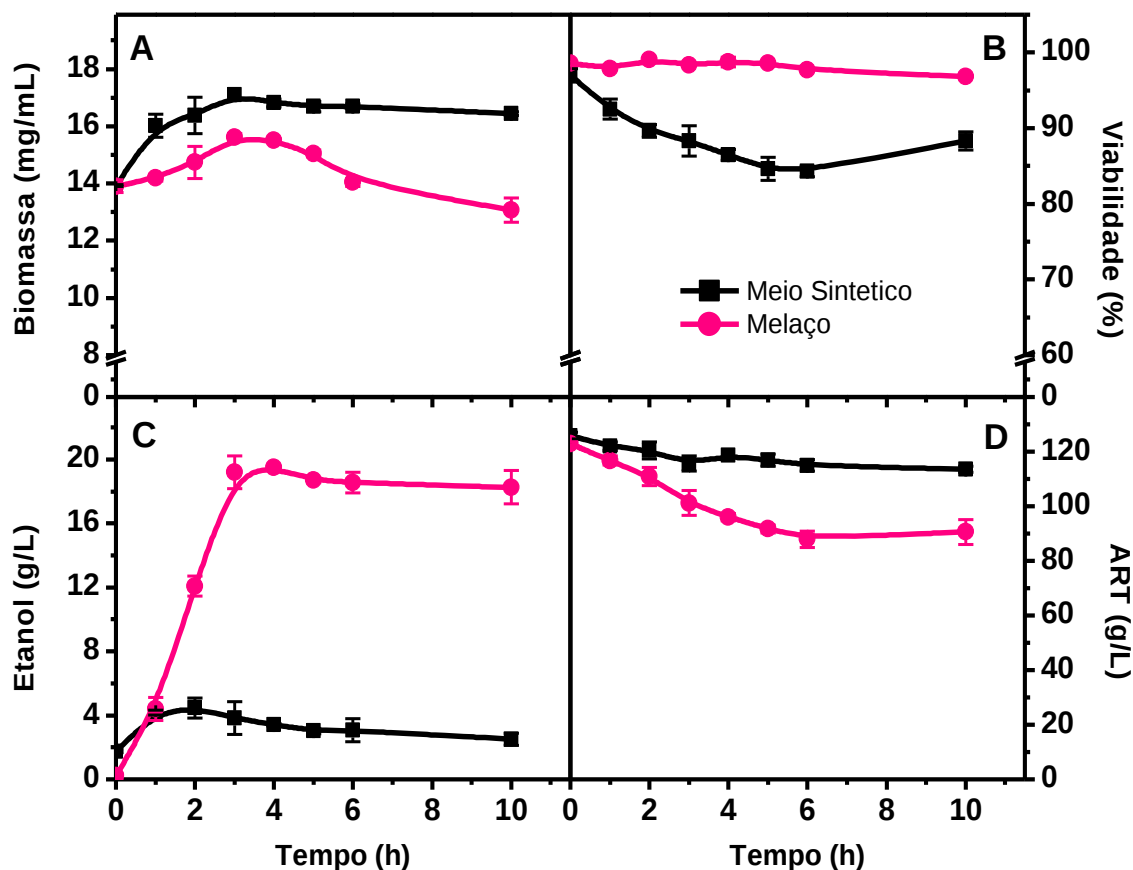


Figura 10. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) da linhagem 195B de *I. orientalis* em meio sintético contendo 120 g/L de sacarose (-■-) e no melaço 120 g/L ART (-●-) a 40°C: inóculo inicial de 14 mg/mL e incubação sob agitação de 80 rpm.

Comparando-se os resultados obtidos na Figura 10 (fermentações em batelada simples), com os dados descritos na Tabela 8 (fermentações em tubos de Durham), observa-se que a linhagem 195B de *I. orientalis* apresentou comportamento diferente quanto à fermentação dos açúcares em melaço e em meio sintético a 40°C. Nos ensaios qualitativos realizados com a linhagem 195B (Tabela 8) observou-se resultado positivo para a assimilação da sacarose após três dias de incubação e após dois dias para a fermentação ao passo que a fermentação de sacarose em batelada simples e no meio sintético foi acompanhada por apenas 10 horas (Figura 10). Tal vez *I. orientalis* precise de um tempo prolongado de incubação para que ocorra a utilização desta fonte de carbono.

4.3.2. Comparação entre a fermentação de melaço com a levedura *S. cerevisiae*, *I. orientalis* e a cultura mista destas duas leveduras

Na Figura 11 são ilustradas as curvas de fermentação obtidas a 42°C quando os meios contendo melaço (160 g/L ART) foram inoculados com a levedura *S. cerevisiae*, *I. orientalis* e a mistura destas duas leveduras (co-cultura). O frasco contendo a co-cultura foi inoculado utilizando uma mistura de 1 parte da linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* e 3 partes da linhagem 195B de *I. orientalis* (proporção 1:3, expressa em m/m) para iniciar o processo. Observa-se que a mistura das duas leveduras permitiu elevar a produção de etanol para um valor de 62 g/L, ou seja um valor muito próximo do obtido com a levedura *S. cerevisiae* após 30 horas de fermentação. Provavelmente as culturas exigiram um tempo longo de fermentação por causa da baixa concentração de células totais utilizadas como inóculo (2 mg/mL). A Figura 11 mostra também uma diferença significativa ($\alpha=0,05$) entre a viabilidade das células de *S. cerevisiae* e a cultura mista das duas leveduras. Deste modo, observa-se uma perda muito grande de viabilidade das células de *S. cerevisiae* a partir das 15 horas de fermentação devido à alta temperatura do processo (42°C), ao passo que os frascos inoculados com *I. orientalis* e a mistura das duas leveduras mostraram poucas variações em viabilidade. A levedura *S. cerevisiae* conseguiu sobreviver até 47°C em um fermentador contínuo, diminuindo a viabilidade celular, a formação de biomassa e etanol à medida que a temperatura se elevou de 30°C a 47°C (LALUCE *et al.*, 2002). A Figura 11 D ilustra valores de açúcar residual semelhantes nos frascos inoculados com a levedura IQAr/45-1 e com a co-cultura. A co-cultura de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* fermentou a maior parte do açúcar presente no melaço a 42°C mantendo uma ótima viabilidade celular. Apesar dos valores de $Y_{P/S}$ serem iguais na fermentação com *S. cerevisiae* e com a co-cultura (Tabela 10), as diferenças significativas ($\alpha=0,05$) em viabilidade mostram a vantagem de se utilizar a co-cultura para a fermentação de melaço a temperaturas tão altas quanto 42°C. Por outro lado, a Figura 11A ilustra uma formação grande de biomassa da levedura *I. orientalis* (aumento de 140% do inóculo inicial) sendo isto atribuído a uma preferência da levedura em crescer do que em fermentar.

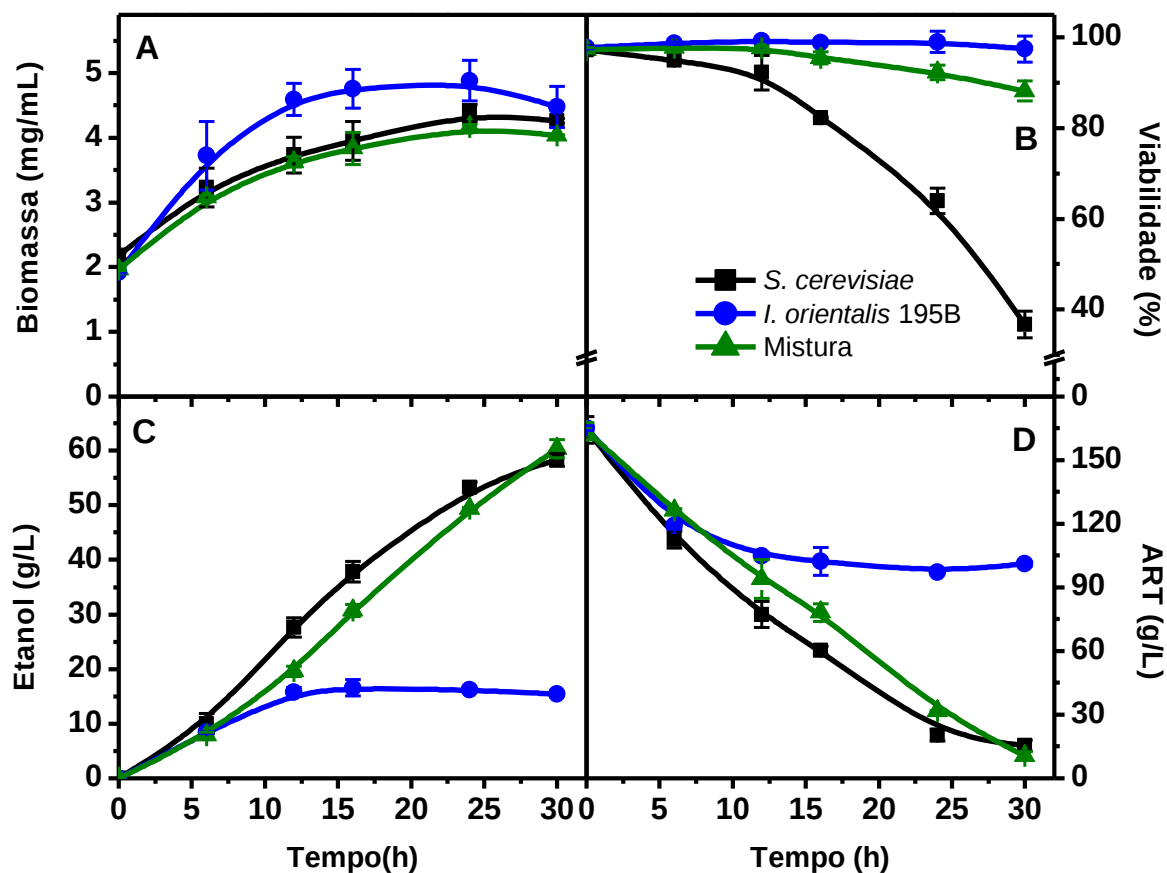


Figura 11. Comparação entre culturas simples e mistas das leveduras *S. cerevisiae* (linhagem IQAr/45-1) e *I. orientalis* (linhagem 195B) fermentando melaço 160 g/L ART a 42°C: volume de meio no frasco (1V meio : 5V frasco), inóculo de 2 mg/mL e incubação sob agitação de 80 rpm.

