

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

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

BRUNA ZAVATI ZAVITOSKI

Dissertação de mestrado
2016



Instituto de Química

BRUNA ZAVATI ZAVITOSKI

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

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

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

ARARAQUARA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

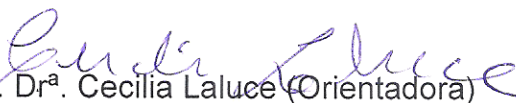
1. Fermentação. 2. Melaço. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Microrganismos. 5. Etanol. I. Título.

BRUNA ZAVATI ZAVITOSKI

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

Araraquara, 22 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA


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


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


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

DADOS CURRICULARES

Nome: Bruna Zavati Zavitoski

Nome em citações bibliográficas: ZAVITOSKI, B. Z.

Nacionalidade: Brasileira

Sexo: Feminino

Nascimento: 20/08/1993 – Araraquara – SP

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

Instituto de Química, Dpto. de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisto Degni nº 55

Quitandinha – Araraquara

14800-900, SP – Brasil

Endereço eletrônico: brunazzavitoski@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 – atual Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química – UNESP

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

Orientadora: Cecilia Lalluce

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

2011 – 2013 Graduação em Biocombustíveis.

Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil.

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

Orientador: Jean Carlos Rodrigues da Silva

Formação complementar

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

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

Atuação profissional

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

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

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

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

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

Áreas de atuação

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

Idiomas

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

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

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

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

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

Resumo publicado em anais de eventos

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

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

Participação em eventos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

A banca examinadora pelas contribuições para finalização desse trabalho.

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

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

A equipe da biblioteca por toda atenção e ajuda.

A CAPES pela bolsa concedida.

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

MnSO ₄	sulfato de manganês
NaOH	hidróxido de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
C ₄ H ₄ K ₂ O ₆ ·4H ₂ O	tartarato de potássio tetrahidratado
HCl	ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
CAT-1	levedura isolada da usina Catanduva
SA-1	levedura isolada da usina Santa Adélia
BG-1	levedura isolada da usina Barra Grande
PE-2	levedura isolada da usina da Pedra

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

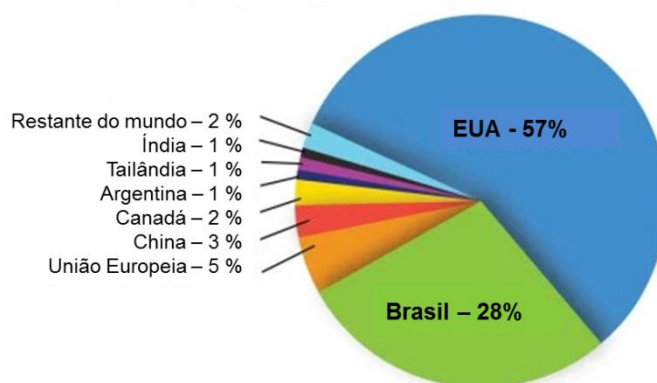
Não há relatos na literatura de um microrganismo que apresente resistência a todos esses principais fatores, por isso é de suma importância a busca por novos microrganismos que possam melhorar o desempenho do processo fermentativo, consequentemente o rendimento nas usinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etanol - cenário mundial

Devido ao aquecimento global, a temperatura mundial vem mudando constantemente, esse fenômeno dá-se a grande queima de combustíveis fósseis, provocado como consequência das atividades humanas (NASA, 2016). Com essas mudanças climáticas a busca por alternativas para substituir os combustíveis derivado do petróleo deve ser uma atividade constante. O etanol é o biocombustível mais produzido no mundo, com uma estimativa de produção para safra de 2016/2017 no Brasil de 30,3 bilhões de litros. A produção concentra-se na região Sudeste onde 60,5 % do etanol total do país é produzidos, ficando o Centro-Oeste responsável por 27,8 %, Nordeste 5,4 %, Sul 5,5 % e Norte 0,8 % (CONAB, 2016). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, estando em primeiro lugar os Estados Unidos que produz 57 % de todo etanol como mostrada na Figura 1.

Figura 1 - Produção mundial de etanol combustível por país



Fonte: Adaptado. RFA, (2016).

Ao longo das últimas décadas os impactos ambientais da produção de etanol têm sido muito reduzidos. Enquanto isso os danos ecológicos causados pela extração do petróleo, refino e queima continua sendo prejudicial ao meio ambiente (RFA, 2016). Fazendo com que etanol apresente um grande potencial na substituição de fontes não renováveis de energia, ajudando a atenuar, assim, as mudanças climáticas.

No Brasil, o Programa Nacional do Álcool foi implementado na década 70, com objetivo de tentar amenizar os efeitos da crise no setor petrolífero, e tornar o país menos dependente energeticamente. O etanol anidro passou a ser adicionado à gasolina. Através de incentivos governamentais, ocorreram investimentos em equipamentos, serviços, novas tecnologias no setor agrícola e industrial (BALAT et al., 2009).

2.2 Matéria-prima

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, entre elas a cana-de-açúcar, sorgo, milho, trigo e os materiais lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, madeira, forragem (AMORIM et al., 2009).

No Brasil, o etanol é produzido a partir do caldo e/ou melaço da cana-de-açúcar, as usinas sucroalcooleiras são as responsáveis por processar a cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool combustível (LALUCE et al., 2016).

Nos Estados Unidos, maior produtor mundial de etanol a matéria-prima utilizada é o milho. Antes da fermentação é preciso liberar as moléculas de amido por cozimento e hidrólise. Fazendo assim com que o processo de produção seja mais complexo, longo e de maior custo, porém a produção do etanol recebe incentivos do governo norte americano, tornando a produção desse biocombustível viável, bem como a valorização dos subprodutos gerados na produção do etanol a partir de milho (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas sendo estruturalmente dividida em ponta, folhas, colmo e sistema radicular. Nos colmos está armazenada a maior parte da sacarose. A composição da cana-de-açúcar varia de acordo com a variedade de cana, clima, solo, disponibilidade de água, entre outros aspectos. Sua composição é essencialmente uma mistura de caldo e fibra, sendo o caldo uma solução aquosa de açúcares e outras substâncias orgânicas e inorgânicas (PIPPO et al., 2011).

Após a colheita e limpeza, a cana-de-açúcar passa por várias operações para produção de etanol. O caldo pode ser extraído por moendas ou difusores, e depois

passa por tratamento térmico para a concentração do caldo, e possa ser adicionado nas dornas de fermentação.

O melaço de cana-de-açúcar é um dos subprodutos da fabricação do açúcar, substrato rico em açúcares fermentescíveis e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um ótimo substrato para fermentação alcoólica (DELGADO, 1975).

2.3 Produção de etanol

O etanol é uma substância orgânica não é encontrada em sua forma livre sendo produzida a partir do processo de fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído. O processo mais utilizado para produção de etanol no Brasil é a fermentação de açúcares, que utiliza a cana-de-açúcar como principal matéria-prima. Mas pode também ser produzido a partir de cereais como milho (amido), tubérculos como beterraba e mandioca (amido) e por material lignocelulósicos como resíduos agrícolas (BASSO et al, 2011).

A fermentação alcoólica que dá origem ao etanol combustível é um processo consolidado e constituído por três tipos de fermentações nas usinas: batelada simples, batelada alimentada e processo contínuo.

2.3.1 Processo em Batelada Simples

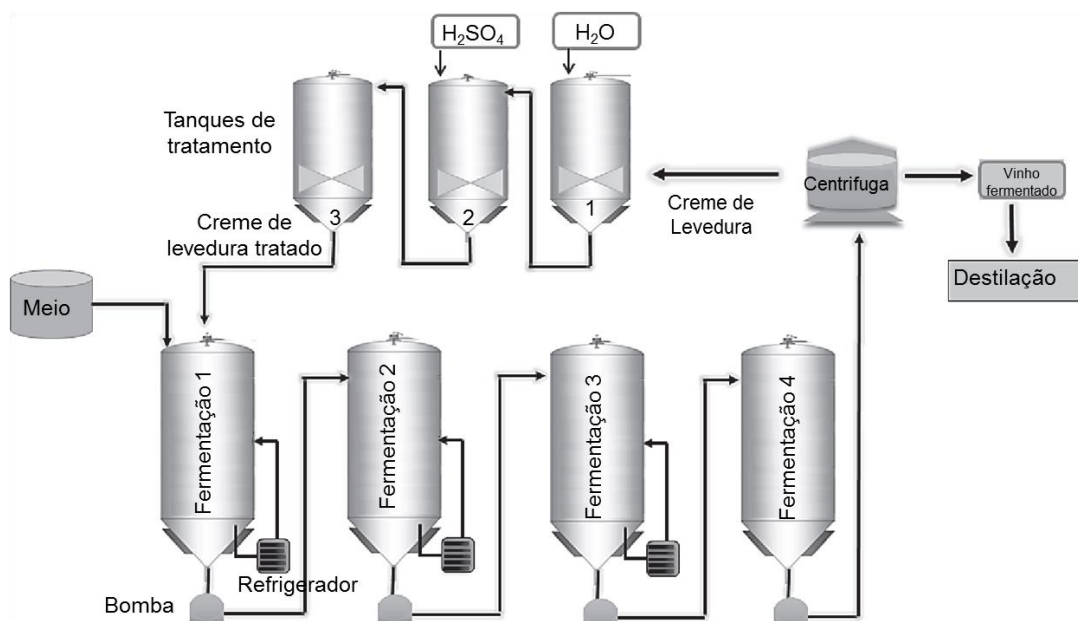
O processo de batelada simples é um sistema onde o meio de cultura esterilizado é enviado para a dorna e os microrganismos são adicionados, permitindo assim que a fermentação ocorra sob condições ótimas. Durante o tempo de fermentação nada entre e nada sai dos tanques, ou seja, o sistema encontra-se em estado estacionário. Ao fim da fermentação, o meio fermentado segue para a etapa de destilação, onde ocorre a recuperação do produto de interesse (ZARPELON, 1992).

