**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Respostas fisiológicas e tecnológicas de linhagens industriais às
condições estressantes da fermentação etanólica industrial**

Ricardo Luiz Dalia

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2017**

Ricardo Luiz Dalia
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Respostas fisiológicas e tecnológicas de linhagens industriais às condições estressantes da
fermentação etanólica industrial**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Dalia, Ricardo Luiz

Respostas fisiológicas e tecnológicas de linhagens industriais às condições estressantes da fermentação etanólica industrial / Ricardo Luiz Dalia. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

84 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. *Lactobacillus* 3. Fermentação 4. Etanol I.
Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço meus pais por tudo que me proporcionaram e sacrificaram por mim. Por todo amor que me deram sou muito grato. Também agradeço a toda minha família especialmente meu tio Beto, minhas avós Hilda e Dalva e meu primo Roberto.

Agradeço ao meu orientador professor Luiz Carlos Basso que me deu essa oportunidade, permitindo que eu trabalhasse e com isso descobrir um ramo que tanto adoro na biologia. Agradeço as ajudas, as correções e peço desculpas por todo o trabalho e dor de cabeça que causei. Sempre vou saber onde estão as coisas no laboratório caso exista qualquer dúvida. Ao Cometa, o melhor técnico e companheiro de laboratório que existe, tudo de melhor e mais incrível.

Também sou muito grato por todos os meus colegas de laboratório Osni, Renata, Cris, Thalita, Camila, Elizângela, Mariane e Carol por toda ajuda e tempos bons. Um agradecimento especial ao Tavinho, Reinaldo e a Mariana por terem sido estagiários incríveis, que aprenderam absolutamente tudo que sabem hoje através de mim, além de terem me ajudado muito, sempre com disposição e bom humor em todos os momentos, meus agradecimentos sinceros a vocês.

Um grande abraço aos colegas do laboratório ao lado: Carlos, Felipe, João, Antoine, Fred, Airton, Raphael, Geraldo e Matheus pela loucura e ao “empréstimo” de material que os orientadores nunca perceberam.

Ao meu bom amigo Danilo, um grande abraço por toda a paciência e pela indicação do orientador, que ajudou muito na minha vida acadêmica além da amizade. Ao Rafael que eu ensinei a jogar Dota, a Austrália nos espera. A minha irmã Ju, por sempre comer a minha comida e me fazer passar vergonha em público, te amo demônio. Agradeço também aos amigos que são a minha família Piko e toda a família, Nathaniel, Helfer, Mondis, Naiara, Rod, Kadu e a todos outros amigos meus, por compartilharem dessa vida comigo.

Por último agradeço a todos que ficaram de fora, não por não merecerem, mas simplesmente pela minha falta de memória nesse momento.

Também agradeço você, que está lendo isso, talvez eu não saiba quem você é ou por que está lendo essas palavras e as próximas, mas você tem meus agradecimentos.

Obrigado.

Sometimes science is more art than science, Morty. A lot of people don't get that.

Algumas vezes a ciência é muito mais arte que ciência, Morty. Muitas pessoas não entendem
isso.

Rick

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 – INTRODUÇÃO.....	11
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 – A Cana-de-açúcar	13
2.2 – Biocombustíveis.....	14
2.3 – Fermentação etanólica de primeira geração no Brasil	15
2.4 – Aspectos biológicos da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	188
2.5 – <i>Lactobacillus</i>	19
2.6 – Trealose.....	21
2.7 – Avaliação de linhagens de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para a fermentação com reciclo, segundo o processo brasileiro	22
3 – OBJETIVOS	25
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 – Material biológico.....	27
4.2 – Meios de cultura.....	27
4.3 – Isolamento das linhagens de leveduras	28
4.4 – Isolamento das linhagens de bactérias presentes no mosto e vinho bruto	29
4.5 – Propagação das linhagens	29
4.6 – Estimativa de viabilidade e contagem celular.....	29
4.7 – Cariotipagem.....	30
4.8 – Protocolo de avaliação das linhagens mediante ensaio de fermentação com reciclo de células	30
4.9 – Determinação de biomassa	322
4.10 – Determinação do etanol na amostra.....	32
4.11 – Extração e quantificação da trealose.....	334
4.12 – Quantificação de glicerol e açúcares residuais	344
4.13 – Quantificação de ácidos orgânicos.....	344
4.14 – Análises estatística.....	354
4.15 – Local de experimentação e análise	355

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1 – Cariotipagem	37
5.2 – Reciclo celular e teste de tolerância	38
5.3 – Trealose	55
6 – CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS & DADOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cana-de-açúcar cortada manualmente, sem pré-queima da plantação.....	13
Figura 2 – Fluxograma de batelada alimentada com reciclo de celular (Melle Boinot)	16
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura de <i>S. cerevisiae</i> durante o brotamento. Evidências na levedura mãe (direita) de cicatrizes de outros três brotamentos	18
Figura 4 – Microscopia eletrônica de <i>Lactobacillus casei</i> , evidenciando a forma de bastonete e escala para tamanho.	20
Figura 5 – Estrutura da molécula de trealose.	21
Figura 6 – Fluxograma exemplificando o protocolo de avaliação.....	33
Figura 7 – Perfis eletroforéticos de colônias das culturas de leveduras utilizadas nos experimentos, tipificando cada linhagem e ainda mostrando rearranjos cromossômicos da PE-2 (perfis 4 e 5 versus perfis 6 e 7), da JP-1 (8 e 10 versus 9 e 11) e da ST-1 (perfis 12, 14 e 15 versus perfil 13).....	38
Figura 8 – Concentração final de etanol (% v/v) durante os 20 ciclos fermentativos, evidenciando as linhagens utilizadas e as diferentes concentrações de açúcar nos substratos.	40
Figura 9 – Evolução da biomassa (g) das linhagens ao longo de 20 reciclos fermentativos....	41
Figura 10 – Evolução da viabilidade das linhagens ao longo de 20 reciclos fermentativos	42
Figura 11 – Evolução do brotamento (%) das linhagens ao longo de 20 reciclos fermentativos	45
Figura 12 – Contagem de bactérias (celulas/ml x 10 ⁷) ao longo de 20 reciclos fermentativos, utilizando diferentes linhagens de leveduras e evidenciando a contaminação proposital com bactérias provenientes de melaço e meio industrial	46
Figura 13 – Produção de glicerol (g/100) das linhagens ao longo de 20 reciclos fermentativos	48
Figura 14 – Concentração de ácido láctico (g/L) no meio fermentado ao longo de 20 reciclos fermentativos	49
Figura 15 – Concentração de ácido acético (g/L) no meio fermentado ao longo de 20 reciclos fermentativos	50
Figura 16 – Rendimento fermentativo (%) das linhagens ao longo de 20 reciclos fermentativos	51
Figura 17 – Açúcar residual (%) no meio fermentado ao longo de 20 reciclos fermentativos	52
Figura 18 – Concentrações de trealose (%DW) nas linhagens de levedura durante 20 ciclos fermentativos	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros dos mostos utilizado nos ciclos fermentativos	32
Tabela 2 – Açúcar desviado (em percentagem de açúcar fornecido) para a formação de glicerol, ácido lático e ácido acético pelas linhagens de levedura durante o reciclo de células. Valores obtidos da média das réplicas e com erro padrão ($\pm$)	54

RESUMO

Respostas fisiológicas e tecnológicas de linhagens industriais às condições estressantes da fermentação etanólica industrial

O etanol se consagrou como o principal biocombustível e o Brasil detém o processo mais econômico e ambientalmente adequando. O processo industrial brasileiro é único, pois utiliza o reciclo de células de leveduras na fermentação permitindo uma ótima velocidade de fermentação, porém o mesmo ato potencializa os efeitos tóxicos presentes no processo. O substrato de fermentação é composto pela mistura de caldo e melaço de cana-de-açúcar, porém a vantagem econômica do açúcar sobre o etanol faz com que o caldo seja priorizado para a produção de açúcar e o seu subproduto seja mais utilizado na fermentação, nesse caso o melaço. O melaço apresenta diversos compostos inibitórios como sulfitos, excesso de sais, fenóis, furfurais e metais. Devido à larga escala do processo, o substrato não pode ser esterilizado antes da fermentação, logo a presença de microrganismos contaminantes se torna um problema sempre presente. As bactérias contaminantes consomem o substrato e produzem substâncias tóxicas como ácidos orgânicos, fatos que prejudicam o rendimento fermentativo do processo. Quando se considera o longo período de ciclos (aproximadamente 250 dias por safra e pelo menos 2 ciclos por dia) a maioria das linhagens de leveduras empregadas não são capazes de perdurar no processo, seja pela toxicidade do processo e ou pela competição com contaminantes. Portanto há um esforço contínuo no sentido de se buscar novas linhagens mais aptas ao processo industrial. Para tal é imperiosa a disponibilidade de uma metodologia para simular o processo industrial de modo a permitir uma avaliação de pretensas linhagens quanto ao seu desempenho no processo industrial com reciclo de células. No presente trabalho é proposto um protocolo, simulando as várias condições estressantes de uma fermentação industrial com reutilização de células, para a avaliação de linhagens de levedura com diferentes capacidades de colonizarem as dornas de fermentação. Os resultados obtidos mostraram que o protocolo empregado foi capaz de reproduzir o comportamento fisiológico e tecnológico das linhagens quando submetidas no processo industrial, se constituindo numa ferramenta útil para a seleção de leveduras.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus*; Fermentação; Etanol