Na Figura 11, fica evidente a necessidade das duas leveduras *S. cerevisiae* e *I. orientalis* que apresentaram um sinergismo durante a fermentação do melaço e que permitiu aumentar o rendimento alcoólico e viabilidade final das células a 42°C.

Tabela 10. Comparação estatística da viabilidade e da conversão de substrato em produto utilizando culturas simples e mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (dados da Figura 11).

Medidas e Parâmetros cinéticos	Tipos de culturas		
	Co-cultura	Culturas simples	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>I. orientalis</i>
$Y_{P/S}$	0,37±0,01 ^a	0,37±0,02 ^a	0,24±0,01 ^b
Teste <i>T</i>		p>0,05	p<0,05
Viabilidade%	92,36±1,61 ^a	63,94±2,81 ^b	99,05±2,40 ^a
p (Teste χ^2)		p<0,05	p>0,05

Valores indicados pela mesma letra não diferem em relação ao experimento controle (co-cultura) conforme indica o teste *t* ($\alpha=0,05$); $Y_{P/S}$: fator de conversão de açúcar em etanol.

4.3.3. Efeito do ART do melaço

A produção de altos níveis de etanol requer uma levedura tolerante a elevadas concentrações de açúcar, visando este objetivo decidiu-se estudar o efeito da concentração dos açúcares redutores totais presentes no melaço sob a cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis*. A Figura 12 ilustra que a elevação do ART do melaço (valores ≥ 150 g/L) diminuiu a formação de biomassa e prolongou o tempo de fermentação (acima de 25h) para um consumo total do açúcar. A elevação do ART acima de 190 g/L levou a aumentos no açúcar residual do meio (açúcar não fermentado). Assim, fermentações de mais curta duração podem ser obtidas utilizando 150-190 g/L de ART no meio. Fermentações com níveis de açúcar maiores que 150 g/L de ART comprometem a viabilidade celular (SOUZA *et al.*, 2007). O teor máximo de etanol produzido neste experimento foi 65 g/L utilizando um melaço de 150 g/L de ART e em um tempo fermentação de 24 horas e com viabilidade de 88% no final do processo.

Segundo Maiorella *et al.* (2009), um processo industrial é considerado economicamente viável quando a concentração do açúcar na alimentação numa fermentação operada em batelada alimenta foi de 16,7% (m/v) o que leva a um rendimento máximo de etanol de 87,5 g/L (8,75% m/v ou 11,1%

v/v) e um açúcar residual de 2,1 g/L em um tempo de residência de 6,5 horas para completar a fermentação a 30°C. No entanto, algumas destilarias submetem a levedura *S. cerevisiae* a condições de estresse elevado (temperaturas acima de 37°C, 20-25% de açúcar na alimentação) e isto leva a grandes perdas em viabilidade e geração de heterogeneidade genética, de tal sorte que o consumo dos açúcares passa a ser grandemente comprometido. Contudo, é interessante notar na Figura 12B que o aumento da concentração do açúcar não levou a perdas de viabilidade quando um inóculo baixo de células (2 mg/mL) é utilizado.

Por outro lado, a Tabela 11 (tratamento estatístico) indica não haver diferença significativa do fator de conversão de açúcar em etanol ($Y_{P/S}$) em meios contendo 150-250 g/L de ART. Quando o açúcar no meio é maior que 250 g/L, o $Y_{P/S}$ apresenta um valor pequeno confirmando que altas concentrações de açúcar minimizam a atividade fermentativa da levedura para garantir a sua sobrevivência.

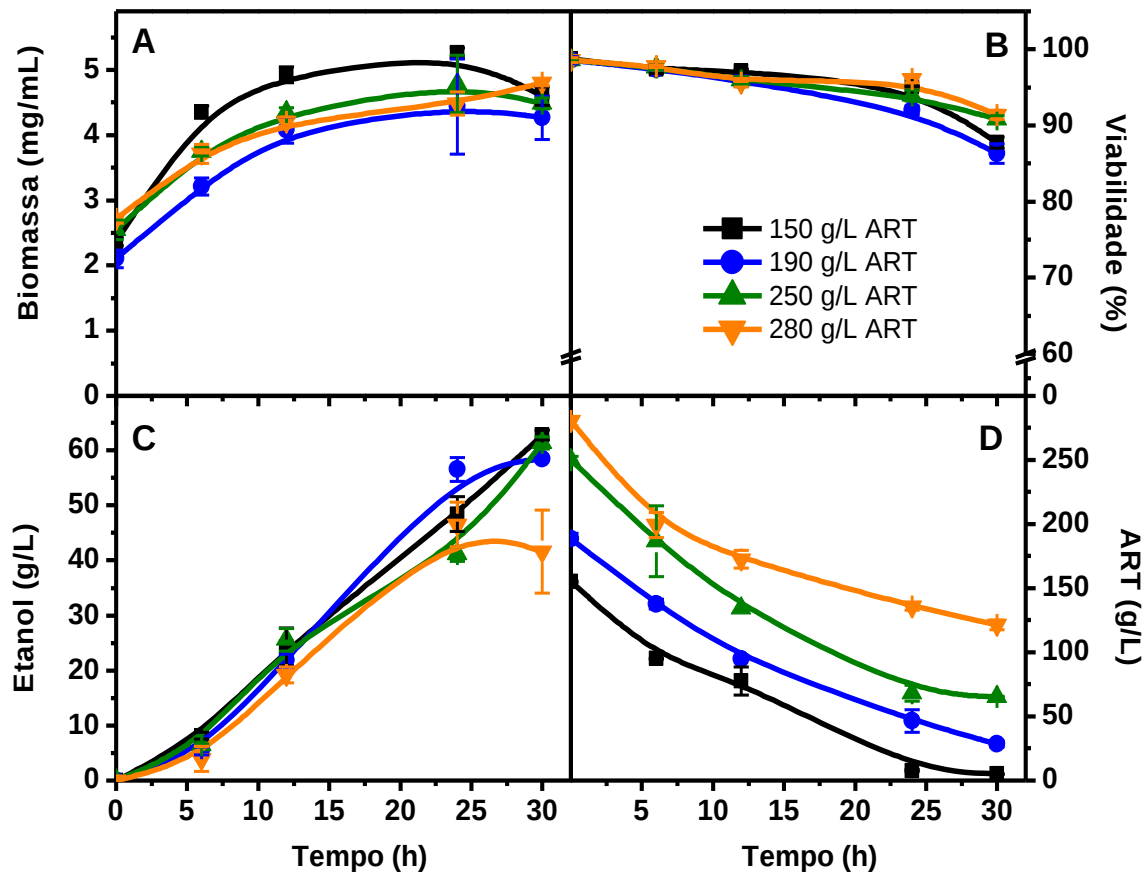


Figura 12. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) variando o ART do melaço de 150 g/L ART (-■-), 190 g/L ART (-●-), 250 g/L ART (-▲-) e 280 g/L % ART (-▼-) em co-cultura de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* a 42°C: inóculo de 2 mg/mL e incubação sob agitação de 80 rpm.

Tabela 11. Comparação estatística da conversão de substrato em produto em concentrações crescentes de ART no melaço (dados da Figura 12).

Parâmetros cinéticos	Concentrações de açúcar			
	150 g/L ART	190 g/L ART	250 g/L ART	280 g/L ART
$Y_{P/S}$	$0,42 \pm 0,01^a$	$0,36 \pm 0,01^a$	$0,33 \pm 0,01^a$	$0,26 \pm 0,05^b$
p (Teste T)		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

Valores indicados pela mesma letra não diferem do experimento controle (150 g/L de ART) pelo teste *t* ($\alpha=0,05$); $Y_{P/S}$: fator de conversão de açúcar em etanol.

4.3.4. Efeito do volume de meio no frasco

Elevadas concentrações de oxigênio podem ser inibitórias para a produção de etanol, este fenômeno é chamado de efeito Pasteur (WALKER, 1998). Assim, quando a levedura dispõe de muito oxigênio a atividade respiratória é maior, aumentando a formação de biomassa. Para diminuir a oxigenação no processo e aumentar a atividade fermentativa variou-se o volume de meio contido no reator. A Figura 13 ilustra que a elevação do volume de meio de 25mL para 75mL reduziu o crescimento, porém com um indesejável aumento do tempo de fermentação. A produção de etanol foi equivalente para as duas condições de fermentação após 28 horas, no entanto o aumento do volume de meio levou a acréscimos no açúcar residual do meio (açúcar não fermentado).