A principal característica desse processo é que o volume do meio no reator permanece sempre constante, e a composição do meio está sempre mudando devido ao metabolismo celular, em ambiente tóxico. Em escala de laboratório esse sistema é utilizado para estudos de fermentação.

2.3.2 Processo contínuo

No processo contínuo de produção, um sistema de quatro biorreatores ligados em série é utilizado, como mostrado na Figura 2, onde o substrato e inóculo são adicionados simultaneamente de maneira contínua e controlada, com reuso de células (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; LALUCE et al. 2016).

Figura 2 - Processo contínuo de fermentação



Fonte: Adaptado. LALUCE et al. (2016).

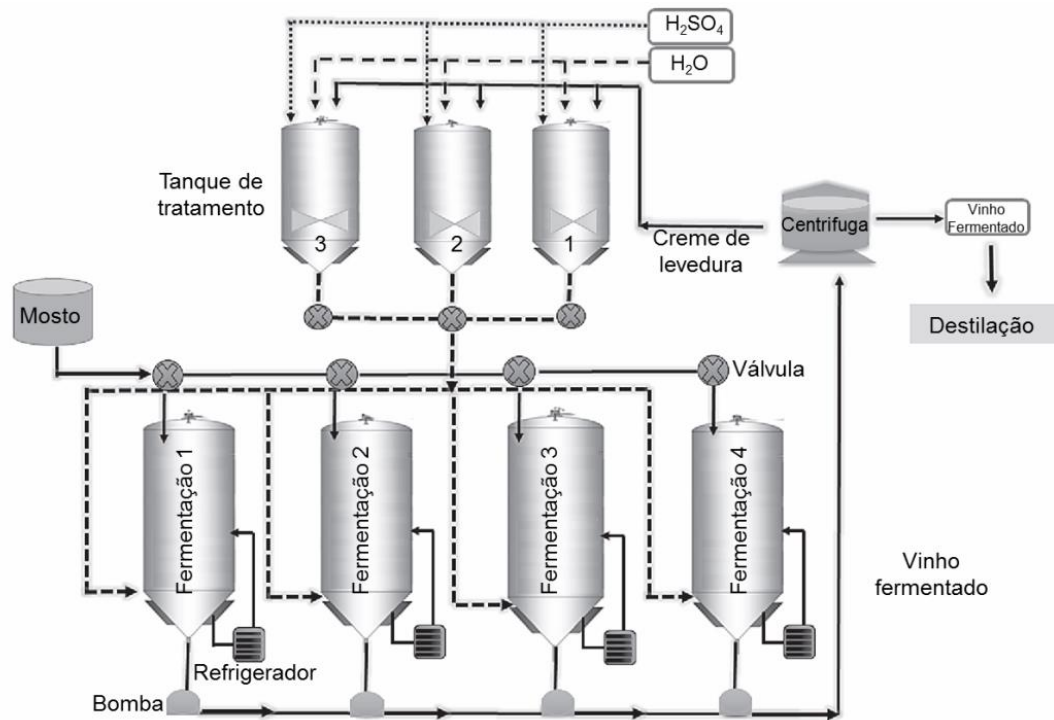
2.3.3 Processo de batelada alimentada

O processo de batelada alimentada ou *Melle-Boinot* é utilizado por cerca de 75 % das destilarias brasileiras (BASSO et al., 2011). Esse tipo de processo ajuda a minimizar os efeitos de pressão osmótica do meio, e a formação de produtos tóxicos do metabolismo.

O inóculo contendo cerca de 30 % de células (v/v) é adicionado ao tanque de fermentação até que o volume final seja atingido. O tempo total de enchimento é de cerca de 5h em cada batelada, dependendo do tamanho da dorna (LALUCE et al., 2016). O fim da fermentação alcoólica é determinado quando a concentração de açúcar na dorna deixa de variar após um intervalo de uma hora. No fim da fermentação as dornas são esvaziadas, e o vinho contendo levedura é neutralizado

e encaminhado para centrífuga, onde ocorre a separação do fermento. A biomassa é enviada para a unidade de tratamento, e o vinho encaminhado para destilação como mostrado na Figura 3 (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; LALUCE et al. 2016).

Figura 3 - Processo de batelada alimentada



Fonte: Adaptado LALUCE et al. (2016).

2.3.4 Condições gerais de fermentação

Nas destilarias brasileiras, o caldo da cana-de-açúcar e o melaço de cana-de-açúcar (subproduto da produção do açúcar), são utilizados como substrato no processo fermentativo, que ocorre com alta densidade celular (8 - 17 %) e tempo variam de 6 a 10 horas, com reuso das células, até três vezes por dia, durante cerca de 200 dias. A concentração de açúcares redutores totais (ART) do mosto pode variar entre 18 – 22 % e temperatura variando entre 32 - 35 °C podendo chegar a 40 °C, especialmente no verão. Contaminações por bactéria podem ocorrer. Para combater esses contaminantes, antibióticos são adicionados ao processo. A concentração de bactérias é considerada prejudicial quando está presente em uma

quantidade maior que 10^8 cel/mL (OLIVA-NETO; YOKOKA, 1994; AMORIM et al., 2011).

Ao final da fermentação as células são coletadas por centrifugação e tratadas com ácido sulfúrico (pH 1,8 - 2,5) em agitação por um período de 1 - 3 horas com objetivo de reduzir a contaminação por bactérias. Ao fim do tratamento as células são re-inoculadas para início a um novo ciclo fermentativo (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994). O mosto fermentado passa pelo processo de destilação que dá origem ao etanol e a vinhaça. Para cada litro de etanol produzido, 10 – 15 litros de vinhaça são gerados. Parte da vinhaça gerada é utilizada para fertirrigação em plantações de cana-de-açúcar, por conter potássio, sódio, cálcio, magnésio, outros micronutrientes e matéria orgânica (BASSO et al., 2011).

2.4 Leveduras

As leveduras pertencem ao grupo dos ascomicetos, também denominado de fungos superiores. São eucariotos, unicelulares com um diâmetro de 2 a 15 μ m, possuem parede celular e estrutura rígida constituída por glicana, quitina e mananas que auxiliam na proteção da célula. As células apresentam um alto grau de organização celular que inclui núcleo celular, mitocôndria, vacúolos, retículo endoplasmático e Complexo de Golgi. As células de levedura possuem metabolismo tanto aeróbico quanto anaeróbio facultativo. São células quimio-heterotróficas, por necessitarem de uma fonte de carbono e de energia (WALKER, 1998; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura pertencente ao grupo de microrganismos mais estudados pela comunidade científica, sendo considerado como um organismo modelo por pertencer a comunidade GRAS (*Generally Recognize as Safe*) e são de extrema importância para a produção de pães, bebidas alcoólicas e etanol combustível, entre outros produtos de importância industrial e econômica (JOHNSON; ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

Por muitos anos utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de panificação como levedura de partida das fermentações nas destilarias, por apresentar alta disponibilidade e baixo custo (BASSO et al. 2011). Visando melhorias no processo, uma busca por leveduras que apresentassem características como alta velocidade de fermentação, tolerância osmótica, ao etanol, a acidez, alta

viabilidade celular durante o reuso de células e resistência a altas temperaturas, tem sido uma preocupação constante. Porém, ainda não há relatos na literatura de que tais características existam em um único microrganismo, por isso algumas destilarias usam uma mistura de leveduras para se dar início aos processos fermentativos (BANAT et al. 1998). As principais leveduras utilizadas atualmente são as linhagens CAT-1, SA-1, BG-1 e PE-2, usadas para dar início a fermentação. Essas leveduras, são adaptadas por serem isoladas durante processos fermentativos e apresentam heterogeneidade genômica (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; AMORIM et al.,1989).

2.5 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico, que ocorre, principalmente, a nível citoplasmático, com o objetivo de acumular energia (ATP) para a realização de atividades fisiológicas, tais como crescimento e reprodução. A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico se dá através da sequência de reações catalisadas por enzimas, denominada via glicolítica. As enzimas da via glicolítica sofrem intervenções de vários fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH, temperatura entre outros) que influenciam sobre a sua atividade, afetando, assim, o desempenho do processo fermentativo (QUEROL et al., 2003). As células de leveduras também são submetidas a diversos estresses ambientais como elevadas temperaturas, excesso de etanol, baixo pH, alta pressão osmótica, presença de ácidos orgânicos, sendo assim necessário o desenvolvimento de mecanismos moleculares de resistência a estas situações adversas. Qualquer fator do meio, que possa produzir um efeito adverso sobre o crescimento celular, é considerado um agente de estresse. A sobrevivência das células depende da capacidade de adaptação rápida a mudanças (temperatura, pH estresses de altas concentrações de açúcar, jejum nutricional) que ocorrem no meio de cultivo (BASSO et al., 2008, DIAS et al. 2009).