ABSTRACT

Physiological and technological responses of industrial strains towards stressing conditions of industrial ethanol fermentation

The ethanol became entrenched as the main biofuel and Brazil owns the most economic and environmentally appropriate process. The Brazilian industrial process is unique, since it utilizes the yeast cell recycle, what allows a great fermentation velocity, but the same process enhances the toxics effects presents on the process. The fermentation substrate is composed by the mixture of sugar cane juice and molasses, however the economic advantages of the sugar over the ethanol makes that the juice get prioritized to the production of sugar and it's by-product, the molasses, go into the fermentation process. The molasses contain several toxic compounds, like sulfites, salts excess, phenols, furfural and metals. Due to the large scale of the process, the substrate cannot be sterilized before the fermentation and this cause the presence of contaminant microorganisms an always present problem. The contaminant bacteria consumes the substrate and produce toxics products like organic acids, facts that can hinder the yield of the fermentation process. When the long recycle period (approximately 250 days per season, with at least 2 cycles per day) is take in consideration, most of the yeast strains aren't capable to endure the process because of the toxicity of it and or by the competition with the contaminants. Therefore there is a continuous effort in the search of new strains best suited for the industrial process. To do so, it's imperative the availability of a methodology that can simulate the industrial process and the alleged strains can be evaluated in terms of their performance in the industrial process with cell recycle. It's proposed a protocol on this work, that simulates several stressful conditions of an industrial fermentation with cell recycle, to evaluate the yeast strains with different capabilities in colonize the fermentation tanks. The results indicate that the protocol utilized was capable of reproduce the physiological and technological behavior of the strains when they were submitted to the industrial process, making it a useful tool for yeast selection.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus*; Fermentation; Ethanol

1 – INTRODUÇÃO

A cada dia que passa, são mais evidentes e marcantes os efeitos do aquecimento global causado pelo efeito estufa. Combustíveis fósseis são considerados um dos grandes responsáveis pelo efeito estufa e pela poluição local de onde são utilizados (RIBEIRO et al., 2000), o que se torna uma questão muito complicada quando se considera que tais combustíveis são os mais utilizados para geração de energia. Uma mudança, parcial ou total da matriz energética se faz necessária.

Como substituto viável aos combustíveis fósseis, os biocombustíveis têm se mostrado a melhor opção. Para um biocombustível ser um substituto aos de origem fóssil, ele deve apresentar uma série de características (HILL et al., 2006):

- se mostrar melhor para ao meio ambiente que os fósseis,
- ser economicamente competitivo,
- de produção suficiente para suprir a demanda,
- ter balanço energético positivo com relação a sua produção.

Quando a tecnologia se mostrou capaz de suprir, mesmo que em parte, a demanda por combustíveis, uma nova importância foi dada aos biocombustíveis, mitigar a liberação dos gases do efeito estufa. Como a necessidade de veículos automotores não diminuiu, mas pelo contrário só tem aumentado, a saída para diminuir a emissão de gases poluentes é a utilização de combustíveis que tiveram a sua origem, em parte, do CO₂ atmosférico, pois as plantas utilizam o CO₂ para produzir açúcares. Embora biocombustíveis tenham vindo do CO₂ atmosférico, eles ainda liberam outros gases como metano e óxido nitroso, porém em comparação aos dos combustíveis fósseis o dano ao meio ambiente é mitigado.

O balanço energético se torna um fator muito importante para o avanço da produção dos biocombustíveis. Pesquisas mais antigas mostram um baixo balanço energético da cana-de-açúcar, chegando quase que gerar tanta energia quanto consome para ser produzido (PIMENTEL et al., 1988; PIMENTEL e PATZEK, 2008; OLIVEIRA, VAUGHAN e RYKIEL, 2005; OLIVEIRA 2008), o que tornaria inviável ou desnecessário o seu uso. Porém como apontado por Pacheco (2011) esses valores não se mostram mais verdadeiros, pois não consideraram o uso da palha e do bagaço da cana-de-açúcar como fonte de energia nas usinas e por usarem valores e dados ultrapassados nos cálculos.

A principal matéria prima para o biocombustível brasileiro é a cana-de-açúcar, sendo o Brasil é o maior produtor a mesma do mundo, e a previsão da safra 2017/2018 é de 647,6

milhões de toneladas, uma queda de 1,3% em relação a safra anterior. A produção de cana-de-açúcar da Região Centro-Sul está estimada em 592,7 milhões de toneladas, 3% maior que a produção da safra anterior. A Região Norte/Nordeste deverá ter um aumento de 4,3%, passando de 59,4 milhões de toneladas na safra 2014/15, para 61,9 milhões na safra 2015/16. (CONAB, 2015).

Os aumentos na produção da matéria prima não tem se mostrado suficientes para suprir o consumo do mercado interno. O crescimento do consumo não tem sido acompanhado pelo crescimento da produtividade (MILANEZ et al., 2012) Caso fosse possível suprir com novas plantações, a produção de alimentos no Brasil seria afetada ou então acarretaria na necessidade de desmatamento de mata nativa. A seleção de leveduras adequadas à fermentação industrial se constitui em possibilidade de se aumentar a produção e reduzir os custos de produção de etanol.

A principal levedura utilizada na fermentação é a *Saccharomyces cerevisiae*, já consolidada na produção de etanol de primeira geração com o caldo da cana-de-açúcar, porém o uso de melaço apresenta novos desafios. O melaço de cana-de-açúcar apresenta naturalmente inibidores que podem afetar a fermentação (BASSO, 2015). Além dos inibidores, a presença de bactérias contaminantes na dorna de fermentação gera subprodutos inibitórios, além de competição pelo substrato. É costumeiro iniciar a safra com mais de uma linhagem de levedura na dorna, porém essas acabam apresentando uma sucessão natural. Ao longo da safra as linhagens vão desaparecendo da dorna, de acordo com as suas capacidades de sobreviver aos estresses da fermentação.

Tendo esses fatos em vista, se mostra necessário uma melhor adaptação da levedura ao substrato produzido a partir de melaço de cana-de-açúcar. A seleção de leveduras com melhores capacidades de competição com bactérias contaminantes também deveria ser considerada.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – A Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi descrita a primeira vez por Linneu em 1753. Ela é um dos primeiros cultivos implantados no Brasil, tendo sido trazido em 1502, por Martim Afonso de Souza, proveniente da Ilha da Madeira (PARANHOS, 2006; CESNIK, 2007). A cana-de-açúcar (Figura 1) foi trazida pelos portugueses para o cultivo e a futura fabricação de açúcar, pois esse tinha alto valor econômico na época.

Atualmente a cana-de-açúcar representa quase que 10% da produção agrícola brasileira (em área de cultivo) e como o etanol é produzido próximo a região de plantio, a área com maior produção também se destaca como a maior produtora de etanol, nesse caso a

região Centro Sul - Sudeste, com mais de 85% da produção de etanol (BNDES, 2008).

Figura 1 – Cana-de-açúcar cortada manualmente, sem pré-queima da plantação.

A cana-de-açúcar é de origem asiática e o clima do local é semelhante ao do Brasil. É uma gramínea de grande porte, chegando a ter 3 metros de altura. Apresenta nós e entre-nós salientes, casca lisa e cerosa. As folhas, com até 1,5 metro de comprimento, cerca de 6 centímetros de largura e com disposição dística, nascem dos nós do caule, possuem a bainha

que envolve os entre nós e têm uma nervura central distinta, saliente na parte inferior. Um dos motivos para o uso da cana-de-açúcar para produção de açúcar e atualmente etanol é devido a sua alta taxa de conversão fotossintética (GARCILASSO et al., 2012).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produto de etanol do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos da América, sendo a maior parte da produção desse, é feita a partir do milho e a do Brasil da cana-de-açúcar.