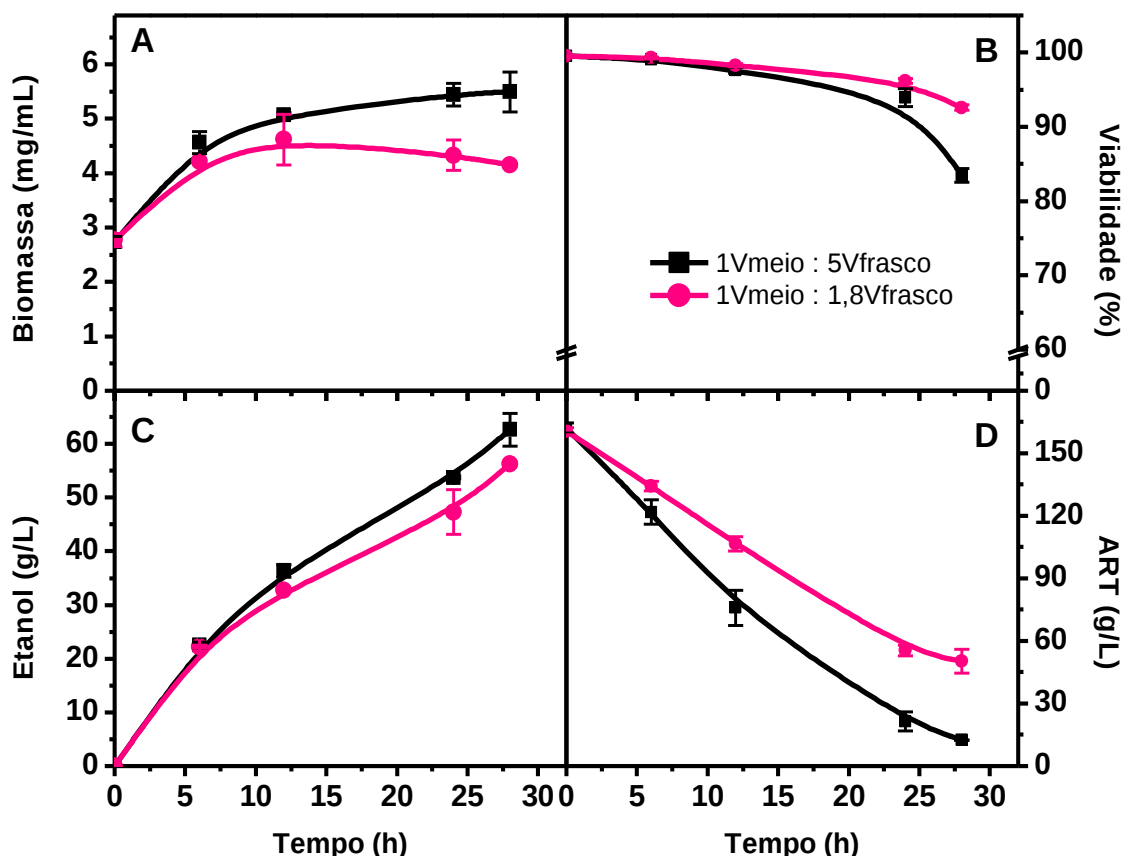


Figura 13. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) obtidas variando-se a proporção do volume de meio e volume de frasco 1v_{meio}: 5v_{frasco} (-■-); 1v_{meio}: 1,8 v_{frasco} (-●-); melaço 160 g/L de ART, 2 mg/mL da cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* do inóculo constituído pela mistura de 1 parte de *S. cerevisiae* : 3 partes de *I. orientalis* e incubação sob agitação de 80 rpm a 42°C.

A levedura *I. orientalis* cresce e fermenta em anaerobiose. Assim, o controle da aeração pode ser uma forma de reduzir a formação de biomassa. Shin *et al.* (2002) observaram acúmulo de biomassa com a queda da tensão de oxigênio dissolvido causada pelo consumo de glicose. O acúmulo máximo de etanol produzido foi observado quando a levedura parou de crescer. A partir deste ponto a levedura *I. orientalis* passou a consumir o etanol produzido. Resultados semelhantes foram obtidos com a levedura *S. cerevisiae*. No entanto, no presente trabalho consumo de etanol não foi observado por esta levedura que cresceu mais lentamente quando a aeração do meio foi limitada pelo aumento do volume do meio no frasco.

4.4. FERMENTAÇÕES EM BATELADA SIMPLES A 42°C UTILIZANDO ALTO INÓCULO DA CULTURA MISTA DE *I. orientalis* e *S. cerevisiae*

4.4.1. Efeito da concentração do inóculo misto

A concentração de inóculo foi variada na faixa de 2 mg/mL a 10 mg/mL, com isto observou-se que com um inóculo maior que 2 mg/mL é possível reduzir o tempo de fermentação (consumo total do açúcar), porém com perdas grandes de viabilidade acima de 12 horas (Figura 14B). O tempo de fermentação prolongou-se por mais tempo (até 30 horas) devido à continuidade da atividade fermentativa. O acúmulo de biomassa foi maior quando um inóculo baixo foi utilizado devido à maior disponibilidade de nutrientes. Um teor de etanol de 70 g/L foi atingido a 42°C, quando se utilizou um melaço de 160 g/L de ART e um inóculo de 10 mg/mL. Netas condições o tempo de fermentação para o consumo máximo de açúcar foi de 24 horas. No entanto, após 12 horas a maior parte do açúcar havia sido consumida. A própria levedura *S. cerevisiae* passa a sofrer redução no rendimento de etanol quando o etanol externo passa a ser superior a 8% (v/v) ou 63 g/L como descrito por Peres *et al.*, (1998).

A literatura descreve um isolado de *Issatchenkia* sp. Capaz de produzir 42 g/L de etanol a 40°C no meio rico YM (extrato de malte, extrato de levedura e peptona) utilizando glicose como fonte de carbono. No entanto, a produção de etanol por este isolado foi melhorada quando se

passou a usar o processo de batelada alimentada por pulsos através dos quais 35-40% de glicose foram adicionadas ao reator elevando a produção de etanol para 77 g/L após 24 horas de fermentação (WANAPU *et al.*, 2009). No presente trabalho foi utilizada a fermentação em batelada simples, atingindo níveis de etanol maiores que 42 g/L, a utilização de uma fermentação em batelada alimentada sugere que será possível uma melhora no rendimento alcoólico.

Por fim, a levedura *I. orientalis* é encontrada nas fases iniciais da produção de vinhos como sendo uma levedura sensível ao etanol mas este não parece ser o caso, já que a uma temperatura de 42°C, na qual o etanol é bastante tóxico, foi possível obter níveis bastante altos de etanol. Esta levedura deve dispor de mecanismos ainda não conhecidos de defesa quanto à tolerância ao etanol a temperaturas elevadas. Pode-se dizer que a elevação do inóculo para 10 mg/mL em melaço contendo 160 g/L de ART acelerou a fermentação, porém a viabilidade caiu bastante quando o açúcar residual foi menor que 3%.

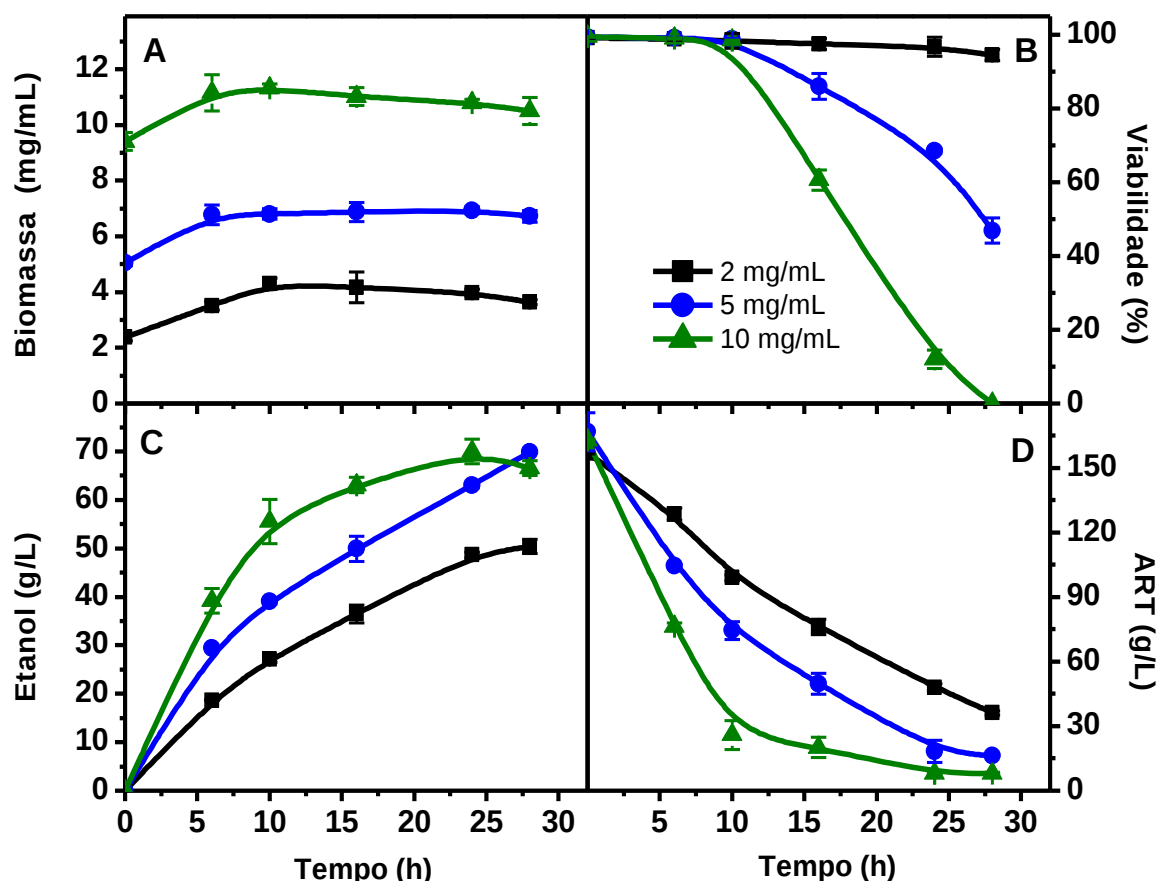


Figura 14. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) utilizando 2 mg/mL (■), 5 mg/mL (●) e 10 mg/mL (▲) da cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (1:3) fermentando melaço 160 g/L ART a 42°C sob agitação de 80 rpm.