2.6 Microrganismos presentes no processo fermentativo

A matéria-prima utilizada na produção de etanol não é esterilizada, passa apenas por alguns tratamentos como término, ácido e clarificação, com o objetivo de prevenir ou inibir contaminações. No entanto o processo fermentativo é aberto e

sujeito a contaminações bacterianas e por leveduras selvagens ou não-*Saccharomyces* com as espécies *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Dekkera* e *Issatchenkia* pode ser encontradas nas dornas (BASSO et al., 2008, LALUCE et al., 2016)

Poucas unidades industriais terminam a safra com a levedura de partida do processo, pois as dornas são dominadas pelas leveduras selvagens que apresentam padrões fermentativos semelhantes ao das linhagens *Saccharomyces*, mas características negativas, que podem levar a prejuízos econômicos, devido à formação de espuma, floculação, glicerol e açúcar residual (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011).

A contaminação por bactérias é um problema incidente no processo de fermentação, a espécie mais encontrada são os *Lactobacillus*, que competem com as leveduras pelos nutrientes presentes no meio e produzem ácidos orgânicos, como ácido acético e ácido lático. Os ácidos inibem a atividade das leveduras devido o abaixamento do pH (INGLEDEW, 2003; SKINNER; LEATHERS, 2004).

2.7 Fermentação mista

É fundamental conhecer os efeitos das associações entre os microrganismos presentes no processo fermentativo, principalmente quando culturas mistas são utilizadas. A interação entre as leveduras, assim como as condições de fermentação, a atividade metabólica, escassez de nutrientes e presença de inibidores são os principais efeitos que devem ser considerados (BASSO et al., 2008).

Na literatura, não há relatos sobre a existência uma leveduras que apresentem tolerância a todos estes estresses sofridos durante o processo de fermentação. Devido a isto uma mistura de leveduras é utilizada para dar início as safras, como tentativa de melhorar rendimento no processo fermentativo

A interação entre os microrganismos pode ser observada principalmente pelos metabólitos excretados durante o processo de fermentação em culturas mistas entre leveduras, devido ao aumento de determinados produtos (glicerol externo, acetaldeído e etanol) ou pela assimilação preferencial do produto por um microrganismo para outro. As interações mais ocorridas entre as leveduras nas

fermentações mistas estão relacionadas com a acidez e glicerol externo (FLEET, 2008).

2.8 Atual potencial do etanol

Cerca de 40% dos automóveis utilizaram etanol como combustível no estado de São Paulo, perfazendo um total de mais de 3 milhões de carros (DETRAN, 2015). Na safra 2014/2015 houve um aumento de 6,3 % na produção de etanol nacional (CONAB, 2016). Isso mostra que apesar de décadas, após a implementação do Programa Nacional do Álcool, o etanol ainda é um produto competitivo, e o processo vem passando por melhorias a cada nova safra. Em 2007, havia 370 usinas sucroalcooleiras distribuídas pelo Brasil, estando concentradas principalmente nas regiões sudeste e nordeste (NOVACANA, 2008).

Apesar de ser um processo consolidado, estudos são necessários em todas as etapas, a fim de se obter um maior rendimento e menor custo de produção. Entre as áreas de maior interesse estão: desenvolvimento de linhagens de levedura melhoradas, descoberta de novos agentes bactericidas, e variedades de cana-de-açúcar, métodos rápidos para identificação de leveduras, entre outros (BAEYENS, 2015).

Uma das grandes apostas dos pesquisadores está relacionada com a produção do etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar ou qualquer material lignocelulósicos. Assim, grandes centros de pesquisa no mundo estão buscando alternativas para tornar economicamente viável este processo. Uma das primeiras usinas de etanol de segunda geração em escala industrial do mundo, foi inaugurada pela empresa Granbio, em São Miguel dos Campos - Alagoas, podendo elevar nossa produção de etanol em torno de 30%, sem aumento a área de plantio (GUADAGNIN, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da levedura híbrida *Saccharomyces cerevisiae* IQAr/45-1, adicionada ao creme de levedura industrial, usada como inóculo em fermentação de melaço de cana-de-açúcar, com objetivo de analisar os efeitos sinérgicos e antagônicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o comportamento do creme de levedura industrial após a estocagem;
- b) Padronizar o tempo de revitalização do creme de levedura industrial;
- c) Determinar o maior consumo de açúcar em fermentações usando o creme de levedura industrial como inóculo a 35 e 40 °C;
- d) Analisar o desempenho do creme de levedura em ciclos sucessivos de fermentação;
- e) Avaliar o efeito da adição da levedura híbrida *S. cerevisiae* IQAr/45-1 em diferentes proporções no creme de levedura industrial;
- f) Verificar se a levedura IQAr/45-1 apresenta capacidade de recuperar uma fermentação mista a 35 °C e 40 °C, analisando o consumo de açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Leveduras

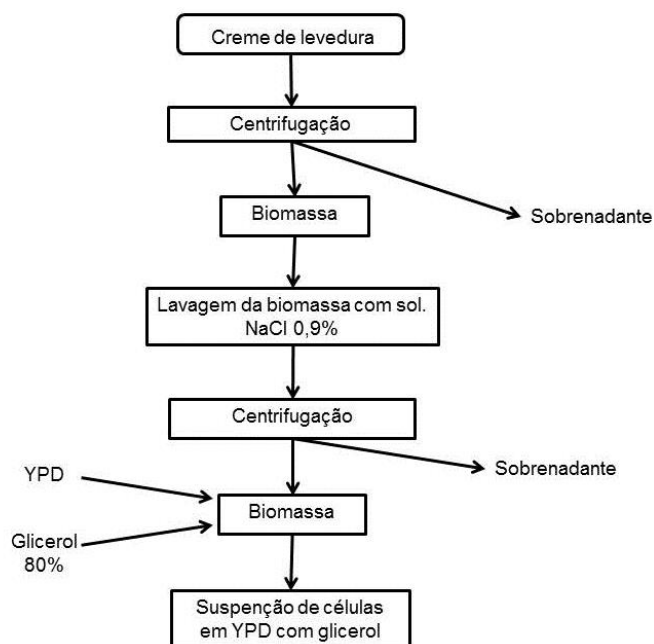
Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizadas as seguintes leveduras: Linhagem híbrida de *S. cerevisiae*, IQAr/45-1 construída usando um haploide PV2-1b e um haploide Osmo8-1a, derivados das leveduras diploide PV2 e Osmo-8 respectivamente (SOUZA et al., 2007). As marcas genéticas do híbrido desapareceram devido a recombinação (Nº protocolo patente: PI 0806141-6, INPI Brasil, setembro de 2008). A linhagem pertence ao Laboratório de Unidades das Leveduras Industriais do Instituto de Química – UNESP Araraquara, foram mantida em frasco de vidro (*vial*) contendo meio YPD sólido e refrigerada a 4 °C, durante os estudos.

4.2 Creme de levedura

O creme de levedura foi gentilmente cedido pela usina Santa Cruz localizada no município de Américo Brasiliense após trinta dias do início da safra. A coleta foi feita em frasco de vidro tipo *Schott* esterilizado e vedado com tampa de rosca. O creme de levedura foi coletado diretamente na dorna onde são mantidas as leveduras após o tratamento ácido. Estes fracos foram transportados em caixa de isopor com gelo até o Instituto de Química da UNESP onde foi caracterizado e armazenado.

Como descrito na Figura 4, 150 mL de creme de levedura foi centrifugado (centrifuga *Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6R*) em frasco de 200 mL a 10800 *g* por 3 minutos e a seguir foi suspenso em solução salina 0,9 % esterilizada. A biomassa lavada foi separada por nova centrifugação nas mesmas condições e suspensa em 150 mL água destilada esterilizada. A um volume de 10 mL de suspensão adicionou-se 2 mL de glicerol 80 % esterilizada e 4 mL de meio YPD. Foram mantidas em freezer – 80 °C para uso. Tal que se obtenha uma concentração de 1×10^8 células/100 mL no meio contido nos reatores.

Figura 4 - Etapas realizadas para estocagem das amostras de creme de levedura industrial



Fonte: Elaborado pela autora.

Para a identificação e caracterização da amostra, foi realizado o plaqueamento em meios diferenciais (item 4.4), medição de pH, concentração e viabilidade celular.

4.3 Melaço de cana-de-açúcar

A amostra de melaço de cana-de-açúcar utilizado para o desenvolvimento dos experimentos foi cedida também pela usina Santa Cruz, armazenada em frasco de vidro tipo *Schott* e mantido em câmara fria (4 °C). O melaço diluído foi utilizado como meio para propagação das leveduras e ensaios de fermentação.

4.3.1 Clarificação do melaço de cana-de-açúcar

Para a clarificação diluiu-se o melaço duas vezes com água de torneira, o pH ajustado para 4,5 com H_2SO_4 6 mol/L. O melaço diluído de pH ajustado, foi submetido a um tratamento térmico em autoclave a 100°C por 40 minutos. Terminado o aquecimento o caldo foi mantido em repouso por 48 horas em câmara fria (4°C), para decantação dos resíduos sólidos e o sobrenadante sifonados utilizando bomba a vácuo e Kitassato (LALUCE et al., 1991).