Um dos motivos para o balanço energético favorável do etanol da cana-de-açúcar é a grande quantidade de bagaço gerado após a moagem e extração do caldo da planta (REZENDE et al., 2011). O bagaço já é utilizado nas usinas como combustível para as caldeiras, gerando energia elétrica e vapor. Isso faz com que as usinas sejam quase ou completamente autossustentáveis em energia elétrica e o excedente energético é vendido, atingindo altos valores nos últimos anos de crise hídrica e energética. As safras têm gerado mais de 200 milhões de toneladas de bagaço por ano no Brasil (ROCHA, et al., 2012). Em média o bagaço é composto por 44% de celulose, 25% de hemicelulose, 20% lignina e outras substâncias em pequenas quantidades (PEREIRA et al., 2012).

2.2 – Biocombustíveis

Como forma de mitigar o uso e eventualmente substituir por total o uso de combustíveis fósseis como carvão mineral, petróleo ou gás natural (MARTÍNEZ et al., 2012), biocombustíveis foram e ainda estão sendo desenvolvidos. Os dois principais do Brasil são o biodiesel e o etanol combustível. Um dos grandes motivadores para o uso de biocombustíveis é a redução da emissão de gases do efeito estufa, principalmente o CO₂, em comparação aos combustíveis fósseis (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999).

A legislação brasileira obriga que parte do diesel vendido seja biosiesel, mas o mesmo apresenta dois problemas que inviabiliza o seu uso em escalas maiores do que as atuais. A primeira é o relacionado ao elevado custo e a segunda é a necessidade de uso de produtos alimentícios para a produção do combustível (ROLLANO et al., 2015), gerando uma competição desvantajosa para o país. Já o etanol, possui uma participação maior e mais consolidada no mercado brasileiro.

Atualmente no país, a maior parte do etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar, uma cultura muito difundida na região da região. O Brasil passou a incentivar a produção do etanol a partir de 1975 com o programa “Proálcool” (SHIKIDA & BACHA, 1999), devido a grande flutuação do preço do petróleo ocorrido graças a Guerra do Yom Kippur e o apoio dos

Estados Unidos da América à Israel. O etanol visava substituir parte do consumo de petróleo e seus derivados, além de diminuir as emissões dos gases de efeito estufa e melhorando a qualidade do ar (MASIERO & LOPES, 2008). O álcool etílico apresenta forma molecular de C_2H_6O , embora não seja a forma mais simples de álcool (metanol) essa se apresenta como a mais abundante no mundo.

A produção atual de etanol no Brasil chegou a um impasse. A necessidade de aumento de produção existe, mas sem utilizar áreas novas ou substituir as de cultivos alimentícios. Para contornar esse problema é preciso o incentivo para as pesquisas e adoção de novas tecnologias (ROSA & GARCIA, 2009). Um fato pouco divulgado da produção de etanol brasileira é que a mesma gera proteína para a alimentação, aproximadamente 20g por cada litro de etanol produzido. Essa ação ajuda a mitigar os custos da produção de etanol.

2.3 – Fermentação etanólica de primeira geração no Brasil

O etanol pode ser produzido a partir de vários substratos diferente, desde que esses, apresentem quantidades de açúcares ou de amido suficientes (BNDES; CGEE, 2008). Vários microrganismos podem realizar a fermentação etanólica, mas somente alguns apresentam interesse econômico. Entre os organismos, as leveduras se mostram um dos tipos mais interessantes, pois são eucariotos, unicelulares, de tamanho interessante e de já possuem linhagens excelentes em fermentação. Das leveduras a que mais se destaca *S. cerevisiae*, sendo essa utilizada como fermento para panificações, produção de etanol e vários outros usos (CARVALHO et al., 2006).

A fermentação (catabolismo anaeróbico) é a forma de conversão de energia química numa forma utilizável pela levedura quando está presente em um ambiente anaeróbico, causando principalmente a produção de etanol, CO_2 e ATP (VOLPE, 1997). Outras substâncias como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeído, acetoina e butilenoglicol também são produzidas, embora em concentrações menores (DE SOUSA & MONTEIRO, 2011).

Normalmente em condições aeróbicas a levedura se faz uso da respiração aeróbica que é mais rentável em questão de ATP para célula, mas quando as concentrações de açúcares do meio se encontram muito elevadas ocorre o Efeito “Crabtree”. Esse efeito consiste na fermentação mesmo em condições aeróbicas, causado pela concentração elevada de açúcares, produzindo etanol (NEVES, 2003). Esse é considerado um dos fenômenos mais importantes

presentes no processo industrial de *S. cerevisiae*, principalmente para a produção de biomassa e etanol (PRONK et al., 1996).

Figura 2 – Fluxograma de batelada alimentada com reciclo de celular (Melle Boinot). Fonte: Fermentec.

Devido aos custos de produção e de serem fabricados com a mesma matéria prima, a indústria de etanol e açúcar se encontram, muitas vezes, juntas. A escolha de priorizar a produção de etanol ou de açúcar de acordo com os custos do mercado consumidor garante as usinas uma maior flexibilidade de negócios.

O melaço utilizado na fermentação etanólica é um subproduto da produção de açúcar. A água no caldo de cana-de-açúcar é lentamente evaporada, formando assim cristais de açúcar, mas ao longo da evaporação a taxa de cristalização torna-se mais baixa até atingir um ponto em que não se pode mais cristalizar a sacarose a uma dada temperatura (TOSSETTO, 2008). Quando não se torna mais possível cristalizar a sacarose, o melaço é denominado como esgotado, aí é utilizado para a produção de etanol ou vendido como substrato, alimento animal ou consumo humano.

A solução de caldo de cana-de-açúcar e ou melaço que vai ser fermentada é denominada de mosto e resultante da fermentação do mosto é chamado de vinho. No Brasil o

método mais utilizado de fermentação é o de batelada alimentada com reciclo de células, também chamado de método de “Melle Boinot” (BRETHAUER & WYMAN, 2010). Normalmente o processo de fermentação demora 8 horas, porém pode chegar a demorar até mais de 10 horas no começo da safra, antes que a biomassa tenha atingido seu volume ideal de processamento.

O vinho é centrifugado para a retirada da levedura (delevurado). Parte do fermento retirado será reutilizado na próxima fermentação e parte será desidratado e vendido como suplemento alimentar ou ração animal (JÚNIOR, 2012). O vinho delevurado apresenta de 8% a 14% de etanol, sendo que este passará ainda por duas colunas de destilação até chegar a 96% de etanol.

Após a centrifugação do vinho nas usinas, o etanol é destilado da solução e o que sobra é chamado de vinhaça. A vinhaça normalmente é utilizada como fertilizante nos campos, porém ela pode ser utilizada em biorreatores para a produção de biogás de forma eficiente (ALMANÇA, 1994) e suplementar ainda mais a produção de energia elétrica. Em média são produzidos 12 litros de vinhaça para cada litro de álcool (AMORIM & LOPES, 2013).

A maior parte do creme de levedura será reutilizado no próximo ciclo fermentativo, porém antes disso ele deve ser tratado com ácido sulfúrico para diminuir a contaminação bacteriana presente (SOUZA & MUTTON, 2004). A massa de levedura recebe o volume de 1:1 de água então o ácido é adicionado até o pH atingir entre 2,5 e 1,8.

Diversos fatores podem afetar a fermentação na usina, entre eles temos a temperatura, o pH, contaminação bacteriana, aeração/agitação, nutrientes, e o etanol (DE SOUSA & MONTEIRO, 2011), por isso os procedimentos na usina devem ser controlados com muito cuidado ou toda a operação sofrerá riscos.

A constituição do mosto afeta em muito as condições de fermentação, podendo promover ou inibir. Normalmente o melaço ou o caldo possuem todos os nutrientes necessários para a fermentação como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em pequenas quantidades (LIMA et al., 2001).

Normalmente o processo fermentativo apresenta vários fatores estressantes para a levedura, como a presença de etanol, alta pressão osmótica, presença de leveduras contaminantes e bactérias (consomem o meio e geram subprodutos tóxicos), inibidores naturais presentes no melaço, variações de pH e temperatura. Quando se acrescenta o uso de

reciclo celular a fermentação, os estresses são intensificados (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.4 – Aspectos biológicos da *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo mais utilizado para a produção de etanol (KUYPER et al., 2005), devido a sua excelência na fermentação. Leveduras selecionadas são responsáveis pela produção de cerca de 70% de todo o álcool produzido no país. O organismo foi primeiro isolado e descrito por Emil Mraek em 1938, de figos podres.