4.4.2. Efeito da proporção das leveduras no inóculo misto

Elevou-se a quantia da levedura *S. cerevisiae* no inóculo misto (proporção 1:1, expressa em m/m), porém não foram obtidas diferenças significativas sobre a conversão de açúcar em etanol $Y_{P/S}$ (Tabela 12), enquanto que sua redução pela metade (proporção 1:7, expressa em m/m), não teve igualmente efeito sobre a fermentação. Níveis de etanol na faixa de 60-63 g/L foram atingidos após 15 horas de fermentação com viabilidade celular de 70-76% no final do processo quando as três proporções da cultura mista foram ensaiadas, porém não houve um consumo total dos açúcares (Figura 15D). A Figura 15 ilustra que a concentração de inóculo misto pode ser variada na faixa de 1 parte de *S. cerevisiae* para 1-7 partes de *I. orientalis*, sem efeitos significativos ($\alpha=0,05$) sobre o processo fermentativo

iniciado com 10 mg/mL de inóculo. Estes resultados indicam que a fermentação é predominantemente realizada pelas células de *I. orientalis*.

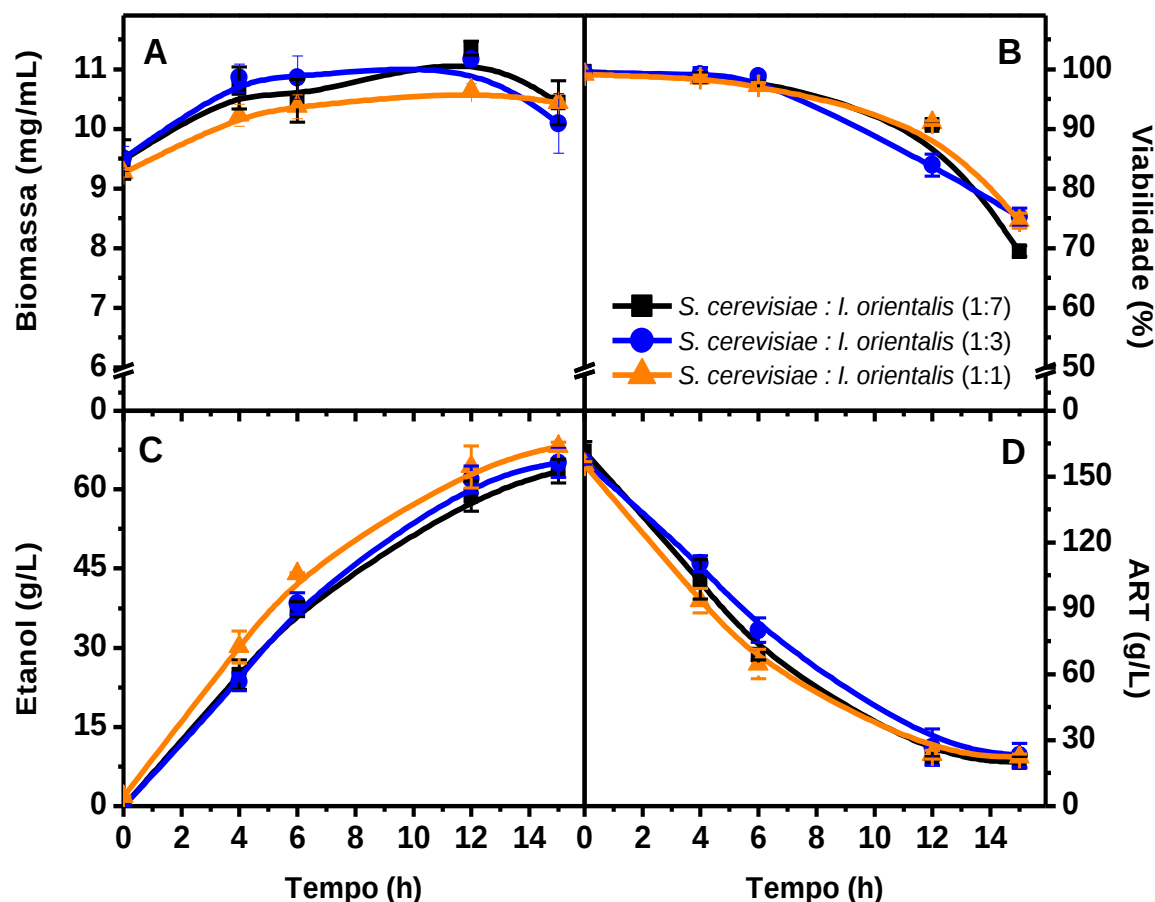


Figura 15. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) obtidas variando a proporção de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* na cultura mista: proporção 1 : 7 (-■-), proporção 1 : 3 (-●-) e proporção 1 : 1 (-▲-) utilizando melaço 150 g/L e incubação sob agitação de 80 rpm a 42°C.

Tabela 12. Comparação estatística da conversão de substrato em produto utilizando diferentes proporções de *I. orientalis* e *S. cerevisiae* no inóculo misto (dados da Figura 15).

Parâmetros do processo	Proporções de <i>S. cerevisiae</i> : <i>I. orientalis</i>		
	(1:3)	(1:7)	(1:1)
$Y_{P/S}$	0,49±0,03 ^a	0,45 ±0,02 ^a	0,51±0,01 ^a
p (Teste T)		p>0,05	p>0,05

Valores indicados pela mesma letra não diferem do experimento controle (proporção 1:3) pelo teste *t* ($\alpha=0,05$); $Y_{P/S}$: fator de conversão de açúcar em etanol.

4.4.3. Efeito da temperatura

A diminuição da temperatura de 42°C para 40°C favoreceu a formação de biomassa (Figura 16A). No entanto, não foram observadas variações na viabilidade celular nem na produção de etanol. Talvez a perda em viabilidade após 12 horas de fermentação tenha sido causada pelo consumo quase total do açúcar do meio e o teor de álcool produzido na ordem de 64 g/L. Como a diminuição da temperatura de fermentação não teve influência sob o processo de produção de etanol, decidiu-se manter a temperatura de 42°C para futuros experimentos. A temperatura ótima de produção de etanol a partir de glicose em meio YPD por uma linhagem de *I. orientalis* foi determinada em um trabalho anterior como sendo de 42°C (GALLARDO *et al.*, 2010).

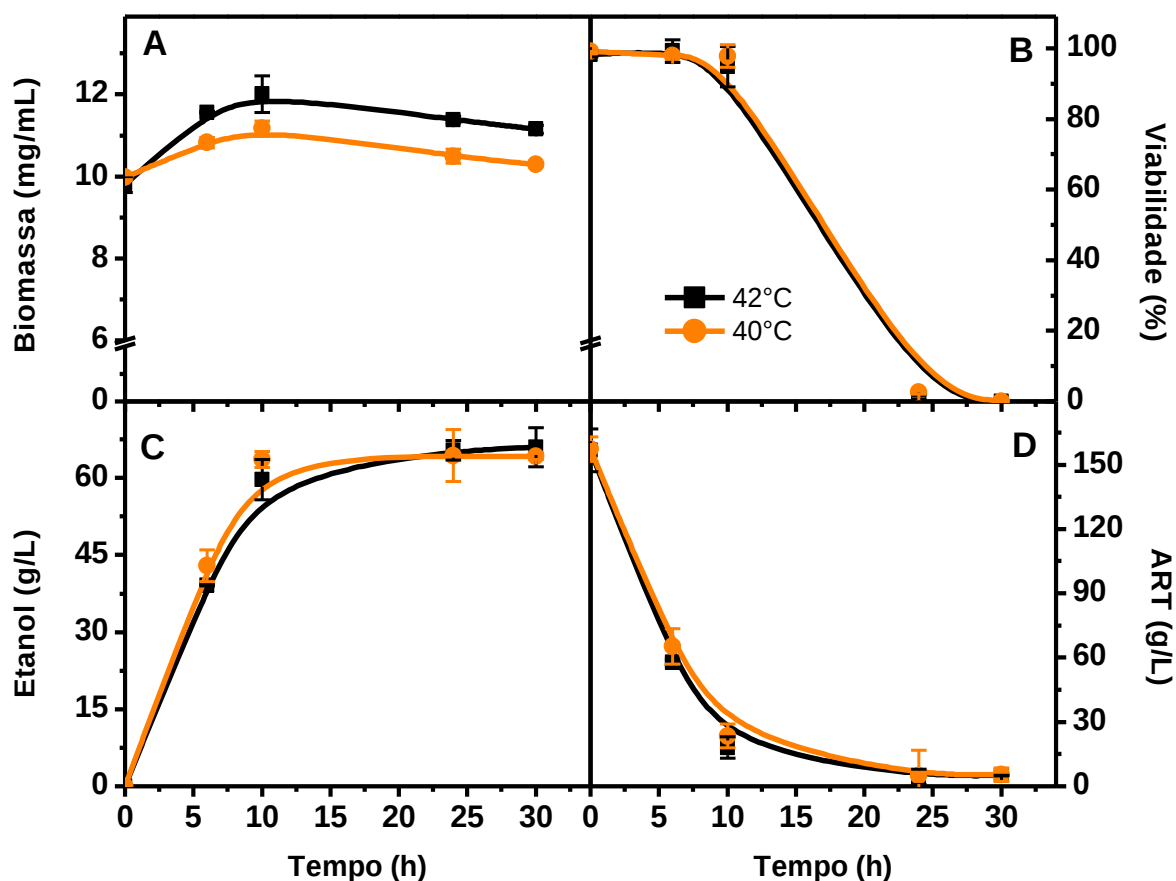


Figura 16. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) a 42°C (-■-) e 40°C (-●-) utilizando melaço 150 g/L ART e 10 mg/mL do inóculo constituído pela cultura mista de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (proporção 1:3).