4.4 Meio diferenciais

4.4.1 Meio YPD

Meio rico, recomendado por Sherman e Hicks (1991) para crescimento de leveduras totais (*Saccharomyces* e não *Saccharomyces*). Composto por:

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

Procedimento: os componentes do meio foram pesados, dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos a 1 ATM de pressão. Após esterilização e resfriamento parcial, o meio foi vertido em placas de Petri e conservado em geladeira a 4 °C.

4.4.2 Meio Nagai

Utilizado para isolamento de variantes morfológicos, descrito por Nagai (1963). Este meio permite observar a variabilidade genética das colônias, devido ao crescimento de colônias com diferentes tamanhos e colorações.

Composição (m/v):

Glicose	2,00 %
Peptona	0,15 %
Extrato de levedura	0,15 %
KH ₂ PO ₄	0,15 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,15 %
MgSO ₄	0,10 %
Ágar	2,00 %

Procedimento: os componentes do meio foram pesados, dissolvidos em água Milli Q, a esterilização do meio foi feita em autoclave a 121 °C por 20 minutos a 1 ATM de pressão. Após esterilização e resfriamento parcial, corantes foram adicionados ao meio e este foi homogeneizado e vertidos em placas de Petri. Após solidificação, foi conservado em geladeira a 4 °C.

Os corantes utilizados foram eosina amarelada em uma concentração de 8 mg/L e azul de tripano 15 mg/L. Soluções foram preparadas separadamente e esterilizadas por filtração (filtro GSW 0,22 µm de diâmetro). As soluções estéreis foram estocadas em frascos âmbar em geladeira 4 °C.

4.4.3 Meio WLN

O meio WLN foi utilizado o meio comercial, diluído seguindo as especificações do fabricante (HIMEDIA). Este meio é muito utilizado em cervejarias, composto por:

Extrato de levedura	0,4%
Caseína hidrolisada	0,5%
Glicose	5,0%
KH ₂ PO ₄	0,055%
KCl	0,0425%
CaCl ₂	0,0125%
MgSO ₄	0,0125%
FeCl ₃	0,00025%
MnSO ₄	0,00025%
Ágar	2,0%
Verme de bromocresol	0,0022%

4.4.4 Meio N1

Este meio foi utilizado para monitorar a dominância e persistência de leveduras em processos fermentativos (MASIERO, 2015). Contendo a seguinte composição (m/v):

Glicose	2,00 %
Peptona	0,20 %
Extrato de levedura	0,15 %
KH_2PO_4	0,15 %
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,10 %
MgSO_4	0,10 %
Ágar	2,00 %

Procedimento: os componentes do meio foram pesados, dissolvidos em água Milli Q, sendo o ágar adicionado por último, a esterilização do meio foi feita em autoclave a 121 °C por 20 minutos a 1 ATM de pressão. Após esterilização e resfriamento parcial, corantes foram adicionados ao meio e este foi homogeneizado e vertido em placas de Petri. Após solidificação foi conservado em geladeira a 4 °C.

Os corantes utilizados foram eosina amarelada em uma concentração de 12 mg/L e azul de tripano 15 mg/L. Soluções foram preparadas separadamente e esterilizadas por filtração (filtro GSW 0,22 µm de diâmetro). As soluções estéreis foram estocadas em frascos âmbar em geladeira 4 °C.

4.5 Ensaios de Fermentação

4.5.1 Revitalização do creme de levedura industrial

O creme de levedura industrial passou por revitalização após o degelo para recuperar a viabilidade perdida durante o armazenamento.

As amostras foram degelada e centrifugada (3000 *xg* por 4 min) para a separação do sobrenadante (meio YPD e glicerol), lavadas com água destilada esterilizada e centrifugada novamente. Ao *pelet* foi adicionada água destilada esterilizada até atingir o volume de 15 mL e se obter um creme. Transferiu-se 7,5 mL deste creme de levedura para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de melaço (6 % ART). Para padronização os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora agitada (120 rpm) por 8 horas a temperatura de 35 °C, o melhor tempo de incubação foi determinado com relação a melhor viabilidade.

Após a incubação as células foram recuperadas por centrifugação (3000 *xg* por 4 min), lavadas com água destilada e mantidas em geladeira (4 °C) *overnight* até a inoculação.

4.5.2. Propagação IQAr/45-1

Para a propagação, uma alça de cultura pura foi inoculada em 50 mL de melaço 3 % de ART (m/v) em Erlenmeyers de 125 mL. Este pré-inóculo foi mantido em mesa agitadora a 120 rpm por 12 horas à 35°C. Depois de decorrido o tempo de propagação, o meio (50 mL de melaço 3 % em ART) contendo as células foi vertido em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de melaço 10 % de ART (m/v), atingindo um volume final de 100 mL de melaço 5 % de ART (m/v). Mantido sob agitação de 120 rpm e 35 °C. Após as 12 horas de incubação, o meio (100 mL de melaço 5 % em ART) contendo as células foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e as células transferidas para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de melaço 8 % de ART (m/v) sob agitação a 120 rpm e 35 °C. Após 12 horas de incubação, o meio foi centrifugado e descartou-se o sobrenadante, as células foram transferidas para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de melaço 12 % de ART (m/v). Esta suspensão foi novamente mantida sob agitação de 120 rpm à 35°C. Após a incubação as células foram centrifugadas (3000 xg por 4 minutos), lavadas e reservadas para serem inoculadas na fermentação (Adaptação segundo MORAIS, 2013).

4.5.3 Fermentação em batelada alimentada

Os ensaios de fermentação foram realizados em ciclo único e cinco ciclos sucessivos com reuso de células.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL vedado com rolha de borracha (Figura 5), com um volume final de 100 mL de melaço de cana-de-açúcar. O inóculo, utilizado foi equivalente a 30 % do volume final (30 mL), contendo concentração de 1×10^8 células/mL e o mosto de melaço de cana-de-açúcar diluído contendo 28,5 % ART (m/v), para atingir uma concentração final de 20 % ART (m/v). A alimentação foi realizada por bomba peristáltica (Lab1000, modelo LM-48/DG10-4), por um tempo de aproximadamente 3 horas, com um fluxo de 0,389 mL/min, os frascos foram mantidos sob agitação de 120 rpm, durante 10 horas. As temperaturas utilizadas foram de 35 e 40 °C. Os experimentos foram realizados em duplicata e amostras para análise de viabilidade, biomassa e ART foram retiradas no tempo inicial, após 3, 6, 8 e 10 horas.

Amostras de 2 mL foram retiradas do reator com auxílio de uma pipeta automática de 5 mL e armazenadas em frasco de plástico tipo *Eppendorf*. Após a coleta as amostras foram mantidas em isopor contando gelo, e a análise de viabilidade foi realizada, em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 $\times g$ por 5 minutos e a biomassa foi analisada, e o sobrenadante foi re-centrifugado a 10400 $\times g$ por 3 minutos para retirada e todos os sólidos presentes, após a centrifugação o sobrenadando foi transferido para um novo frasco tipo *Eppendorf* que foi mantido em congelador (0 °C) para posterior análise de ART.

Figura 5 - Reator utilizado nos ensaios de fermentação em batelada alimentada. Erlenmeyer de 250 mL vedado com rolha de borracha contendo três furos, sendo essas para alimentação, amostrador e saída de CO₂.



Fonte: Arquivo de pesquisa

4.5.4 Ciclos sucessivos de fermentação com reuso de células

Após cada ciclo de fermentação o mosto fermentado foi centrifugado a 3000 $\times g$ por 4 minutos para a recuperação das células, o sobrenadante descartado e as células foram lavadas com água destilada estéril, re-centrifugadas e mantidas em geladeira *overnight* para uso como inóculo do ciclo seguinte.

4.5.5 Co-fermentação em batelada alimentada do creme de levedura industrial associado a levedura IQAr/45-1

A levedura IQAr/45-1 foi adicionada ao creme de levedura nas proporções 2:1 e 3:1 (creme de levedura: IQAr/45-1), para determinar a proporção que levasse ao maior consumo de açúcares. Fermentações únicas, como já descrito, foram realizadas. Após determinada a melhor concentração, as fermentações foram repetidas por cinco vezes com reuso do inóculo, utilizando sempre como inóculo inicial 1×10^8 cel/ mL.

4.6 Ensaios analíticos e microbiológicos

4.6.1 pH

O pH foi determinadas com o uso de um pHmetro marca KASVI.