Por ser uma levedura, a *S. cerevisiae* é um organismo unicelular, com forma oval ou esférica. Apresenta parede celular composta de polissacarídeos, o que concede uma proteção física contra o meio, além de maior estabilidade no transporte de nutrientes e osmótica (MAGNANI & CASTRO-GÓMEZ, 2008). Ela apresenta duas formas de reprodução: brotamento (forma assexuada) e esporulação (forma sexuada) (PRETORIUS; WESTHUIZEN, 1991). Brotamento é a forma de reprodução mais comum, sendo esse um crescimento vegetativo, com a presença da célula mãe e filha. A célula filha cresce a partir da mãe, resultando em uma célula completa com próprio núcleo, parede celular. Já os tamanhos e características morfológicas podem variar entre estirpes e entre células haplóides e diplóides

(EIRIZ, 2007). Uma das características que garante uma melhor adaptação e multiplicação no meio ao organismo é a sua capacidade de esporular, gerando diversidade em seus descendentes.

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura de *S. cerevisiae* durante o brotamento. Evidências na levedura mãe (direita) de cicatrizes de outros três brotamentos. Fonte: <http://pax-db.org/images/species/4932.jpg>

Como reserva energética, a levedura se utiliza de glicogênio e da trealose (ALCARDE & BASSO, 1997). Existem trabalhos que associam aumento de tolerância ao estresse com aumento na concentração de trealose no interior da levedura (D'AMORE et al., 1991; WALKER, 1998), mantendo a integridade estrutural da membrana plasmática (WIEMKEN, 1990, SINGER & LINDQUISTINGER, 1998).

O crescimento celular, a multiplicação do organismo e a eficiência na fermentação são altamente influenciados pelo meio em que crescem as leveduras (SANTOS, 2008), normalmente o melaço apresenta todos só nutrientes e vitaminas necessários. A principal fonte de carbono utilizada é a glicose, mas pode utilizar outras hexoses. Já as pentoses não são fermentadas pela *S. cerevisiae*.

Devido ao seu fácil cultivo, seu amplo uso na indústria, rápido crescimento e multiplicação, a *S. cerevisiae* é um dos organismos com maior número de estudos sobre sua genética, fisiologia e metabolismo, mesmo que essa possua uma complexidade maior quando comparada as bactérias (SCHNEITER, 2004). Como já citado a *S. cerevisiae* é capaz de mudança de metabolismo, consumindo ou não oxigênio dependendo das condições em que se encontra.

As linhagens utilizadas hoje na indústria e nas casas das pessoas, não são as mesmas que foram descobertas em 1938. Com o passar dos anos, linhagens novas foram sendo desenvolvidas com o uso em meios selecionados e específicos, linhagens as quais apresentam maior resistência a pressões osmóticas, teores de álcool, valores de pH e certo inibidores. Algumas ganharam destaque como PE-2, SA-1, CAT-1 e BG-1 (AMORIM & LOPES, 2013).

2.5 – *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é um dos mais comuns e abundantes dentre as bactérias, sendo o mais importante entre as bactérias ácido-láticas (NUNES, 2016), apresentando mais de 150 espécies descritas e de catalase negativa. As bactérias do gênero apresentam caráter Gram-positivo, não esporuladas e com forma de bastonetes ou cocobacilos (FUGELSANG e EDWARDS, 2007). Tais bactérias apresentam metabolismo anaeróbio, sendo tanto homofermentativas quanto heterofermentativas (LEE et al., 2009). A primeira espécie do

gênero isolada ocorreu em 1900, das fezes de infantes amamentados com leite materno, a espécie foi nomeada como *Bacillus acidophillus* na época ((BADARÓ et al., 2008).

Figura 4 – Microscopia eletrônica de *Lactobacillus casei*, evidenciando a forma de bastonete e escala para tamanho. Fonte: <http://buffalobeerbiochemist.com/wp-content/uploads/2015/06/Lactobacillus-casei.jpg>

Os membros do gênero apresentam metabolismo estritamente fermentativo sendo o ácido láctico o principal metabólito produzido, alta tolerância a ácidos e baixo pH (ROBINSON, 1991; JAY, 1996). Tais bactérias podem ser facilmente encontradas na natureza e no trato intestinal, genital oral e pele dos seres humanos e outros animais (SILVA, 2016). É reconhecido que várias espécies do gênero são seguras para consumo humano (LEE e SALMINEN, 1995) não apresentando patogenicidade, nem capacidade de transmitir fatores de resistência a outras bactérias (LEE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012) e na indústria são amplamente utilizados na fabricação de queijos, iogurtes, bebidas lácteas (FELIS e DELLAGLIO, 2007).

As características fermentativas dos *Lactobacillus* podem ser agrupadas em três grupos: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios (VIEGAS, 2008).

- **homofermentativos obrigatórios:** realizam a fermentação de hexoses gerando ácido láctico como subproduto. Incapazes de consumir pentoses.
- **heterofermentativos facultativos:** realizam a fermentação de hexoses gerando ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e etanol. Capazes de consumir pentoses em ácido láctico e ácido acético.
- **heterofermentativas obrigatórios:** realizam a fermentação de hexoses gerando ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂. Capazes de consumir pentoses em ácido láctico e ácido acético. (JAY, 1996; VANDAME et al. 1996)

Devido a grande presença de *Lactobacillus* na natureza, os mesmos se tornam contaminantes importantes, principalmente na indústria. Tais bactérias costumemente competem com os microrganismo de interesse, consumindo o meio, gerando subprodutos indesejados e até mesmo tóxicos. O rendimento da indústria é afetado pela contaminação, aumentando o custo de produção. Os *Lactobacillus* são comumente achados na dorna de fermentação, porém no mosto o mais comum é o *Leuconostoc*, sendo que esse tende a diminuir a sua presença ou completamente sumir ao final dos ciclos fermentativos.

2.6 – Trealose

A Trealose é um açúcar não redutor muito presente nas células de fungos e plantas. Foi identificado por Wiggers (1832), sendo um dissacarídeo solúvel, composto por monômeros de glicose (α -D-glicopiranosil-[1,1]- α -D-glicopiranosídeo) (QUEIROZ, 2006).

Figura 5 – Estrutura da molécula de trealose.

Inicialmente a trealose foi considerada uma molécula como reserva energética, como o glicogênio, devido a sua composição, porém, há vários anos a molécula tem sido associada à proteção e manutenção celular das leveduras durante processos de estresse (ALCARDE & BASSO, 1997). Diversas citações descrevem processos de proteção promovidos pela trealose, manutenção da viabilidade das leveduras (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961; THEVELEIN, 1984; VAN LAERE, 1989; WIEMKEN, 1990), sobrevivência da célula em períodos de jejum (LILLIE & PRINGLE, 1980), elementos tóxicos (ATTFIELD, 1987), altas temperaturas (De VIRGILIO et al., 1994, LEWIS et al., 1995), estresse hídrico (GADD et al., 1987; HOTTIGER et al., 1987; D'AMORE et al., 1991) e congelamento (LEWIS et al., 1987; D'AMORE et al., 1991).

A trealose promove a integridade da membrana celular, mantendo a fluidez e evitando a passagem indevida pela membrana, fato importante em ambientes de estresse hídrico (CROWE et al., 1984). Segundo Alcarde e Basso (1997) a trealose só é acumulada pela levedura quando a fonte de carbono consumível pela levedura se encontra quase inexistente e que o acúmulo de trealose se dá em períodos de queda o crescimento.

2.7 – Avaliação de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação com reciclo, segundo o processo brasileiro

A necessidade de novas linhagens tem levado à várias pesquisas pretendendo a seleção de leveduras que pudessem ser introduzidas no processo industrial. No início da década de 90 as linhagens PE-2, CAT-1, BG-1 se destacaram como as melhores segundo as suas capacidades de implantação nos processos de várias destilarias. Ao contrário, linhagens tradicionalmente empregadas como as linhagens de panificação, se apresentavam com baixa capacidade de colonizar as dornas no transcorrer da safra (BASSO et al. 2008).

No entanto, a avaliação de potenciais linhagens em escala de laboratório esbarra na dificuldade de uma metodologia que traduza as condições fisiológicas do processo industrial com reciclo. Portanto, uma metodologia que contemple os mais significativos estresses encontrados na fermentação industrial deve ser considerada (estresses osmótico, etanólico, ácido, térmico, além de outros). Entre tais estresses deverão estar incluídos o tratamento ácido, o teor alcoólico obtido na fermentação industrial, o próprio mosto da destilaria, seu teor de açúcar, tempo de enchimento da dorna e de fermentação, a temperatura, a simulação do pé-de-cuba e respectiva concentração de fermento na centrífuga, e de suma importância, o reciclo de células.