4.4.4. Efeito do ART do melaço

A Figura 17 ilustra os efeitos do ART do melaço sobre a fermentação em cultura mista constituída pela linhagem IQAr/45-1 e a linhagem 195B de *I. orientalis* (proporção 1:3, expressa em m/m). A maior quantidade de etanol (73,4 g/L) foi produzida com 220 g/L de ART, no entanto o açúcar residual deixado no meio após 12-15h de fermentação foi muito alto (80 g/L de ART). Na verdade, uma quantidade elevada de açúcar residual passou a ser deixada no meio, quando a concentração inicial de açúcar no melaço se elevou acima de 190 g/L de ART. A fermentação rápida utilizando 10 mg/mL de inóculo inicial levou a perdas em viabilidade que não foram observadas na Figura 12B onde os experimentos foram realizados com inóculo de baixa densidade de células. Souza *et al.* (2007) estudaram o efeito da concentração de açúcar no meio, assim concentrações maiores que 15% de glicose levam a perdas na viabilidade celular (viabilidade final de 30-40%) na faixa de temperatura de 37-40°C em um processo em batelada alimentada.

Por outro lado, o fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) não mostrou diferença significativa ($\alpha=0,05$) quando a concentração de açúcar aumentou no meio (Tabela 13), além disto, não foram observadas variações em viabilidade e nem aumento de biomassa em altas concentrações de açúcar.

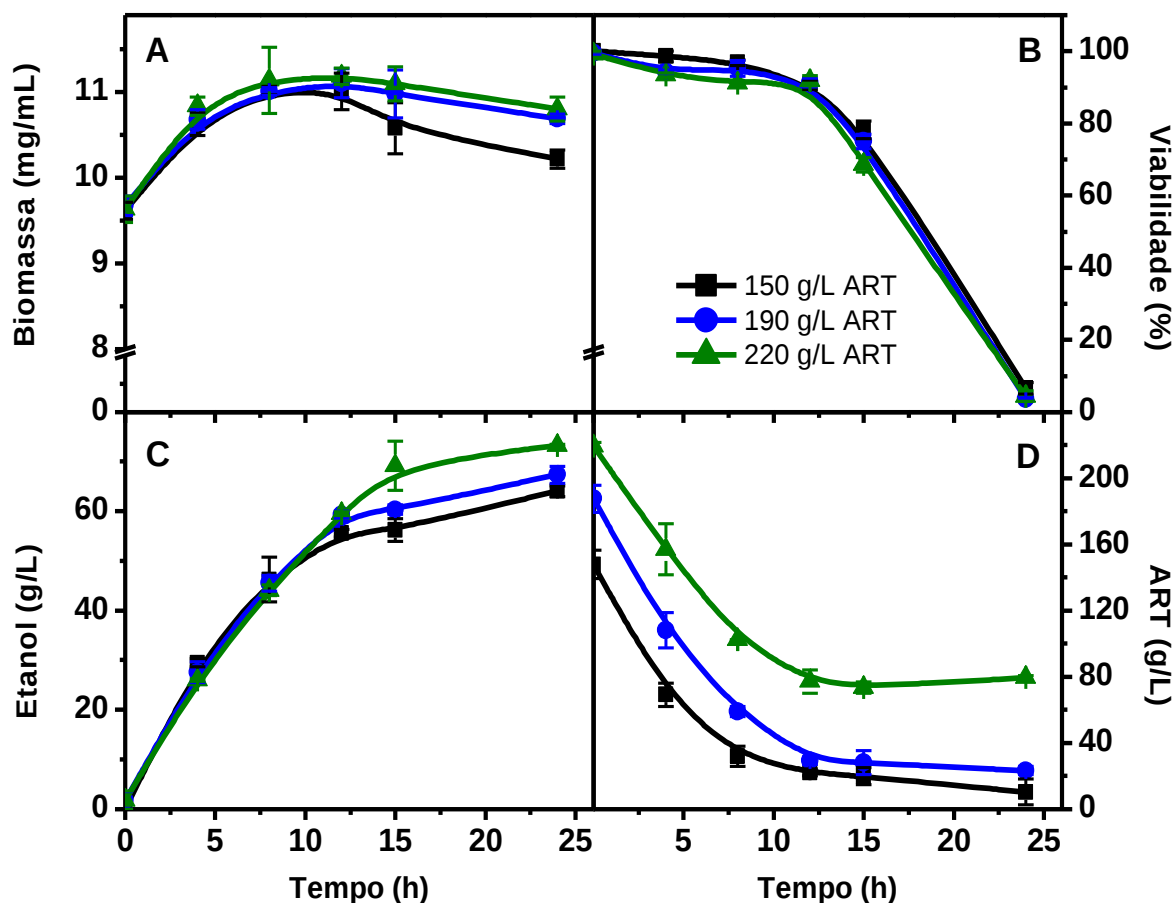


Figura 17. Curvas de tempo de fermentação para a biomassa (A), viabilidade (B), produção de etanol (C) e ART (D) variando o ART do melaço de 150 g/L (-■-), 190 g/L (-●-), 220 g/L (-▲-) em culturas mistas de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (proporção 1:3) a 42°C e agitação de 80 rpm.

Tabela 13. Comparação estatística da conversão de substrato em produto utilizando concentrações crescentes de ART no melaço (dados Figura 17).

Parâmetros cinéticos	Condição de fermentação		
	150 g/L ART	190 g/L ART	220 g/L ART
$Y_{P/S}$	0,44 ±0,04 ^a	0,38±0,03 ^a	0,47±0,04 ^a
p (Teste T)		p>0,05	p>0,05

Valores indicados pela mesma letra não diferem do experimento controle (150 g/L de ART) pelo teste t ($\alpha=0,05$); $Y_{P/S}$: fator de conversão de açúcar em etanol.

4.4.5. Variações na proporção das células das duas leveduras na co-cultura

Após a padronização das condições de fermentação do melaço utilizando co-culturas de *S. cerevisiae* e *I. orientalis*, decidiu-se estudar a variação da proporção destas leveduras inoculadas inicialmente durante a fermentação. Amostras foram retiradas do fermentador a cada duas horas, diluídas e plaqueadas em meio YDP e incubadas a 30°C.

Após um dia de crescimento nas placas de YPD, observou-se uma diferença de morfologia entre as colônias de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* permitindo a determinação da proporção das duas leveduras na cultura mista. Na Figura 18 são ilustradas colônias rugosas com bordas regulares para a linhagem 195B de *I. orientalis* e colônias lisas e menores para a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae*. As colônias rugosas com bordas regulares ou irregulares é uma característica ressaltante das leveduras selvagens como é o caso de *I. orientalis* (WALKER, 1998).



Figura 18. Células de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* após um dia de crescimento em meio YPD a 30°C.

Como mostram a Figura 18 e a Tabela 14, o inóculo inicial de 10 mg/L da cultura mista contém aproximadamente $9,609 \times 10^7$ cel/mL de *S. cerevisiae* e $5,950 \times 10^8$ cel/mL de *I. orientalis* (proporção 1:5, expressa em

N°cel/mL). Observa-se na Figura 18 que em 6 h de fermentação ocorreu uma diminuição do número total de células por mL, talvez devido à adaptação das células tanto de *I. orientalis* quanto de *S. cerevisiae* ao meio. Após 10 h de fermentação, quando a produção de etanol é máxima, o número de células totais voltou a aumentar mantendo a proporção inicial de 1: 5 até as 12 h (Tabela 14).

Tabela 14. Variação do N° células/mL de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* e da proporção das duas leveduras na cultura mista após 12 h de fermentação.

Tempo	N°células/mL		Proporção <i>S. cerevisiae</i> : <i>I. orientalis</i>
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>I. orientalis</i>	
0	$8,50 \times 10^7 \pm 1,00 \times 10^7$	$4,25 \times 10^8 \pm 1,00 \times 10^7$	1 : 5,0
6	$7,95 \times 10^7 \pm 5,68 \times 10^6$	$3,01 \times 10^8 \pm 3,41 \times 10^7$	1 : 3,8
10	$5,75 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^7$	$3,55 \times 10^8 \pm 3,00 \times 10^7$	1 : 6,2
12	$7,02 \times 10^7 \pm 1,97 \times 10^7$	$3,76 \times 10^8 \pm 2,81 \times 10^7$	1 : 5,4

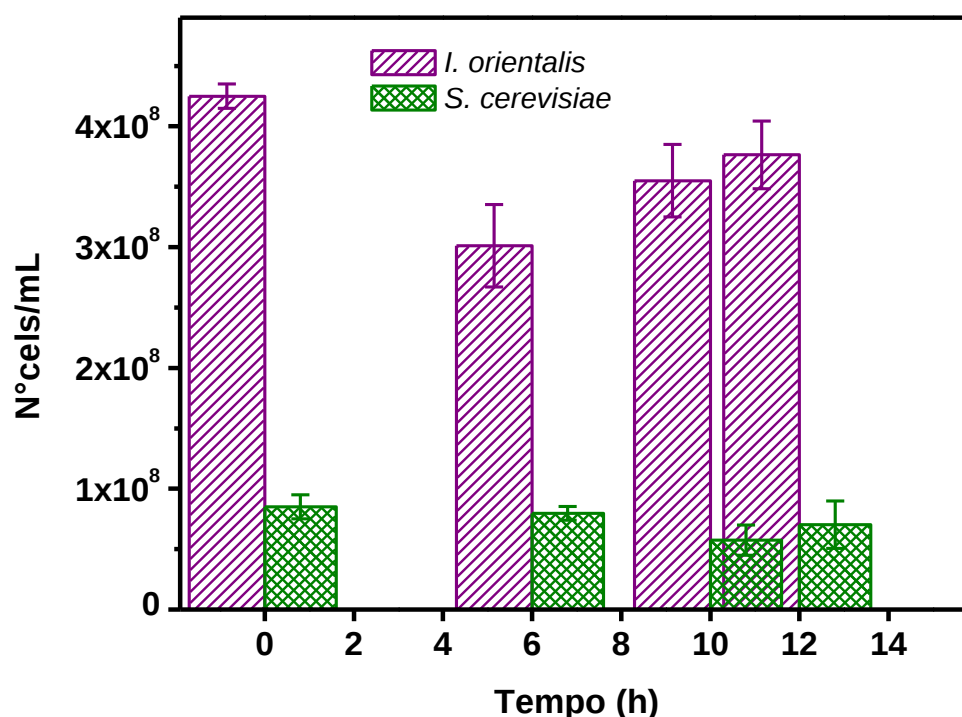


Figura 19. Variações na proporção de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* na co-cultura no decorrer da fermentação de melaço a 42°C.