4.6.2 Contagem de células totais

A determinação da população total das células foi realizada por contagem em câmara de Neubauer. Após diluição de 100 vezes a amostra foi observada em microscópio ótico e a concentração calculada de acordo com a equação 1.

$$celulas/mL = células\ totais \times 5 \times 10^4 \times diluição \quad [Equação\ 1]$$

4.6.3 Viabilidade celular

A viabilidade foi determinada pelo método de Lee, (1981) em câmara de Neubauer, onde a solução de azul de metileno, quando em contato com as células inviáveis ou mortas apresentam coloração azul e quando em contato com as células com alta atividade fisiologia, ou seja, células viáveis se mantem incolores. A suspensão de células foi diluída na solução de azul de metileno. Após 5 minutos em contato com o corante, realizou-se a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico. Viabilidade foi obtida de acordo com a equação 2.

$$\% células\ viáveis = \frac{células\ vivas}{células\ totais} \times 100 \quad [Equação\ 2]$$

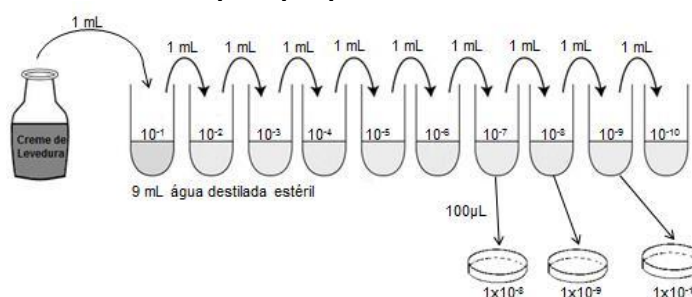
Composição da solução de azul de metileno (g/L):

Glicose	10,00 g
KCl	00,42 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	00,48 g
NaHCO ₃	00,20 g
NaCl	09,00 g
Azul de metileno	00,25 g
Água destilada	1 L

4.6.4 Plaqueamento em meios diferenciais

Antes do plaqueamento as amostras passaram por uma diluição seriada como mostrado na Figura 6, e foram plaqueadas utilizando alça de Drigalsky nos meios YPD, N1 e WLN. Incubadas a 30 °C de 3 a 5 dias para o crescimento das colônias.

Figura 6 - Diluição seriada realizada para plaqueamento



Fonte: Elaborado pela autora

4.6.5 Açúcares redutores totais

O ART foi medido segundo o método de Miller (1959), que utiliza uma solução contendo ácido 3,5- dinitrosalicílico que reagem com os açúcares presentes na amostra mudando sua coloração quando em contato com água fervendo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) e a absorbância foi correlacionada com a concentração de açúcar, obtendo-se uma curva padrão. A quantidade de açúcar redutor total foi expressa em porcentagem e calculada a partir da Equação 3.

$$ART (\%) = \frac{abs + 0,096}{31,941} \times diluição \quad [Equação 3]$$

Procedimento: as amostras de vinho fermentado foram centrifugadas a 10500 *xg* por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi diluído com água destilada, hidrolisado com solução de HCl 6 mol/L por 7 min em banho-maria a 60 °C, neutralizado com solução de NaOH 2,4 mol/L e uma solução contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico foi adicionada. As amostras foram colocadas em água fervendo por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 546nm.

Solução DNS:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	1 g
C ₄ H ₄ K ₂ O ₆ · 4H ₂ O	30 g
NaOH	1,6 g
Água destilada	100 mL

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

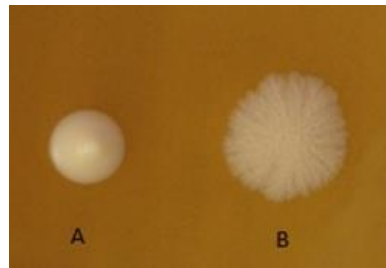
5.1 Creme de levedura

Assim que coletado, o creme de levedura industrial passou por análise de viabilidade, medição de pH e plaqueamento.

A viabilidade da amostra do creme de levedura industrial foi de 91 % determinada segundo o método de Lee (1981). O pH foi da ordem de 2,30 medido em phmetro (KASVI).

Depois de incubada a amostra plaqueada mostrou colônias semelhantes à *Saccharomyces cerevisiae* (superfície lisa e bordas regulares) e leveduras selvagem (bordas irregulares, superfície rugosa e diâmetro maior) como mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Levedura semelhante à *Saccharomyces cerevisiae* (A) e levedura selvagem (B) encontradas no creme de levedura industrial.



Fonte: Arquivo de pesquisa, 2015

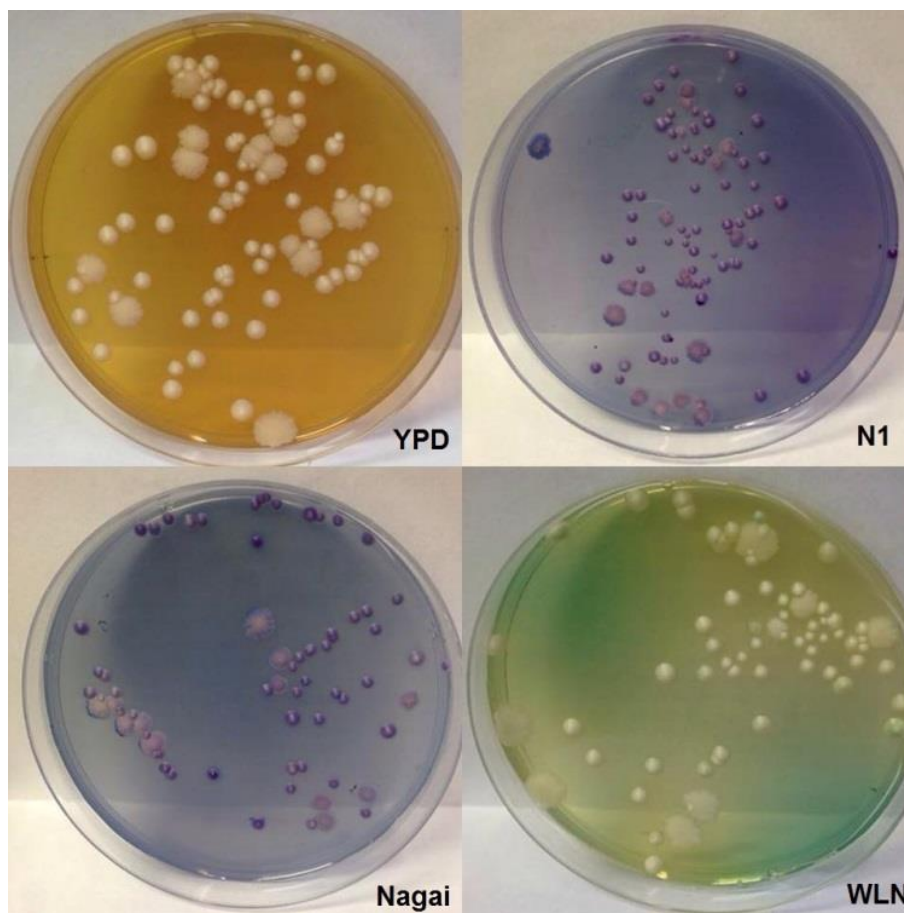
As diluições que apresentaram melhor concentração de colônias foram na faixa de 5×10^{-6} e 5×10^{-7} células/ mL. Nos meios contendo corantes, diferenças entre a morfologia das colônias foram observadas, indicando assim a heterogeneidade da amostra (Figura 8).

Tabela 1- Número de colônias formadas no plaqueamento da amostra em meios diferenciais após 5 dias de incubação a 30 °C.

Meios	Levedura (tipo de morfologia)	Total de células (UFC/mL)	
		5×10^{-6}	5×10^{-7}
YPD	Semelhantes a <i>Saccharomyces</i>	129	73
WLN		209	59
Nagai		207	55
N1		203	70
YPD	Semelhantes a selvagens	59	15
WLN		57	9
Nagai		52	12
N1		56	17

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 8 - Plaqueamento do creme de levedura industrial em meios diferenciais, para caracterização da amostra. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C



Fonte: Arquivo de pesquisa, 2015

A contagem das colônias mostra que 80 % das leveduras presentes na amostra eram semelhantes a colônias do gênero *Saccharomyces* e 20 % semelhantes a não-*Saccharomyces* ou selvagens. As leveduras selvagens geralmente competem com as leveduras *Saccharomyces* e tendem a dominar o processo. Como a amostra de creme de levedura industrial foi coletada após um mês de início da safra a porcentagem de leveduras selvagens foi em baixo nível, no entanto que ao decorrer da safra esse microrganismo contaminante tende a dominar quase que completamente o processo, como descrito por Basso et al. (2008), onde estudos realizados em destilarias mostram que em cerca de 40 dias as leveduras selvagens dominam completamente o processo. As leveduras selvagens são mais resistentes que as *Saccharomyces*, por suportarem estresses como temperaturas elevadas, presença de ácido láctico e altas concentrações de etanol.

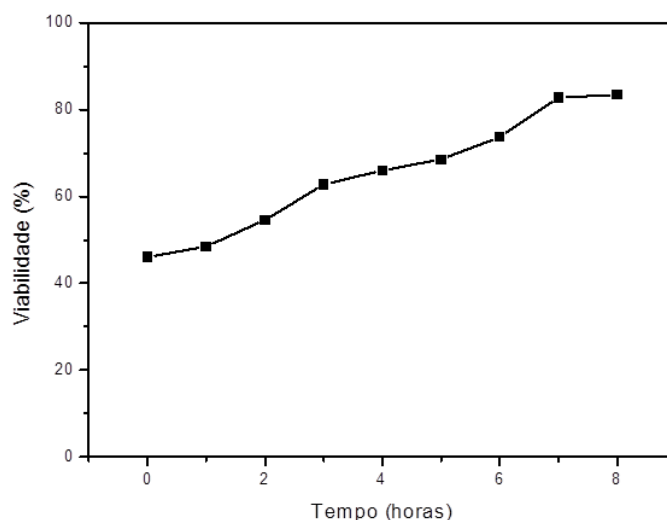
5.2 Revitalização do creme de levedura

Após a amostra de creme de levedura industrial ser armazenada, um experimento para otimizar o processo de revitalização foi realizado. Segundo Basso (2011) a viabilidade celular é de extrema importância em o processo utilizando fermentação alimentada, pois ao fim de cada ciclo as células são reutilizadas não podendo então apresentar altos níveis de mortalidade o que seria prejudicial para o processo.