A literatura é escassa em avaliações de diferentes linhagens considerando esta multiplicidade de fatores estressantes presentes na fermentação industrial. Portanto, a seleção de linhagens adequadas à fermentação industrial é muito dependente de uma metodologia que traduza as condições fisiológicas impostas à levedura no processo industrial com reciclo de células.

3 – OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo de fermentação que possa diferenciar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes desempenhos fisiológicos e tecnológicos já observados em fermentações industriais.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Material biológico

Foram utilizadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes taxas de implantação nas destilarias brasileiras, onde o processo de fermentação batelada-alimentada é o mais amplamente empregado. As linhagens de panificação são largamente utilizadas para dar início ao processo, mas completamente substituídas dentro de 20 a 30 dias de processo. Por outro lado a linhagem PE-2 tem mostrado boa taxa de implantação, representando a totalidade da biomassa da dorna no final da safra em várias destilarias (Basso et al., 2008). Outras linhagens industriais igualmente selecionadas a partir da biodiversidade das dornas são igualmente empregadas, como a linhagem JP-1 oriunda de destilaria do Nordeste brasileiro utilizando caldo de cana como substrato (Silva et al., 2005). Esta linhagem tem se mostrado com taxa de implantação inferior à PE-2. Tal fato foi comprovado no presente trabalho onde ambas as linhagens (PE-2 e JP-1), assim como a linhagem de panificação foram utilizadas como iniciadoras numa fermentação industrial. No final da safra observou-se o desaparecimento das linhagens de panificação e JP-1, sendo que a população da amostra de leveduras estava representada por uma linhagem dominante (evidenciada pela cariotipagem). Esta linhagem foi isolada, denominada de ST-1 e igualmente empregada neste experimento. O perfil eletroforético desta linhagem revelou ser um rearranjo cromossômico da linhagem PE-2, portanto a própria PE-2, não se descartando a possibilidade desta variante se apresentar com diferentes atributos fermentativos.

Assim o presente estudo comparativo foi conduzido com linhagem de panificação (Mauri), PE-2, JP-1 e ST-1 (um rearranjo cromossômico da PE-2). As culturas foram reativadas através da inoculação de 100µL da suspensão de leveduras em glicerol em 5 mL de meio de cultura YEPD e incubação a 32° C por 48 horas.

As amostras foram obtidas da coleção do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de leveduras, do Departamento de Ciências Biológicas ESALQ/USP, que são mantidas com glicerol 30% em ultra-freezer a -80°C.

4.2 – Meios de cultura

Meio YEPD líquido:

- 1% de extrato de levedura
- 1% de peptona bacteriológica
- 2% de glicose.

Meio YEPD sólido:

- 1% de extrato de levedura
- 1% de peptona bacteriológica
- 2% de glicose
- 1,5% de ágar.

Meio MRS Caldo:

- 5,5% de MRS Broth (Himedia®).

Meio MRS Ágar:

- 6,7% de MRS Broth (Himedia®)
- 1% (m/v) de actidiona.

Meio para propagação de leveduras:

- Melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada para 10% de ART (açúcares redutores totais).

Meio para propagação de bactérias:

- Melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada para 6% de ART (açúcares redutores totais).
- 2% de peptona bacteriológica
- 1% de extrato de levedura.

4.3 – Isolamento das linhagens de leveduras

Para isolar as linhagens do processo industrial foi escolhido o plaqueamento por esfregação com auxílio de alça de Drigalski. A amostra (vinho bruto) coletada na destilaria, ao final da safra, passou por diluições seriadas com água destilada. Diversas diluições foram então plaqueadas em placas de Petri contendo meio sólido de crescimento YEPD e

antibióticos. A alça foi previamente esterilizada com álcool 70% e flambada em capela de fluxo laminar de perigo biológico.

Das placas que apresentaram colônias isoladas, foram coletadas amostras auxílio de alça estéril e inoculadas, isoladamente, em microtubos contendo 5 ml de meio de crescimento líquido YEPD. As placas e os microtubos com meio líquido, foram mantidas em B.O.D., à 32° C, por 48 horas conforme Basso et al. (2008).

4.4 – Isolamento das linhagens de bactérias presentes no mosto e vinho bruto

Os isolados bacterianos foram obtidos de amostras de mosto e vinho bruto da mesma destilaria de onde se isolou leveduras. Após diluição adequada o material foi plaqueado em MRS (contendo actidiona, 5 ppm), sendo coletadas as colônias isoladas, inoculadas em 5mL de meio MRS líquido e crescidas durante 48 horas a 32° C.

4.5 – Propagação das linhagens

Com o intuito de se gerar a biomassa necessária de leveduras e bactérias para os testes fermentativos, ambas foram propagadas em meios de cultura a base de melaço da própria destilaria.

Os 5 ml de YEPD contendo as leveduras isoladas ou reativadas foram transferidos para 100 ml de meio de propagação até o esgotamento do meio, por 24 horas a 32°C. A seguir o meio teve o volume duplicado a cada 24 horas com meio de melaço com 10% de ART, até biomassa suficiente, que foi coletada por centrifugação em tubos Falcon de 50 mL (20 minutos a 4000 rpm. A propagação das bactérias foi feita da mesma maneira que a das leveduras, porém utilizando meio de propagação contendo MRS.

4.6 – Estimativa de viabilidade e contagem celular

Para se determinar a viabilidade celular das leveduras testadas, foi utilizado o método de microscopia ótica com auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer) e de solução de eritrosina (preparada com a diluição de eritrosina pura em tampão fosfato) para coloração diferencial entre células vivas (sem corar) e células mortas (células com coloração de vermelho para rosa) (ALVES, 1994; BONNEU, 1991). A contagem sempre levou em conta as

células vivas, mortas e os brotos presentes, além de manter uma contagem mínima de 200 células por lamina.

4.7 – Cariotipagem

A cariotipagem necessita de colônias em meio sólido, por isso foram realizados cultivos em meio YEPD ágar por 48 horas a 30°C, em placas de Petri. Os moldes para a confecção de plugs mais a solução de lise CPES (Ácido cítrico 0,210 g; Na₂HPO₄ 0,426 g; EDTA.Na₂ 0,186 g; Sorbitol 5,630 g; Dithiothreitol 0,020 g) contendo “lysing enzymes”, foram preparados em câmara de fluxo. Com arames de ponta curvada, foram coletadas as colônias individualmente e depositadas, cada uma dentro de um poço, no molde de confecção dos plugs. As mesmas foram ressuspensas, na solução de lise, e homogeneizadas rapidamente com o próprio arame utilizado na coleta das colônias, deixando-se solidificar a temperatura ambiente por 30 minutos.

Os plugs foram transferidos para tubos de vidro contendo CPE (Ácido cítrico 1,68 g; Na₂HPO₄ 3,41 g; EDTA.Na₂ 1,49 g) e mantidos por 4 horas a 28°C, adicionando-se a solução 3 contendo proteinase K; os tubos foram tampados com papel alumínio e mantidos em banho-maria por 16 horas a 50°C. Posteriormente foi removida a solução de desproteínização e substituída com 1 mL de EDTA (e lavados 3 vezes por 20 minutos a 50°C e 5 vezes por 5 minutos a temperatura ambiente e uma última lavagem com 1 mL de TE).

Os plugs contendo amostras de DNA íntegro das leveduras foram inseridos nas canaletas do gel de agarose 1,3% (Agarose A-0169 1g; TBE 100 mL) e selados com a mesma agarose. O gel foi transferido para câmara do equipamento Biorad modelo DRIII, contendo o tampão TAFE (Tris 24,2 g; EDTA 2,9 g; Ácido acético 5,0 mL) previamente resfriado a 14°C.

Após o término da corrida, 21 horas, o gel foi removido da câmara e corado com brometo de etídio por aproximadamente 30 minutos, lavado por 10 minutos em solução tampão para retirar o excesso de brometo de etídio do gel e fotografado sob transluminador de luz ultravioleta, para posterior análise do número de bandas. O protocolo foi obtido por Basso et al. 2008.

4.8 – Protocolo de avaliação das linhagens mediante ensaio de fermentação com reciclo de células

Os testes fermentativos com reciclo de células foram concebidos e realizados buscando uma simulação do processo industrial brasileiro. Procurou-se contemplar os vários estresses (térmico, etanólico, ácido, osmótico) além da ação estressante do melaço em elevada proporção no mosto e da contaminação bacteriana.