4.5. Ensaio de fermentação em bateladas simples utilizando inóculos mistos das leveduras *I. orientalis* (linhagem 195B) e outras leveduras não-*Saccharomyces* com características de termotolerância

Outras leveduras também tolerantes ao etanol e temperatura poderiam minimizar as perdas em viabilidade. Assim, decidiu-se trocar a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* pela linhagem CBS 7045 de *Saccharomyces bayanus* e pela linhagem CBS 712 de *Kluyveromyces marxianus*. Um isolado de *K. marxianus* foi capaz de produzir etanol na faixa de 7,6-9,1% (v/v) utilizando melaço de cana-de-açúcar a temperaturas variando de 30-40°C (SINGH *et al.*, 1998). Outras linhagens de *K. marxianus* mostraram-se capazes de crescer a temperaturas tão altas quanto 52°C e produzir etanol na faixa de 6,3-6,9% (v/v) a 45°C a partir de 14% (m/v) de glicose (BANAT *et al.*, 1992). A levedura *S. bayanus* também é uma levedura que resiste elevações de temperatura. A Figura 20 permite comparar as fermentações mistas de *I. orientalis* com outras leveduras não-*Saccharomyces*. Observou-se que a co-cultura de *I. orientalis* com *K. marxianus* perdeu menos viabilidade, mas produziu menos etanol em 12 horas de fermentação a 42°C. O teor de etanol produzido pelas duas leveduras foi menor (40-45 g/L) comparado com o etanol produzido pela cultura mista de *I. orientalis* e *S. cerevisiae*. A levedura *S. bayanus* substituiu satisfatoriamente a levedura IQAr/45-1, porém o mesmo não foi obtido com o uso da levedura *K. marxianus*. Na verdade, não houve nenhum ganho com a troca da levedura IQAr/45-1 com a levedura *S. bayanus*. Com relação à troca da levedura IQAr/45-1 pela levedura *K. marxianus*, obteve-se uma alta viabilidade em 24 horas de fermentação com consumo quase total de açúcares tornando a fermentação bem mais lenta. Assim, parece não haver vantagens em se tocar a levedura *S. cerevisiae* por outras leveduras termotolerantes.

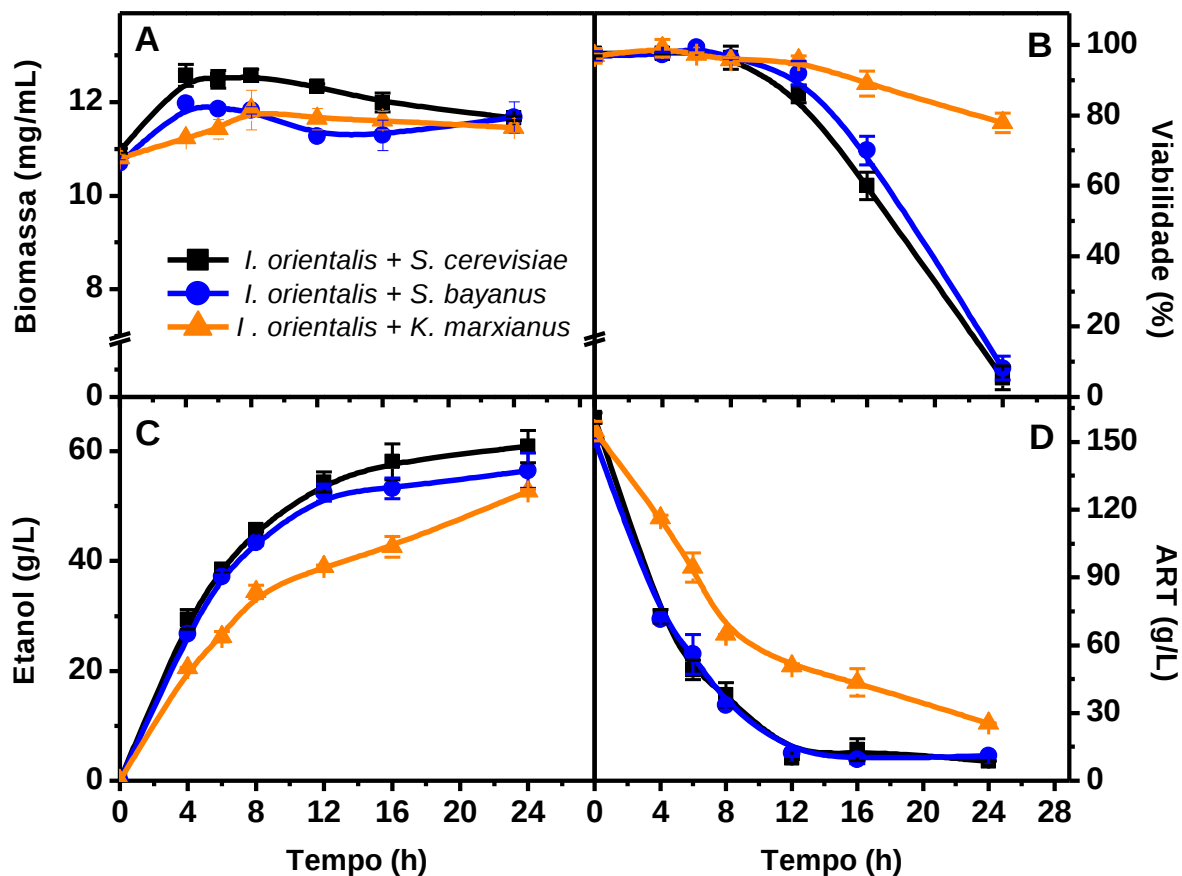


Figura 20. Comparação entre culturas mistas das leveduras *S. cerevisiae* + *I. orientalis* (-■-), *S. bayanus* + *I. orientalis* (-●-) e *K. marxianus* + *I. orientalis* (-▲-) fermentando melaço (150 g/L ART) a 42°C, inóculo de 10 mg/mL e sob agitação de 80 rpm.

Conclusões

Os 70 isolados de *I. orientalis*, identificados no nosso laboratório num trabalho anterior, foram avaliados qualitativamente mostrando diferentes características quanto a sua capacidade de assimilação e fermentação de distintas fontes de carbono a 40°C.

Uma linhagem de *I. orientalis* (isolado 195B) foi capaz de assimilar melaço não hidrolisado, melaço hidrolisado, sacarose, frutose e glicerol a 40°C e de fermentar melaço não hidrolisado e sacarose a 40°C. Além disto, este isolado foi capaz de produzir etanol em meio YPD a pH 2,5 e 40°C com pouca perda de viabilidade.

Um sinergismo entre a linhagem 195B da levedura *I. orientalis* e a linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* foi estabelecido durante a fermentação de melaço de cana-de-açúcar a 42°C com redução nas perdas de viabilidade total.

A linhagem IQAr/45-1 de *S. cerevisiae* foi trocada por outras leveduras termotolerantes quando em co-cultura com a linhagem 195B de *I. orientalis*, porem não houve benefícios quanto a produção de etanol e viabilidade celular.

O processo de fermentação estabelecido permitiu a produção de 67 g/L de etanol (8,5%, v/v) após 12 horas de fermentação nas seguintes condições e em uma única batelada simples: melaço 16% (ART), proporção inicial de 1 parte de *S. cerevisiae* : 3 partes de *I. orientalis* num inóculo misto de 10mg/mL, proporção volume de meio e volume de frasco de 1 : 1,8, temperatura 42°C e 80 rpm.

Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho indicam que é possível fermentar melaço de cana-de-açúcar (etanol de 1º geração) a elevadas temperaturas com redução nas perdas de viabilidade celular. Parece ser possível desenvolver um processo para a produção de etanol a partir de hidrolisados ácidos (etanol de 2º geração) provenientes de materiais celulósicos utilizando a linhagem 195 B de *I. orientalis*.

Referências

Referências

- ABDEL-BANAT, B. M. A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, p. 861-867, 2010.
- AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Occurrence of function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 30-39, 2006.
- ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; GUILLOUET, S. E.; MOLINA-JOUE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. **Bioproc. Biosystems. Eng.**, v. 26, p. 217-222, 2004.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors and lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, p. 340-349, 2007.
- ALMEIDA, M. J.; PAIS, C. S. Characterization of yeast population from traditional corn and rye bread doughs. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, n. 3, p. 154-158, 1996.
- ANDERSON, P. J.; McNEIL, K.; WATSON, K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1314-1320, 1986.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Appl. Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p. 259-263, 1992.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL E CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/arquivos/bioetanol_port.pdf?idProduto=4809>. Acesso em: 10 ago. 2009.

BARNETT, J. A. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. **Microbiol.**, v. 149, p. 557-567, 2003.

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

BERTOLINI, M. C.; ERNANDES, J. R.; LALUCE, C. New yeast for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. **Biotechnol. Lett.**, v. 13, n. 3, p. 197-201, 1991.

BOIDIN, J.; PIGNAL, M. C.; BESSON, M. Le genre *Pichia sensu lato* (quatrieme contribution). **Bull. Soc. Mycol. France**, v. 81, p. 566-606, 1965.

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

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

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

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

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁSQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VOCO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six variety of grape must. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 21, p. 149-155, 2004.

D'AMORE, T.; CELOTTO, G.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 11, p. 411-416, 1989.

DORTA, C.; OLIVA NETO, P.; ABREU NETO, M. S. de; NICOLAU JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 177-182, 2006.

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

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F.; ROBLES, A. C. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Latinoamericana de Microbiología**, v. 46, n. 1, p. 24-46, 2004.