Sendo assim uma amostra do creme de levedura estocado em freezer a - 80 °C foi revitalizado em melaço 6 % de ART durante 8 horas a fim de determinar o menor tempo para se obter maior recuperação da viabilidade.

A Figura 9 mostra o aumento da viabilidade em relação ao tempo, e sendo que após 7 e 8 horas a viabilidade apresentou pequena diferença, com valores de 82,71 e 83,47 %, com base nesses dados determinou que o tempo de revitalização do creme de levedura industrial seria de 7 horas.

Figura 9 - Análise do aumento da viabilidade em relação ao tempo do creme de levedura industrial quando revitalizado utilizando melaço 6 % a 35 °C.

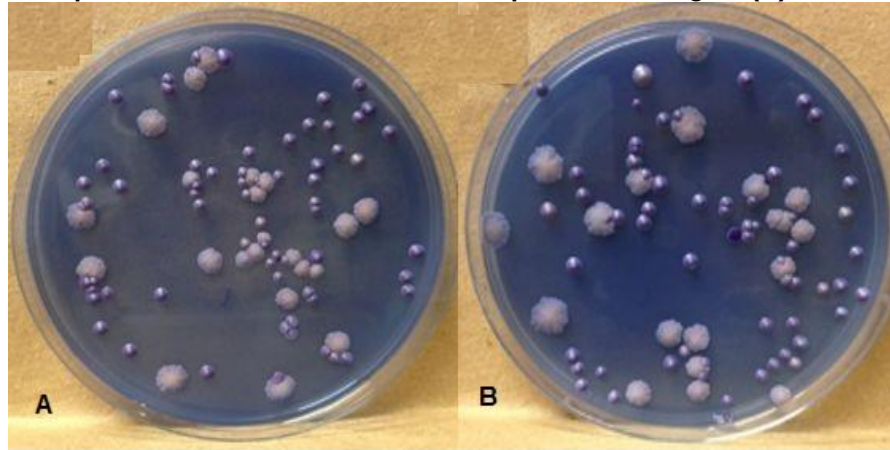


Fonte: Elaborado pela autora

5.3 Caracterização do creme de levedura industrial após degelo e revitalização

Com o objetivo de utilizar o creme de levedura industrial sem alteração de suas características, o creme de levedura armazenado foi plaqueado após o degelo e depois da revitalização, e não apresentou mudanças significativa na proporção de leveduras *Saccharomyces* e não - *Saccharomyces* quando comparados entre eles como observado na Figura 10. Sendo assim, após o processo de estocagem e revitalização, as características das células do creme de levedura se mantiveram (cerca de 80 % *Saccharomyces* e 20 % leveduras selvagens). A realização de experimentos com um fermento que apresente características similares ao fermento utilizado nas usinas produtoras de etanol é possível.

Figura 10 - Plaqueamento do creme de levedura após da estocagem (A) e revitalização (B)



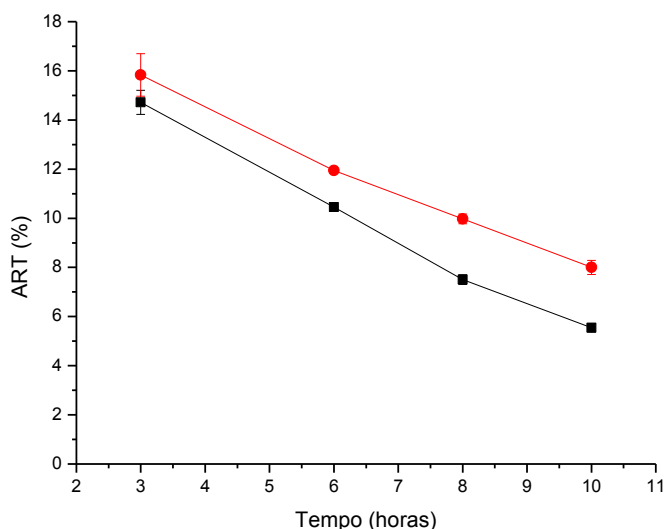
Fonte: Arquivo de pesquisa, 2015

5.4 Fermentação do creme de levedura industrial

A fermentação utilizando o creme de levedura industrial foi realizada com melaço 20 % de ART a uma temperatura de 35 °C e 40 °C, essas condições foram selecionadas com base em dados encontrados na literatura e no cotidiano das usinas sucroalcooleiras (BASSO, et al., 2008; ANDRIETTA, ANDRIETTA e STUPIELLO, 2011; LALUCE, et al., 2016).

Como apresentado na Figura 11, a fermentação que teve o maior consumo de açúcar foi quando utilizada uma temperatura de 35 °C, ao final de 10 horas o residual de açúcar foi de $5,55 \pm 0,18$ % quando comparado aos $8 \pm 0,28$ % restantes quando fermentado a 40 °C. Mostrando assim a baixa tolerância das leveduras presente no creme industrial a altas temperaturas.

Figura 11 - Consumo dos açúcares redutores totais em fermentação do creme de levedura industrial em diferentes condições: (■) 35 °C e 20 % ART; (●) 40 °C e 20 % ART



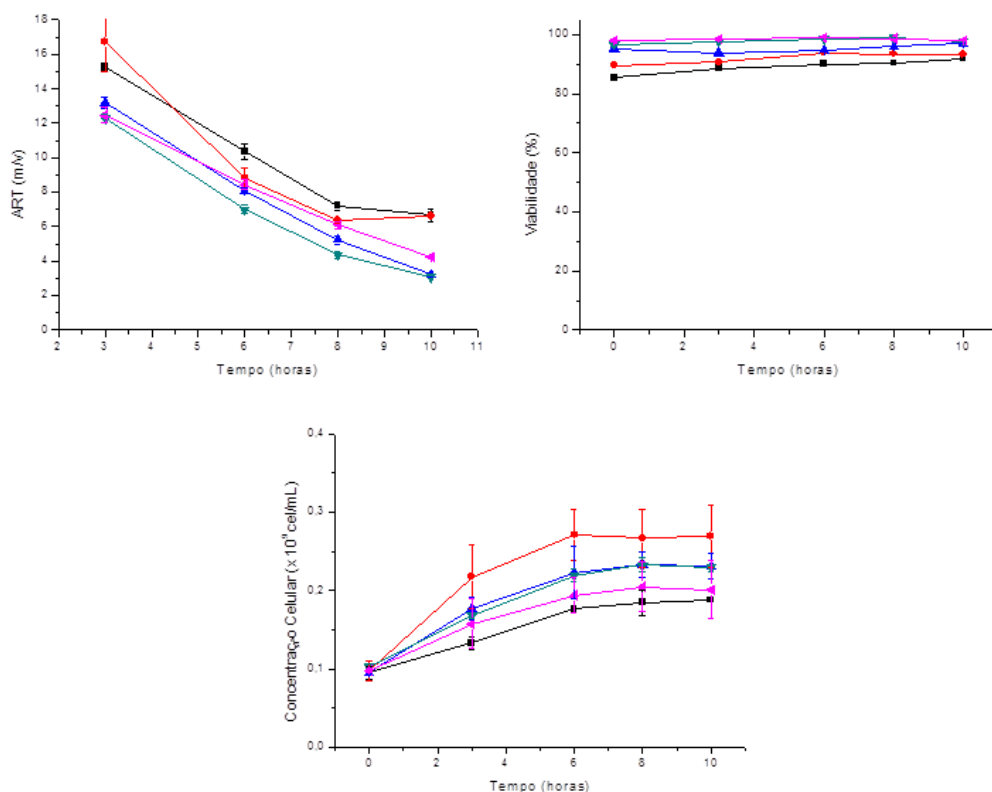
Fonte: Elaborado pela autora

5.5 Ciclos sucessivos de fermentação com reuso das células

O creme de levedura industrial foi submetido a 5 ciclos fermentativos sucessivos a 35 °C e 40 °C, onde concentração celular, viabilidade e consumo de açúcar foram analisados após 3, 6, 8 e 10 horas de fermentação.

Após os 5 ciclos sucessivos de fermentação a 35 °C com reuso de células, observa-se a ocorrência de adaptação dos microrganismos, no final do 3º e 4º ciclo foi onde se obteve o maior consumo de açúcar, sobrando 3,21 % e 3,07 % de ART respectivamente. O consumo de açúcar nas três primeiras horas variou de 16,7 % no ciclo 2 a 12,4 % no ciclo 4, mostrando que as primeiras horas de fermentação são de extrema importância, e que o microrganismo ao decorrer dos ciclos se adaptaram as condições adversas que poderiam estar presente no meio. A concentração celular apresentou uma diferença de crescimento entre o ciclo 1 e 2, onde no ciclo 2 nas três primeiras horas ocorreu um elevado crescimento, dobrando a concentração celular. Em relação a viabilidade houve uma pequena variação, sendo que ao início do primeiro ciclo foi de 85,32 % e ao fim do quinto ciclo, de 97,89 % como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 35 °C, utilizando ART de 20 % no melaço, alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial em uma concentração de 1×10^8 cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◄) ciclo 5.