Para tal foram empregados mostos de melaço da própria destilaria, simulando as concentrações de açúcar, temperatura de fermentação, teor de fermento, tempo de enchimento das dornas e tempo de fermentação. Simulou-se também a concentração de fermento na centrífuga para resultar em “pé-de-cuba” idêntico (em relação ao volume, à concentração de fermento, teor alcoólico). Igualmente importante, buscou-se promover o tratamento ácido do fermento de modo semelhante ao do processo industrial, em relação ao pH (2,5) e tempo de tratamento (1 hora).

A biomassa utilizada foi produzida em anaerobiose usando-se melaço diluído a 10% de ART e recuperada por centrifugação (800xg por 20 minutos). Utilizou-se tubos Falcon cônicos de 50 mL com teores iniciais de 3,7 g de biomassa úmida de cada levedura, com 3 repetições por linhagem. A seguir a biomassa foi suspensa em vinho e água para resultar concentração de fermento, pH e teor alcoólico o mais próximo possível das condições industriais. Desse modo simulou-se a concentração de fermento obtida na centrífuga industrial (cerca de 70% v/v).

Antes da alimentação o “pé-de-cuba” foi tratado com ácido sulfúrico até pH 2,5 e assim mantido durante 1 hora, quando então procedeu-se a alimentação com mosto (com teor de ART pré-determinado). A adição do mosto foi conduzida em 3 parcelas igualmente distribuídas no espaço de 4 horas, sendo que a fermentação foi processada a 32-33 °C, por um período de 10 horas.

Ao final da fermentação (cuja velocidade foi estimada pela diferença de peso do sistema [tubo + biomassa] – perda de CO₂ a cada 2 horas), amostras foram removidas do vinho bruto antes da centrifugação (para análises microbiológicas) em quantidade tal que se promoveu, deliberadamente, uma remoção de 2,5% do fermento. Tal sangria, até o nível de 5% ou mais, ocorre no processo industrial, devido a perdas na centrífuga, descarte do fundo de dorna ou deliberadamente praticada para remoção de células para produção de levedura seca.

Logo após a biomassa foi coletada por centrifugação, pesada e reutilizada numa fermentação subsequente, precedida de tratamento ácido como anteriormente mencionado. Tal procedimento foi repetido perfazendo-se 20 ciclos fermentativos.

Ao final de cada ciclo o vinho delevurado (sem levedura) era analisado quanto aos teores de etanol, pH, densidade, concentrações de glicerol e açúcares residuais (glicose, frutose e sacarose).

No transcorrer dos ciclos fermentativos foram incrementados os teores de ART e proporção de melaço no mosto, assim como cargas bacterianas oriundas tanto de mosto como de vinho bruto (obtidos da própria destilaria). Tal inoculação foi em proporção tal que resultasse em 8×10^7 cels/mL. O objetivo destas alterações foi de elevar a intensidade de estresses que são normalmente observados em fermentações industriais, e observar os impactos sobre as diferentes linhagens.

Tabela 1 – Parâmetros dos mostos utilizado nos ciclos fermentativos.

Ciclos Fermentativos	% de ART Proveniente do Caldo	% de ART Proveniente do Melaço	ART Total do Mosto
1 – 5	50%	50%	18%
6 – 9	0%	100%	16%
10 – 14	0%	100%	25%
15 – 20	0%	100%	21%

4.9 – Determinação de biomassa

Ao final de cada fermentação ou ciclo fermentativos, a levedura era separada do vinho através de centrifugação em frascos Falcon de 50 ml, por 15 minutos a 4000 RPM. Antes da adição do vinho, os frascos eram pesados, para assim se determinar a biomassa úmida obtida após a centrifugação. A diferença de peso entre o tubo vazio e a biomassa úmida determinava a massa da mesma.

4.10 – Determinação do etanol na amostra

Para se determinar a quantidade de etanol na amostra de vinhos provenientes das fermentações, foi utilizado o método de destilação seguido determinação da densidade. O vinho previamente delevurado foi destilado em um microdestilador Tecnal TE-012, o conteúdo destilado foi transferido para um balão volumétrico antes de ser analisado em um densímetro digital ANTON PAAR – DMA48. O resultado obtido era ajustado para a diluição utilizada, determinando assim o valor de etanol em % (v/v).

Figura 6 – Fluxograma exemplificando o protocolo de avaliação.

4.11 – Extração e quantificação da trealose

Para a extração da trealose das leveduras, após o último ciclo fermentativo, foi utilizado o protocolo adaptado com ácido tricloroacético (TCA) de Trevelyan e Harrison (1956). Foram separadas 200 mg de levedura (massa úmida), as quais foram lavadas com água destilada (próxima de 0°C) para retirar o máximo possível de detritos e restos do vinho. A massa de levedura foi separada da água através da centrifugação a 3500 RPM, por 10 minutos. Após a lavagem da biomassa, 2 ml de TCA (0,5 M) foi adicionado e mantido por 20 minutos, os tubos foram mantidos a 0°C durante o processo. Após os 20 minutos, os tubos foram centrifugados novamente com o intuito de se separar a fase líquida de TCA e trealose do material sólido. Da fase líquida foi retirado 1,5 ml para futura quantificação.

Para a quantificação de trealose das amostras, foi utilizado o método de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com fase líquida de NaOH (100mmol.L⁻¹) com um fluxo de 1ml/min (BASSO, et al 2008). O equipamento é da marca Dionex e de modelo DX-300 com detector de amperometria de pulso com eletrodo de ouro. Para a separação foi escolhido uma coluna Carbowpack PA-1 específica para o uso com carboidratos. Durante a quantificação das amostras, soluções controle foram utilizadas para se garantir os resultados obtidos.

4.12 – Quantificação de glicerol e açúcares residuais

Tanto as quantidades de glicerol, quanto as dos açúcares residuais foram determinados no vinho delevurado pelo o uso de cromatografia líquida, com o mesmo equipamento descrito para a trealose e método de Basso et al. (2008).

4.13 – Quantificação de ácidos orgânicos

Do vinho delevurado foram retiradas amostras para a quantificação de ácidos orgânicos, através do uso do Cromatógrafo CG-480C (HPLC), com fase líquida composta de H₂SO₄ a 5mM e fluxo de 0,6 mL/minuto. A coluna utilizada para a separação foi a Bio-Rad Aminex HPX-87H.

4.14 – Análises estatística

Com o intuito de se garantir os dados obtidos e as conclusões geradas por eles, foi utilizado o software R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996) para os testes de comparação de médias de “Tukey” (TUKEY, 1963). Foi utilizado as médias obtidas dos testes em triplicata, garantindo assim um resultado mais seguro (nível de significância de $p < 0,05$). Foi verificado se as diferenças encontradas nos testes de etanol, biomassa, viabilidade, rendimento, trealose e açúcar residual eram significativos ou inconstantes.

4.15 – Local de experimentação e análise

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba - SP.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Cariotipagem

As 15 colônias isoladas da amostra de vinho bruto da destilaria (final de safra) revelou pela cariotipagem um perfil eletroforético dominante com sutis variações, sugerindo a presença de uma linhagem dominante (dado não apresentado). Não foram encontrados perfis eletroforéticos referentes às linhagens JP-1 e de panificação, demonstrando que tais linhagens não foram aptas a colonizar a dorna de fermentação, ou se o foram, não sobreviveram até o final da safra.

No entanto, a linhagem dominante observada apresentou perfis eletroforéticos muito semelhantes ao da linhagem PE-2. A pequena diferença entre os perfis sugere que sejam rearranjos cromossômicos oriundos da linhagem PE-2, rearranjos estes que evoluíram ou foram selecionados durante os ciclos na destilaria em questão. De qualquer forma descendem da mesma linhagem inicial de PE-2.

A figura 6 mostra os perfis eletroforéticos das 4 culturas utilizadas no presente experimento num único gel, para efeito de comparação mais precisa dos mesmos. Rearranjos cromossômicos foram igualmente encontrados na população da linhagem PE-2, porém em 15 colônias cariotipadas desta linhagem não se observou o perfil da ST-1 (dado não apresentado).

Rearranjos cromossômicos da PE-2 foram estudados por Lopes (2000), constatando-se que os mesmos surgem de uma cultura pura da linhagens quando submetida a propagações envolvendo muitas gerações. O mesmo ocorre no transcorrer das safras em praticamente todas as destilarias. A primeira constatação do surgimento de rearranjos cromossômicos foi com leveduras vinícolas (BIDENNE et al., 1992). Existem evidências de que tais rearranjos cromossômicos possam estar associados à uma adaptação da linhagem às condições estressantes do meio, porém em muitos casos os mesmos se mostraram neutros, ou seja, sem nenhuma vantagem adaptativa (LOPES, 2000). Porém em outros se notou incrementos de tolerância a alguns tipos de estresse, como ao íon cúprico e ácido.