GALLARDO, J. C. M.; SOUZA, C. S.; CICARELLI, R. B.; OLIVEIRA, K. F.; MORAIS, M. R.; LALUCE, C. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 2010. In press.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnol. Biofuels**, v. 1, p. 1-6, 2008.

GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; MARINI, M. M.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 2438-2447, 2007.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

HALM, M.; TORNBACK, T.; ANENBOERG, N.; SEFA-DEDEH, S.; JESPERSEN, L. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida Kruzei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 97-103, 2004.

HISAMATSU, M.; FURUBAYASHI, I.; KARITA, S.; MISHIMA, T.; ISONO, N. Isolation and identification of novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions. **J. Appl. Glycosci.**, v. 53, p. 111-113, 2006.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 100, p. 260-265, 2005.

JEON, B. Y.; KIM, S. J.; KIM, D. H.; NA, B. K.; PARK, D. H.; TRAN, H. T.; ZHANG, R.; AHN, D. H. Development of a serial bioreactor system for direct ethanol production from starch using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioproc. Eng.**, v. 12, p. 586-576, 2007.

JESPERSEN, L.; HALM, M.; KPODO, M.; JABOBSEN, M. Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for kenkey production. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 24, p. 239-248, 1994.

KIM, D-H.; HONG, Y-A. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, n. 9, p. 1633-1638, 2008.

KIM, J.; ALIZADEH, P.; HARDING, T.; HEFNER-GRAVINK, A.; KLIONSKY, D. J. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1563-1569, 1996.

KLINKE, H. B.; HOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66, p. 10-26, 2004.

KUDRIAVZEV, V. I. **Die systematik der hefen**. Berlin: Akademie-Verlag, 1960.

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

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

LACHANCE, M. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie van Leeuwenhoeck**, v. 68, n. 2, p. 151-160, 1995.

LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics new selected strains of *Sccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnol. Bioen.**, v. 37, p. 528-536, 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.**, v. 29, p. 140-145, 2002.

LEE, J-H.; LIM, Y-B.; KOH, J-H.; BAIG, S-Y.; SHIN, H-T. Screening of thermotolerant yeast for use as microbial feed additive. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.12, p. 162-165, 2002.

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

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

LIMTONG, S.; SINTARA, S.; SUWANNARIT, P.; LOTONG, N. Yeast diversity in thai traditional fermentation stater (Loog-pang). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 36, p. 149-158, 2002.

LOPITZ-OTSOA, F.; RMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 23, p. 67-74, 2006.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. **Food Microbiol.**, v. 19, p. 597-604, 2002.

LIU, Y. P.; ZHENG, P.; SUN, Z. H.; NI, Y.; DONG, J. J.; ZHU, L. L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 1736-1742, 2008.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 104, n. 3, p. 419-443, 2009.

MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIG, B.; MAHMOD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. A. G. Identification and quantification of 5-hydroxymethyl furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. **Pak. J. Nutr.**, v. 8, p. 1391-1396, 2009.

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

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

OMEMU, A. M.; OYEWOLE, O. B.; BANKOLE, M. O. Significance of yeasts in the fermentation of maize for ogi production. **Food Microbiol.**, v. 24, n. 6, p. 571-576, 2007.

PALMIERI, M. C.; GREENHALF, W.; LALUCE, C. Efficient flotation of yeast cells grown in batch culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 50, p. 248-256, 1996.

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

PERES, M. F. S.; LALUCE, C. Ethanol tolerance of thermotolerant yeast cultivated on mixtures of sucrose and ethanol. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 85, n. 4, p. 388-397, 1998.

PERES, M. F. S.; SOUSA, S. R.; LALUCE, C. Obtaining strains of *Saccharomyces* tolerant to high temperatures and ethanol. **Methods Biotechnol.**, v. 14, p. 258-266, 2001.

ROSILLO-CALLE, F.; WALTER, A. Global market for bioethanol: historical trends and future prospects. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, p. 20-32, 2006.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

SEO, S. H.; RHEE, C. H.; PARK, H. D. Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. **J. Microbiol.**, v. 45, p. 521-527, 2007.

SHIN, H. T.; LIM, Y. B.; KOH, J. H.; KIM, J. Y.; BAIG, S. Y.; LEE, J. H. Growth of *Issatchenkia orientalis* in aerobic batch and fed-batch cultures. **J. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 82-85, 2002.

SINGH, D.; BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Industrial scale ethanol production using thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. **Biotechnol. Lett.**, v. 20, n. 8, p. 753-755, 1998.

SONGSTAD, D. D.; LAKSHMANAN, P.; CHEN, J.; GIBBONS, W.; HUGHES, S.; NELSON, R. Historical perspective of biofuels: learning from the past to rediscover the future. **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant**, v. 45, p. 189-192, 2009.

SOUZA, C. S. **Competição entre leveduras selvagens e *Saccharomyces cerevisiae* em processo de produção de etanol a temperaturas elevadas**. 2004.154 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I. M.; RAO, L. V. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresour. Technol.**, v. 72, p. 43-46, 2000.

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

THALAGALA, T. A. T. P.; KODAMA, S.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; FURUJYO, A.; KAWASAKI, Y.; MAKOTO, H. Study on ethanol fermentation using D-Glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121. **J. Appl. Glycosci.**, v. 56, p. 7-11, 2009.

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. Biotech.**, v. 21, n. 4, p. 247-253, 1998.

TORIJA, M. J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, p. 47- 53, 2003.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Estatística para a produção de etanol no Brasil**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/opiniao/show.asp?msgCode={D17F228B-0FAA-4536-B0A8-C0EE447E8398}>>. Acesso em: 30 maio 2010.

VAN DER AA KÜLHE, A.; JESPERSEN, L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 43, p. 205-213, 1998.

VISSER, W.; SCHEFFERS, W. A.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H.; VAN DIJKEN, J. P. Oxygen requirements of yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 12, p. 3785-3792, 1990.

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

WANAPU, C.; SRIPROMRAK, A.; MUAENJANG, T. Ethanol production by thermotolerant *Issatchenkia* spp. S1. In: EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 14th, 2009, Barcelona. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B8JG4-4X0HHNB-MF&_user=972052&_coverDate=09%2F30%2F2009>. Acesso em: 19 fev. 2010

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

WATSON, K. Temperature relations. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts**. 2nd ed. London: Academic Press, 1987. v. 2, cap. 3, p. 41-66.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 482-487, 1999.

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

ZHANG, H-R.; QIN, X-X.; SILVA, S. S.; SARROUH, B. F.; CAI, A-H.; ZHOU, Y-H.; KE, J.; QIU, X. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 152, n. 2, p. 199-212, 2008.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. mechanisms of yeast tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **J. Biotechnol.**, v. 144, p. 23-30, 2009.

Apêndice

Apêndice I. Curvas de Calibração para a linhagem IQAr/45-1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

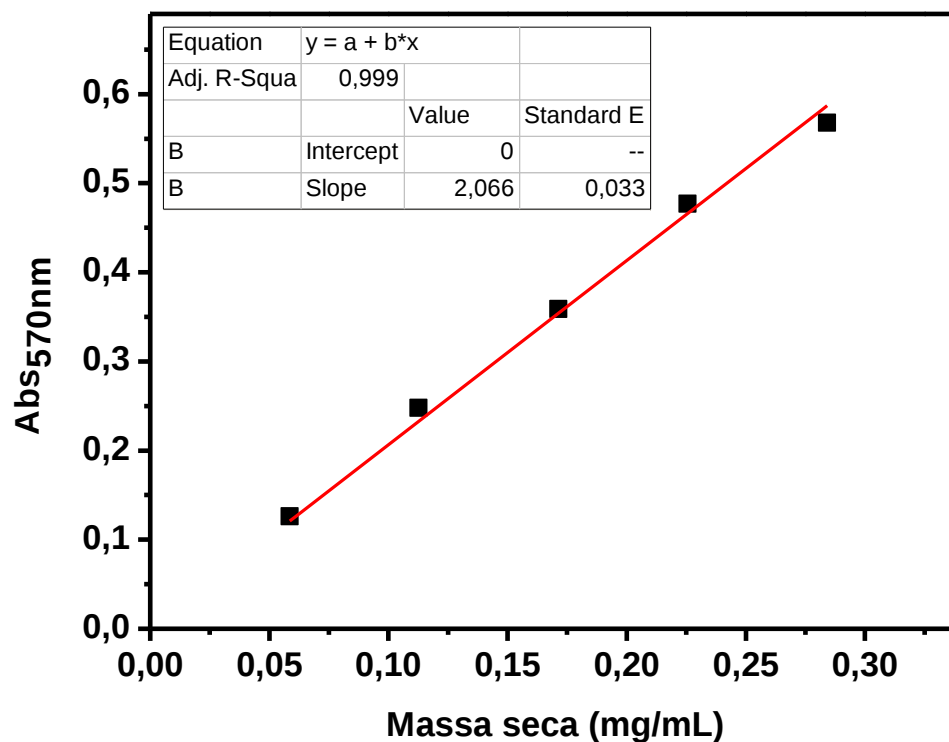


Figura 21. Curva de calibração para análise de biomassa da linhagem IQAr/45-1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=2,066$, fator de correlação $R^2=0,999$ e fator de conversão de absorbância em biomassa seca $f=0,48$ para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