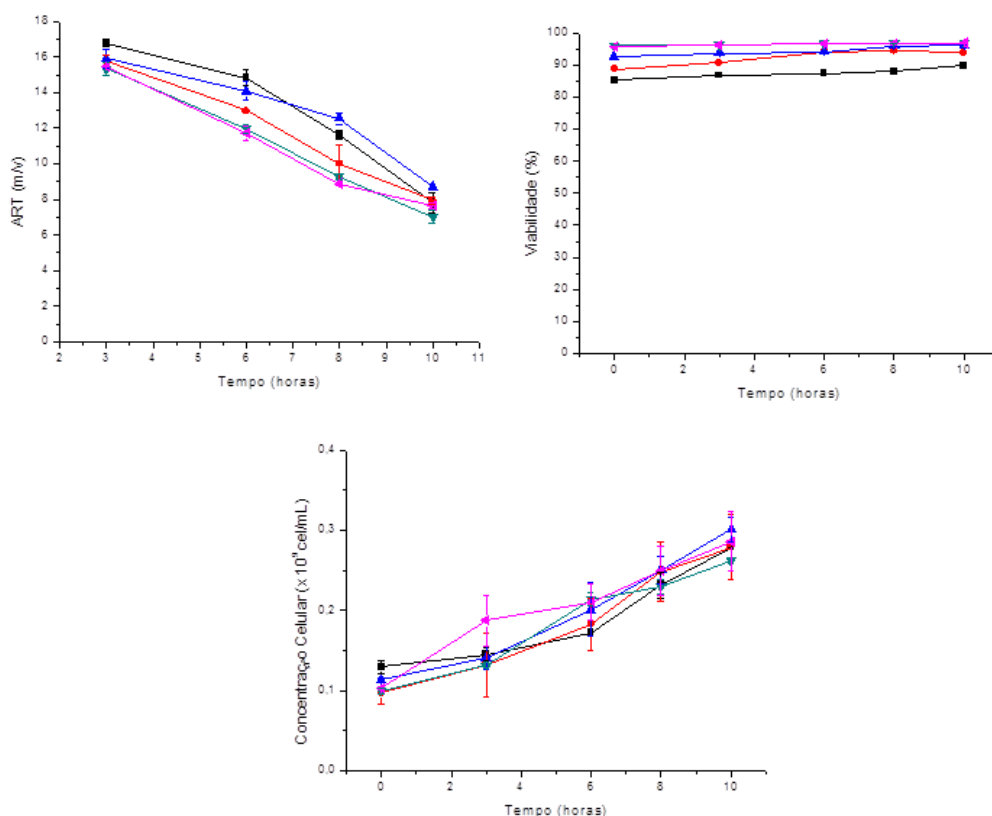


Fonte: Elaborado pela autora

Analisando-se os dados da fermentação realizada a 40 °C, o maior consumo de açúcar ocorreu nos ciclos 4 e 5 apresentando 7,03 e 7,64 % ART. A viabilidade ao final de cada ciclo variou de 90 % – 97 % e a concentração celular em todos os ciclos apresentou valores similares (Figura 13).

Comparando-se os dois experimentos, a viabilidade não apresentou diferenças. O consumo de ART a 35 °C foi maior e da ordem de 3,07 %, que a 40 °C com consumo foi de 7,03% de açúcar residual. Comprovando assim o experimento realizado a 35 °C, mostrou melhor desempenho do que a 40 °C, ou seja menor tolerância a altas temperaturas.

Figura 13 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 40 °C, utilizando ART de 20 % no melaço, alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial em uma concentração de 1×10^8 cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◆) ciclo 5.



Fonte: Elaborado pela autora

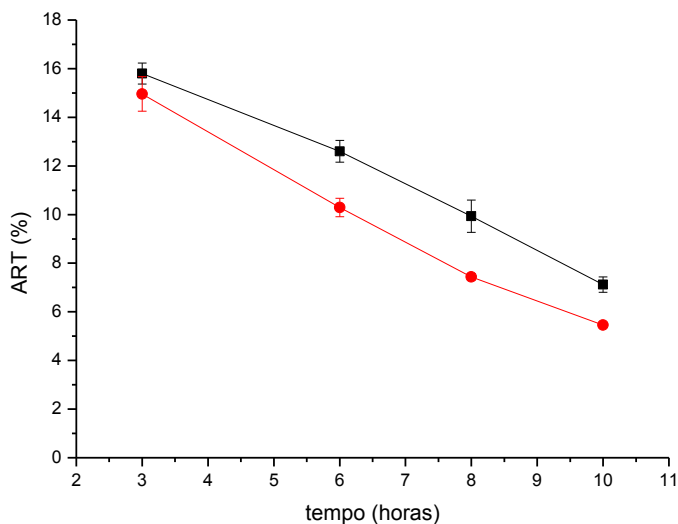
5.6 Co-fermentação em batelada alimentada com creme de levedura industrial associado a levedura de IQAr/45-1

Ciclos únicos de fermentação foram realizados adicionando a levedura IQAr/45-1 ao creme de levedura, para testar a capacidade em aumentar o consumo de açúcar na fermentação, nos experimentos realizados a 35 °C com 10 horas de duração.

A levedura IQAr/45-1 foi adicionada nas proporções de 3:1 e 2:1, sendo maior parte de creme de levedura, uma parte da levedura IQAr/45-1. O ART residual de $5,46 \pm 0,04$ % e $7,13 \pm 0,32$ % das proporções 3:1 e 2:1 respectivamente (Figura 14). A proporção utilizada para a realização dos demais experimentos foi 3:1, pois

apresentou um menor açúcar residual e necessidades de menor quantidade de levedura IQAr/45-1.

Figura 14 - Fermentações utilizando diferentes proporções da levedura creme de levedura: IQAr/45-1. (■) 2:1; (●) 3:1.

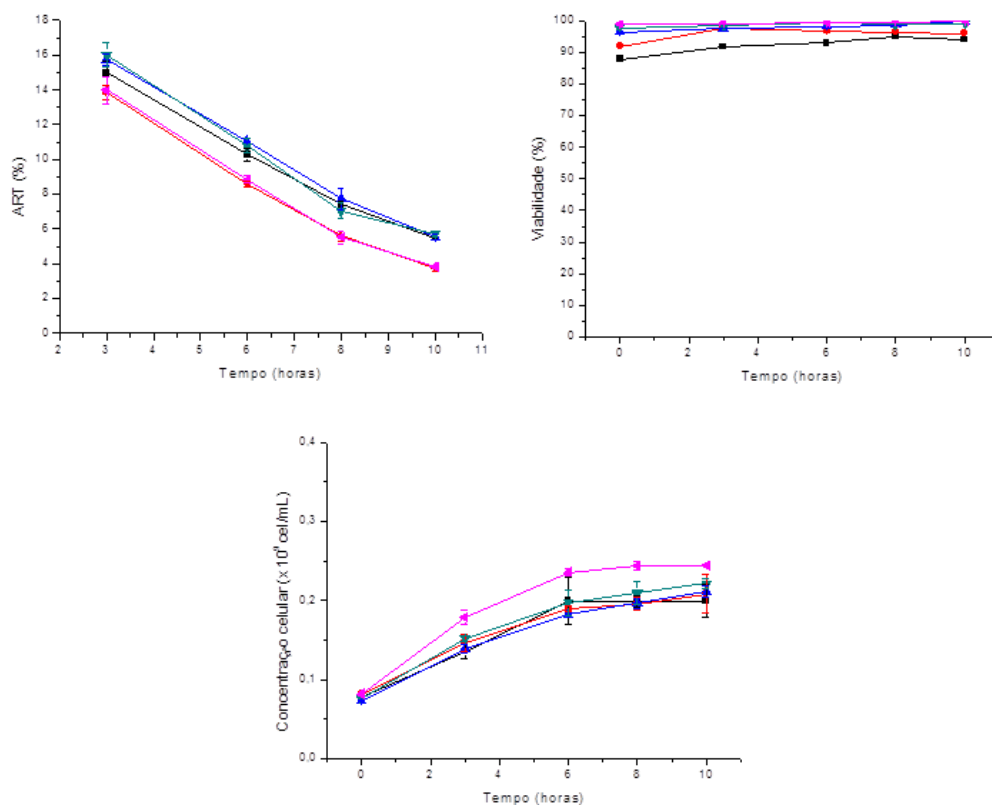


Fonte: Elaborado pela autora.

A levedura IQAr/45-1 foi adicionada ao creme de levedura e utilizada como inóculo em 5 ciclos sucessivos com reuso das células a 35 °C e 40 °C.

Nos ciclos realizados a 35 °C (Figura 15), o maior consumo de açúcar observado foi nos ciclos 2 e 5 que apresentaram cerca de 3,8 % de açúcar residual após 10 horas de fermentação, enquanto que os ciclos 1, 3 e 4 apresentaram 5,5 % ART. A viabilidade apresentou um aumento crescente ao decorrer dos ciclos, sendo no início do primeiro ciclo 87,85 % das células viáveis, e ao final do quinto ciclo 99,8 %. Uma diferença no crescimento celular foi observada no quinto ciclo, como resposta a algum estresse sofrido pelas células ao decorrer de cinco ciclos.