Figura 7 – Perfis eletroforéticos de colônias das culturas de leveduras utilizadas nos experimentos, tipificando cada linhagem e ainda mostrando rearranjos cromossômicos da PE-2 (perfis 4 e 5 versus perfis 6 e 7), da JP-1 (8 e 10 versus 9 e 11) e da ST-1 (perfis 12, 14 e 15 versus perfil 13).

5.2 – Reciclo celular e teste de tolerância

Durante a avaliação das linhagens, ao longo de 20 ciclos fermentativos, as mesmas sofreram ação de diferentes concentrações de açúcar proveniente do melaço, gerando quantidades diferentes de etanol, além de terem sido afetadas por contaminações bacterianas. A concentração final de etanol variou de 7,6% até 12% (v/v) ao longo do experimento (Figura 7), podendo assim ser traçado um paralelo com o aumento da concentração de açúcar no substrato, com exceção da levedura de panificação que apresentou declínio do etanol a partir do décimo ciclo. As outras leveduras apresentaram desempenhos melhores durante o reciclo de células, embora a JP-1 mostre leve declínio durante os últimos cinco ciclos. Já as linhagens PE-2 e ST-1 apresentaram os mesmos padrões de produção de etanol.

A fermentação com reciclo de células é diretamente dependente de cepas de leveduras capazes de sustentar o crescimento e manter uma alta concentração celular, pelo menos o crescimento suficiente a fim de garantir o curto período de fermentação necessário na

indústria. O volume de leveduras é de crucial importância, assim como uma viabilidade adequada, quando levamos em conta os longos períodos de ciclo celular presentes nas usinas. Os gráficos de biomassa (Figura 8) e viabilidade (Figura 9) mostram claramente que a levedura de panificação é inviável para fermentação com ciclo, quando comparada as cepas de uso industrial.

Figura 8 – Concentração final de etanol (% v/v) durante os 20 ciclos fermentativos, evidenciando as linhagens utilizadas e as diferentes concentrações de açúcar nos substratos.

Figura 9 – Evolução da biomassa (g) das linhagens ao longo de 20 ciclos fermentativos.

Figura 10 – Evolução da viabilidade (%) das linhagens ao longo de 20 ciclos fermentativos.

Já foi demonstrado que leveduras de panificação não são capazes de se estabelecer em fermentações de nível industrial, acabam sendo completamente substituídas por leveduras selvagens em curtos períodos de tempo, de 15 a 30 dias de reciclo celular (Basso et al, 2008). Ao se analisar as linhagens PE-2, JP-1 e ST-1 as mesmas mostraram uma melhor capacidade de lidar com as condições estressantes impostas durante a simulação de fermentação com reciclo de células, embora a PE-2 e a ST-1 mostraram um desempenho ainda melhor que a JP-1. A linhagem PE-2 é comumente utilizada por diversas destilarias já a várias safras (Basso et al., 2008) e a ST-1 foi isolada de uma destilaria no final da safra, embora a mesma destilaria tenha iniciado a safra com a PE-2.

A taxa de brotamento da levedura é utilizada como parâmetro na indústria para se evidenciar um crescimento normal da levedura durante o reciclo celular. Incrivelmente a maior taxa de brotamento foi obtida pela levedura de panificação, mesmo essa mostrando a taxa mais baixa de crescimento e até queda no volume de biomassa (Figura 10). É possível se inferir que as altas taxas de brotamento da levedura de panificação se devem pela dificuldade de separação do broto da célula mãe, devido às condições estressantes durante as fermentações. Porém, dos ciclos 4 a 20, as maiores taxas de brotamento foram da linhagem JP-1, formando uma correlação direta com a sua maior biomassa. Os dados citados evidenciam que a taxa de brotamento se mostra um parâmetro limitado para se correlacionar com o crescimento das leveduras.

Os resultados acima apresentados demonstram uma vulnerabilidade muito acentuada da levedura de panificação, não sustentando biomassa adequada e muito menos viabilidade suficiente para os reciclos, sendo removida do experimento quando sua viabilidade caiu para 20%. As demais linhagens foram capazes de mostrar crescimento em biomassa até ciclos 8 a 11, sendo que a partir da imposição de estresses adicionais (maior concentração de melaço no mosto e contaminação com lactobacilos), se verifica reduções de biomassa e viabilidade para todas as linhagens, porém com maior intensidade na linhagem JP1.

Dos ciclos 6 a 9 o açúcar do substrato utilizado veio somente de melaço de cana-de-açúcar e o mosto foi deliberadamente contaminado com bactérias previamente isoladas de mosto industriais. É possível se notar a drástica queda no crescimento e na viabilidade da levedura de panificação (Figuras 8 e 9), porém sem qualquer relação com a taxa de brotamento (Figura 10). Durante os ciclos que apresentaram as maiores concentrações de melaço, 10 a 14, e também apresentaram as maiores concentrações de etanol (11%-12%), uma maior proliferação de bactérias foi associada a levedura de panificação pode ser observada (Figura 11). No ciclo 12 a levedura de panificação teve que ser removida do experimento,

devido a sua baixa viabilidade celular, aproximadamente 20% (Figura 9). Já as linhagens PE-2 e ST-1 foram capazes de manter uma taxa de viabilidade e biomassa superior até o vigésimo ciclo.

BROTAMENTO (%)

Figura 11 – Evolução do brotamento (%) das linhagens ao longo de 20 ciclos fermentativos.

Figura 12 – Contagem de bactérias (celulas/ml x 10⁷) ao longo de 20 ciclos fermentativos, utilizando diferentes linhagens de leveduras e evidenciando a contaminação proposital com bactérias provenientes de melaço e meio industrial.

A produção de glicerol apresentou considerável aumento na linhagem de panificação, após o ciclo 12 (Figura 12), tal fato é conhecido por ocorrer com o aumento do estresse osmótico (ALBERTYN et al., 1994; NEVOIGT & STAHL, 1997).

É sabido que as bactérias lácticas presentes nos mostos são predominantemente do gênero *Leuconostoc*, com pouca capacidade de se propagarem em meio contendo etanol, o que ocorre durante a fermentação. Por outro lado, o gênero *Lactobacillus* encontra um ambiente favorável em meio de vinho, sendo capazes de suportar a acidez e os elevados teores de etanol. Neste experimento foi possível demonstrar que as bactérias isoladas do mosto tiveram pouco impacto nas linhagens avaliadas. No entanto as bactérias isoladas de vinho apresentaram uma ação estressante maior. Mostrou ainda que tal efeito estressante foi correlacionado com aumento nas contagens das células bacterianas, acompanhado de incrementos nos metabólitos de origem bacteriana, principalmente de ácido lático e acético.

As linhagens PE-2, JP-1 e ST-1 foram capazes de competir com a mistura de bactérias isoladas do mosto mantendo as com uma baixa contagem de indivíduos (Figura 11), porém assim que *Lactobacillus* (isolados de fermentações industriais) foram inoculados aos recintos, a linhagem JP-1 mostrou uma competitividade inferior a da PE-2 e da ST-1.

Os *Lactobacillus* são bem adaptados ao ambiente de fermentação (GALLO, 1989) e tal fato pôde ser observado já que o gênero foi implantado com sucesso no ambiente de fermentação. Ainda assim, as cepas PE-2 e ST-1 mostram grande capacidade de competição com os *Lactobacillus* introduzidos a partir do ciclo 14 (Figura 11), embora a contaminação bacteriana tenha se mostrado mais alta com a linhagem JP-1 e a viabilidade da mesma tenha caído (Figura 9). Como demonstrado por Cherubin (2003) a queda da viabilidade das linhagens PE-2 e de panificação, durante o reciclo celular, favorece a contaminação bacteriana, além que a lise das células das leveduras pode suprir os *Lactobacillus* com aminoácidos essenciais, favorecendo o crescimento dos mesmos (OLIVA-NETO et al, 2004).

Figura 13 – Produção de glicerol (g/100) das linhagens ao longo de 20 ciclos fermentativos.

Figura 14 – Concentração de ácido láctico (g/L) no meio fermentado ao longo de 20 ciclos fermentativos.

Figura 15 – Concentração de ácido acético (g/L) no meio fermentado ao longo de 20 ciclos fermentativos.

RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)

Figura 16 – Rendimento fermentativo (%) das linhagens ao longo de 20 ciclos fermentativos.