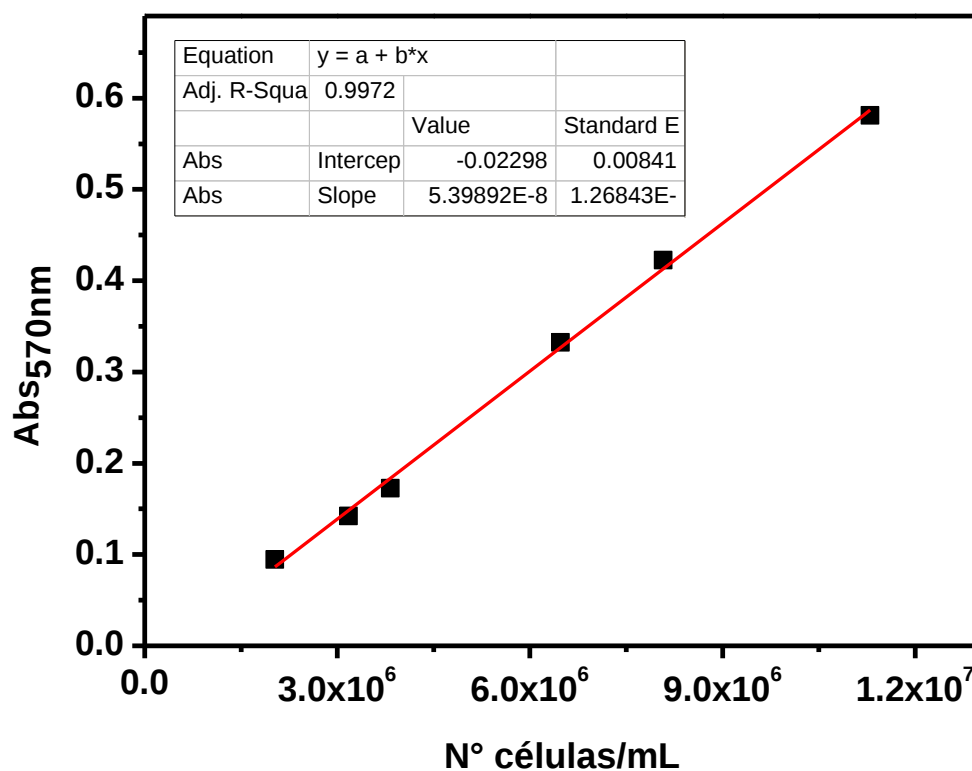


Figura 22. Curva de calibração para determinação do número de células por mL da linhagem IQAr/45-1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=5,399 \times 10^{-8}$, intercepto da reta $a=-0,023$ e fator de correlação $R^2=0,997$ para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

Apêndice II. Curvas de Calibração para a linhagem 195B de *Issatchenkia orientalis*.

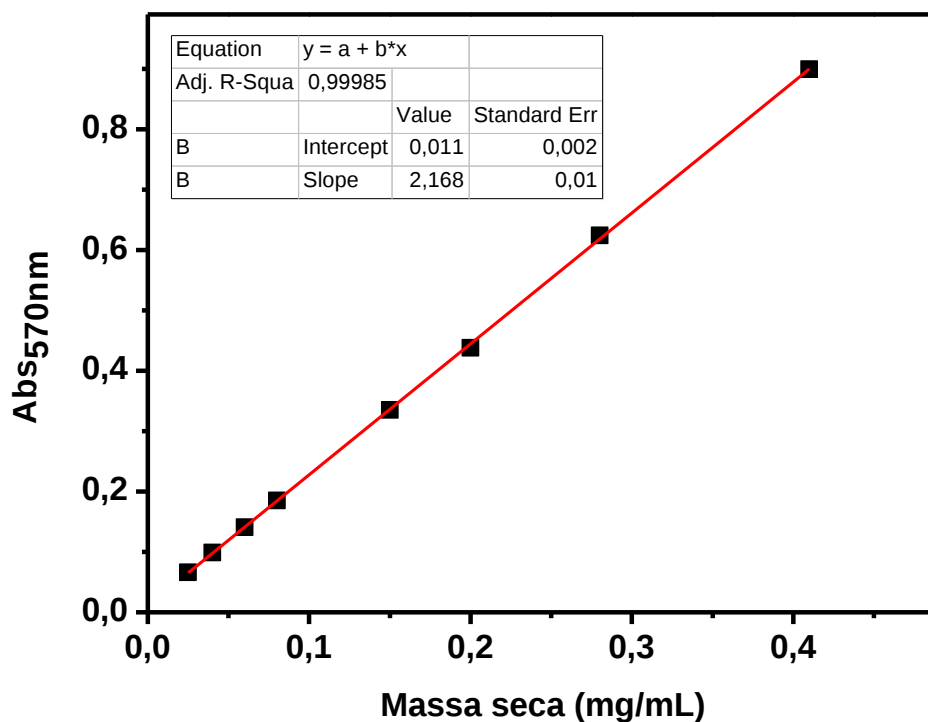


Figura 23. Curva de calibração para análise de biomassa da linhagem 195B da levedura *Issatchenkia orientalis*. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=2,168$, fator de correlação $R^2=0,999$ e fator de conversão de absorvância em biomassa seca $f=0,45$ para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

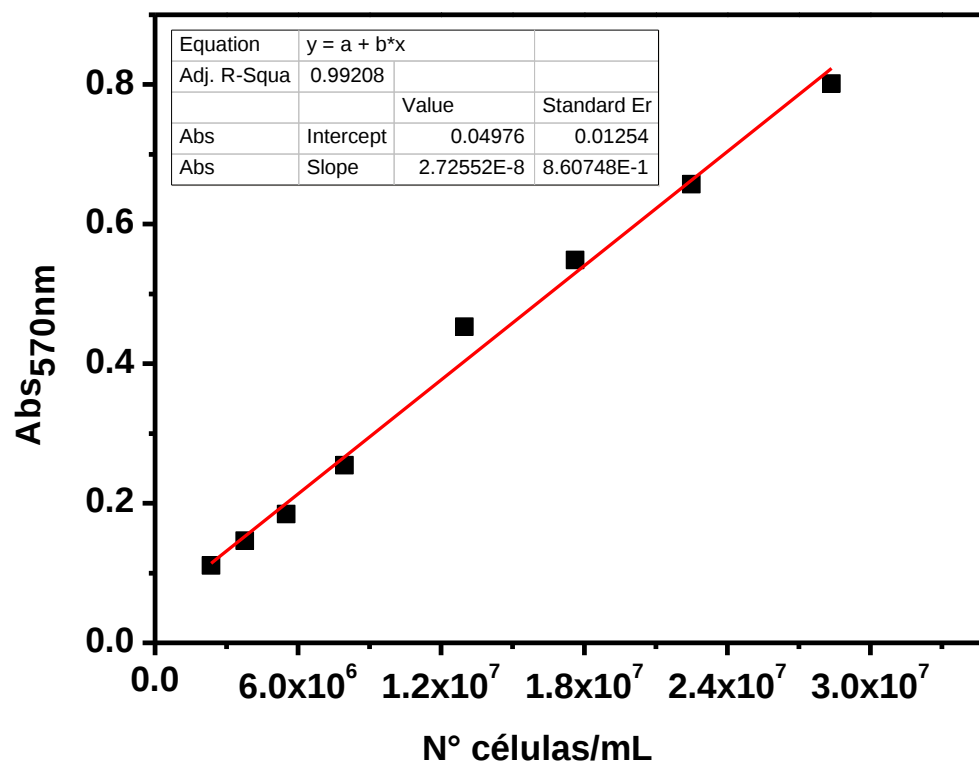


Figura 24. Curva de calibração para determinação do número de células por mL da linhagem 195B da levedura *Issatchenkia orientalis*. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=2,726 \times 10^{-8}$, intercepto da reta $a=0,049$ e fator de correlação $R^2=0,992$ para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

Apêndice III. Curvas de Calibração para dosagem de açúcares.

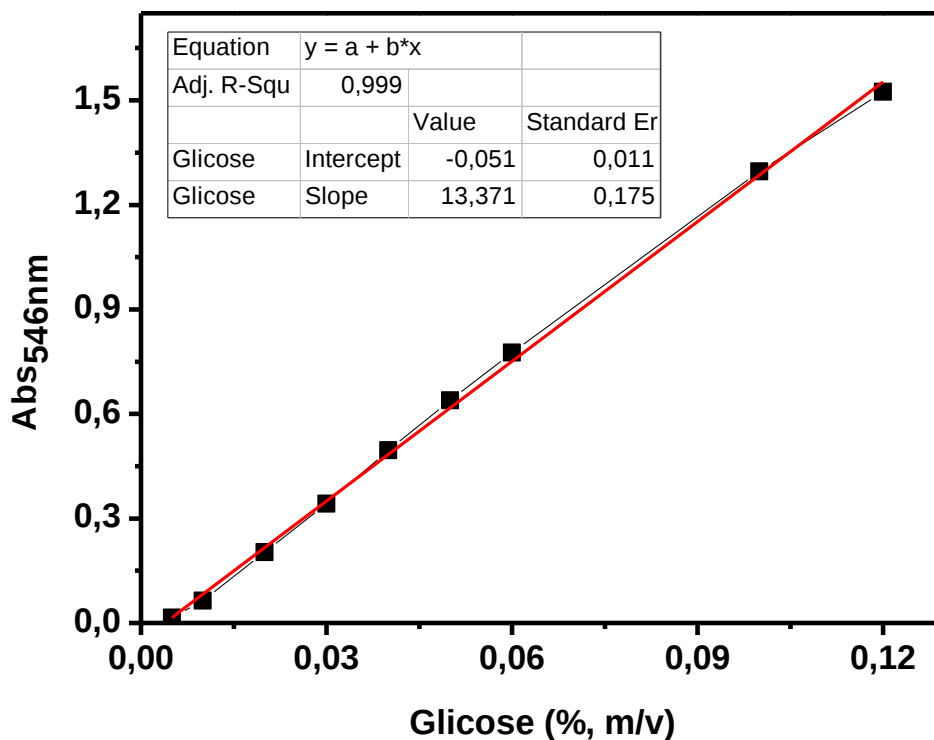


Figura 25. Curva padrão de calibração de glicose 0,2% (m/v) para dosagens de açúcares redutores totais pelo método DNS (MILLER, 1959). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=13,37$, intercepto da reta $a=-0,051$ e fator de correlação ($R^2=0,999$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.