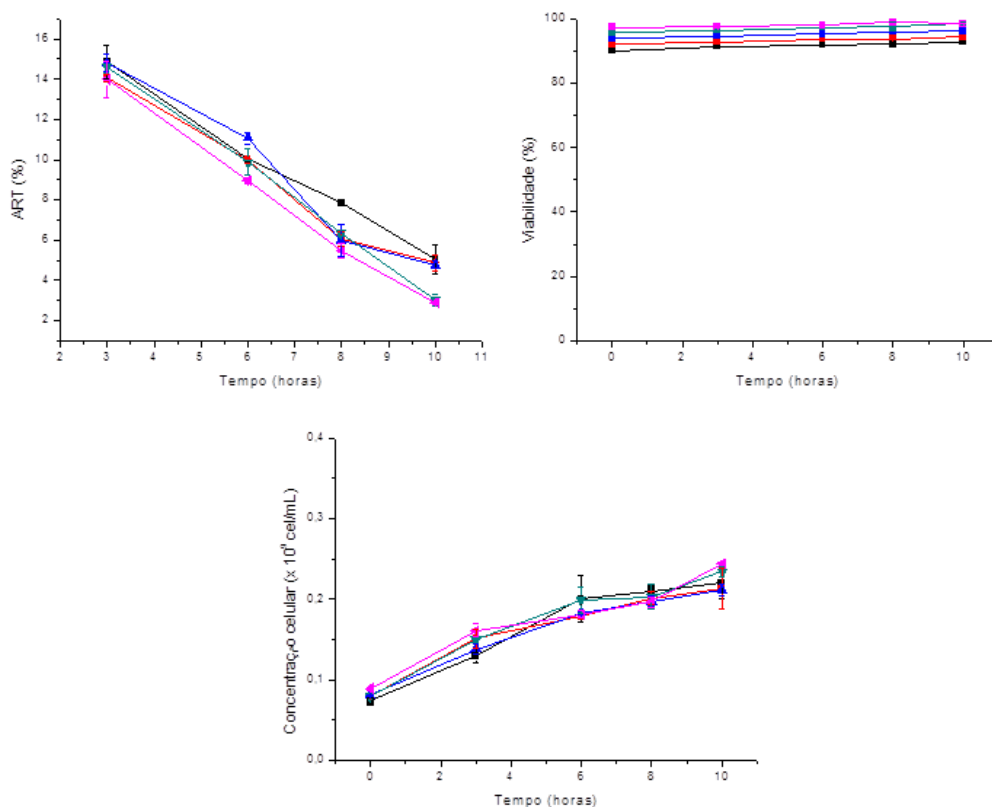
Figura 15 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 35 °C, utilizando ART de 20 % no melaço e alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial e levedura IQAr/45-1 (3:1) em uma concentração de 1×10^8 cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo: (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◀) ciclo 5.



Fonte: Elaborado pela autora

A fermentação a 40 °C utilizando como inóculo creme de levedura industrial e a levedura híbrida IQAr/45-1 foi observado maior consumo de açúcar foi nos ciclos 4 e 5 apresentando 3,01 e 2,89 % de açúcar residual, e nos ciclos 1, 2 e 3 os valores foram 5,03 % 4,87 % e 4,76 %. A viabilidade ao final de cada ciclo variou de 90 – 98,45 %, a concentração celular em todos os ciclos apresentou valores similares (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação das medidas dos parâmetros do processo: concentração celular, viabilidade e ART. Fermentação de 5 ciclos sucessivos à 40 °C, utilizando ART de 20 % no melaço e alimentação com fluxo de 0,39 mL/ min durante 3 h, como inóculo o creme de levedura industrial e levedura IQAr/45-1 (3:1) em uma concentração de 1×10^8 cel/ mL com tempo de fermentação de 10 horas, sendo: (■) ciclo 1; (●) ciclo 2; (▲) ciclo 3; (▼) ciclo 4; (◆) ciclo 5.



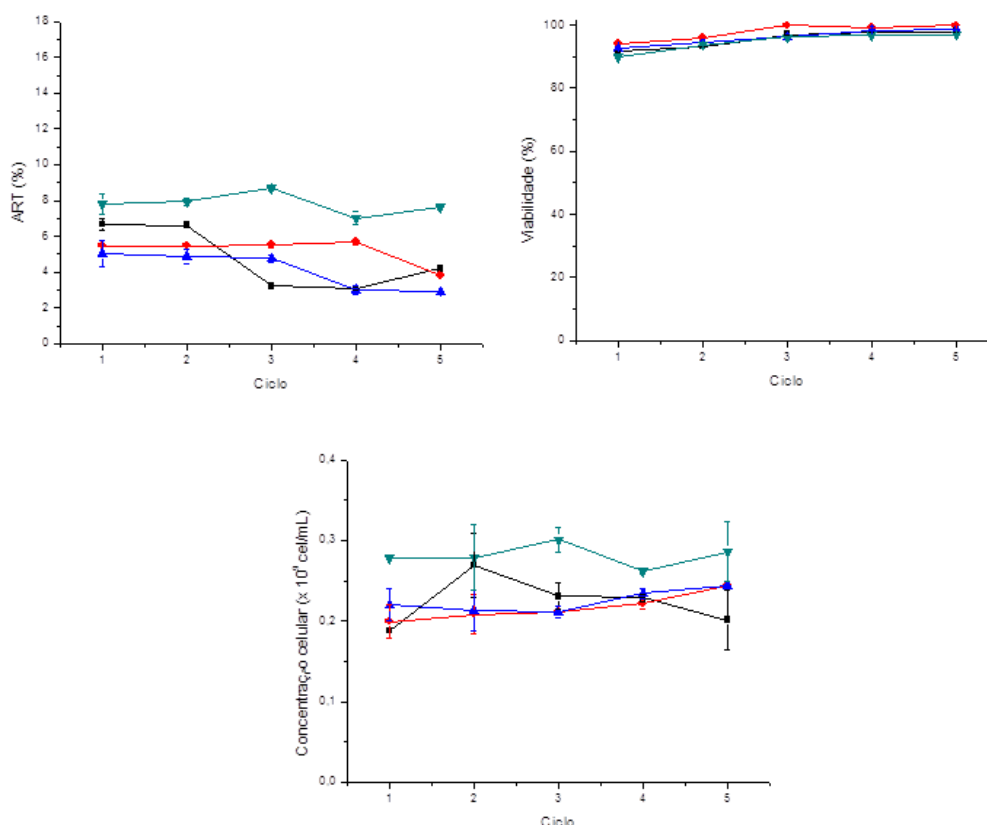
Fonte: Elaborado pela autora

5.7 Comparação entre fermentações utilizando creme de levedura como inóculo e co-fermentação (creme de levedura industrial com adição da levedura IQAr/45-1)

Foram comparados todos os experimentos com 5 ciclos de fermentação (Figura 17). Quando utilizando como inóculo o creme de levedura industrial observou-se que a 40 °C obteve um baixo consumo dos açúcares e um crescimento maior do que os outros experimentos. Quando se adicionou a levedura IQAr/45-1, observou-se um aumento no consumo de açúcar, sendo $3,01 \pm 0,275$ % e $2,89 \pm 0,0371$ % o açúcar residual nos ciclos 4 e 5. Um menor crescimento celular foi observado. Nas duas fermentações iniciadas a 35 °C com creme de levedura industrial como inóculo, houve um pequeno consumo de açúcar apresentando

valores 6,6 % de ART residual, nos ciclos 3, 4 e 5 o ART residual foi $3,21 \pm 0,116$ %, $3,07 \pm 0,065$ % e $4,21 \pm 0,041$ % respectivamente, este comportamento deve-se a possível adaptação das leveduras ao processo. Quando adicionado a IQAr/45-1 no ciclo 1 e 5 houve um maior consumo do açúcar ($3,75 \pm 0,179$ % e $3,83 \pm 0,057$ %), que nos ciclos 2, 3 e 4 onde ART residual médio foi de 5,56 %. Uma baixa concentração celular quando adicionada a levedura IQAr/45-1 foi observada em todos os ciclos.

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



Fonte: Elaborado pela autora

A levedura IQAr/45-1 quando adicionada ao creme de levedura e fermentada a 40 °C, apresentou melhor consumo de açúcar no processo, podendo assim dizer que esta levedura IQAr/45-1 apresenta características termotolerantes como já descrito por Souza et al. (2007). Quando associada com leveduras *Saccharomyces*,

não – *Saccharomyces* e bactérias presentes no creme de levedura melhorou o desempenho do processo.

O presente trabalho usou como resposta os dados baseados no consumo dos açúcares presentes no substrato utilizado, sabendo que as leveduras apresentam diferentes rotas metabólicas e que possivelmente parte do substrato tenha sido utilizado para produção de subprodutos, entre eles glicerol e alguns ácidos orgânicos (BASSO et al., 2008 e ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011). Porém as condições utilizadas nos experimentos são consideradas favoráveis a produção de etanol (ARGUESSO et al., 2010; OLIVA NETO et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN C. P. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. London: Elsevier, 2011. v. 1, chap. 3, p. 21-44.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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