Figura 17 – Açúcar residual (%) no meio fermentado ao longo de 20 ciclos fermentativos.

É possível se observar uma forte correlação entre a contaminação bacteriana e a formação de ácido lático e ou ácido acético em todas as linhagens de levedura (Figuras 13 e 14). O rendimento fermentativo também apresentou crescente variação negativa com o aumento da contaminação bacteriana (Figura 15). A cepa JP-1 apresentou um rendimento fermentativo inferior em comparação aos da PE-2 e ST-1 nos últimos cinco ciclos fermentativos, quando a contaminação bacteriana foi mais alta.

A produção de glicerol apresentou aumentos em resposta ao aumento da contaminação bacteriana (Figura 12), como já constatado em outras condições fermentativas (THOMAS et al, 1994). Juntando todos os fatores descritos, a viabilidade da levedura pode ser considerada o principal parâmetro para prever a eficiência da fermentação com reciclo celular. Contaminações bacterianas mostraram ser fatores estressantes importantes na avaliação das linhagens, especialmente na levedura de panificação e na JP-1.

Não é possível excluir a possibilidade que um organismo tão bem adaptado como o *Lactobacillus* tenha causado ele mesmo a queda na viabilidade celular, através da produção de altos níveis de ácido lático e acético (Figuras 13 e 14). Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar a PE-2 da ST-1, ambas as linhagens conseguem lidar com os estresses presentes nas condições industriais.

De um ponto de vista prático e industrial, quanto mais açúcar for desviado para a produção de ácido acético, ácido lático e glicerol, pior será o rendimento da fermentação (Figura 14). A tabela 2 apresenta quanto do açúcar cedido para a fermentação foi convertido para gerar cada produto. A partir desses dados é possível se determinar que no quinto ciclo 9,73% do açúcar cedido foi consumido para a produção de glicerol, ácido acético e lático pela linhagem de panificação, já nas outras linhagens esse valor é de aproximadamente 4,4%. O vigésimo ciclo fermentativo é o que mais se aproxima das condições encontradas na usina e mesmo assim apenas 5,65% do açúcar consumido (praticamente sem açúcar residual detectado) foi transformado em subprodutos indesejados pelas cepas PE-2 e ST-1.

O consumo de açúcar da levedura JP-1 é a que apresentou piores resultados, além da de panificação, utilizando 9,46% do açúcar para glicerol, ácido acético e lático. Considerando os dados obtidos na Tabela 3 e na Figura 16, é possível se calcular que, o valor mais baixo no rendimento fermentativo da JP-1 (vigésimo ciclo), em comparação com a PE-2 e ST-1, estão estequiometricamente relacionados ao aumento na produção de glicerol, ácido acético e lático.

A linhagem de panificação, com a já demonstrada baixa taxa de implantação em fermentações industriais, foi a que demonstrou maior vulnerabilidade no ensaio com reciclos (comprometimento do crescimento no ciclo 1 e da viabilidade no ciclo 3). A linhagem JP1,

com taxa de implantação mediana, pode ser discriminada pelas menores viabilidade e produção de etanol (ciclo 16), menor competição com *Lactobacillus* (ciclo 14, com maiores teores de lactato e acetato), menor teor de trealose (ciclo 20).

Tabela 2 – Açúcar desviado (em percentagem de açúcar fornecido) para a formação de glicerol, ácido láctico e ácido acético pelas linhagens de levedura durante o reciclo de células. Valores obtidos da média das réplicas e com erro padrão ($\pm$).

Produto de Fermentação	Ciclo	Linhagem de Levedura			
		Panificação	PE-2	JP-1	ST-1
Glicerol	1	2,50 ($\pm 0,22$)	2,97 ($\pm 0,09$)	2,47 ($\pm 0,10$)	3,00 ($\pm 0,04$)
	5	2,57 ($\pm 0,29$)	2,74 ($\pm 0,10$)	2,45 ($\pm 0,16$)	2,69 ($\pm 0,08$)
	12	3,20 ($\pm 0,12$)	2,26 ($\pm 0,03$)	1,88 ($\pm 0,03$)	2,26 ($\pm 0,03$)
	14	*	2,55 ($\pm 0,04$)	2,35 ($\pm 0,07$)	2,54 ($\pm 0,04$)
	20	*	2,77 ($\pm 0,18$)	3,53 ($\pm 0,05$)	2,69 ($\pm 0,15$)
Ácido Láctico	1	0,107 ($\pm 0,007$)	0,122 ($\pm 0,004$)	0,142 ($\pm 0,022$)	0,133 ($\pm 0,021$)
	5	0,957 ($\pm 0,064$)	0,913 ($\pm 0,019$)	0,904 ($\pm 0,018$)	0,902 ($\pm 0,015$)
	12	3,782 ($\pm 0,149$)	1,407 ($\pm 0,035$)	1,874 ($\pm 0,070$)	1,507 ($\pm 0,027$)
	14	*	3,378 ($\pm 0,008$)	4,302 ($\pm 0,310$)	3,583 ($\pm 0,021$)
	20	*	1,953 ($\pm 0,173$)	3,823 ($\pm 0,202$)	2,057 ($\pm 0,128$)
Ácido Acético	1	0,102 ($\pm 0,072$)	0,001 ($\pm 0,001$)	0,001 ($\pm 0,001$)	0,001 ($\pm 0,001$)
	5	0,241 ($\pm 0,039$)	0,206 ($\pm 0,075$)	0,97 ($\pm 0,031$)	0,219 ($\pm 0,034$)
	12	2,754 ($\pm 0,132$)	0,620 ($\pm 0,045$)	0,671 ($\pm 0,049$)	0,706 ($\pm 0,030$)
	14	*	1,157 ($\pm 0,012$)	1,521 ($\pm 0,134$)	1,227 ($\pm 0,023$)
	20	*	0,917 ($\pm 0,070$)	2,108 ($\pm 0,120$)	0,915 ($\pm 0,087$)

*Devido à retirada da levedura de panificação dos testes, os últimos ciclos não apresentaram valores de açúcar desviado.

5.3 – Trealose

A trealose é uma das formas de reserva de carboidratos das leveduras que é frequentemente associado à tolerância a estresses (ATTFIELD, 1987; WIEMKEN, 1990; ALCARDE & BASSO, 1997; YOSHIYAMA et al, 2015). Na levedura de panificação pode ser notada a constante baixa na concentração intracelular de trealose (Figura 17), porém nas outras linhagens as concentrações se mantêm elevadas, mesmo com o aumento no nível de estresses durante os experimentos. Entretanto, no vigésimo ciclo a linhagem JP-1 apresentou queda na viabilidade, além de concentrações inferiores de trealose, quando comparadas as das outras linhagens.

Figura 18 – Concentrações de trealose (%DW) nas linhagens de levedura durante 20 ciclos fermentativos.

Devido à quantidade significativa de trealose presente nas leveduras e a alta concentração celular ($31,2 \text{ g de peso seco.L}^{-1}$), é possível se deduzir que tal carboidrato de reserva representa até 3% do açúcar fornecido. Considerando tal fato, baixas concentrações de trealose na levedura de panificação podem resultar em maiores produções de etanol, como pode ser observado durante os primeiros ciclos fermentativos, porém sem vantagens fisiológicas ou tecnológicas. A PE-2 somente pode ser discriminada pelo protocolo após

decorrido 20 ciclos. O único parâmetro foi a superioridade da ST-1 em acumular maiores valores de trealose em relação a JP-1 e a PE-2.

6 – CONCLUSÕES

O protocolo desenvolvido foi capaz de discriminar linhagens com diferentes capacidades de implantação em processos industriais de produção de etanol que operam com reciclo células, mostrando assim que se presta para a seleção de linhagens que se pretenda serem implantadas em processos industriais, caracterizando ainda aspectos fisiológicos relacionados com as aptidões tecnológicas das linhagens comparadas.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C.. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 189-194, Sept. 1997.
- ALBERTYN, J., HOHMANN, S., THEVELEIN, J. M., & PRIOR, B. A. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14(6), p. 4135–4144, 1994.
- ALMARIO, M. P.; REYES, H. L.; KAO, K. C. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Enhanced Tolerance to Hydrolysates of Lignocellulosic Biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 110, n. 10, p. 2616-2623, 2013.
- AL-MHANNA, N. M. M. Observation of Crabtree Effect and Diauxic Behaviour of Yeast by Using Absorption. **Chemical Engineering Transactions**, Milão, v. 21, p. 1465-1470, 2010.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALVES, L. M. C. et al. Metagenoma e a desconstrução da biomassa. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. cap. 4, p. 83-112.
- AKTAS, B. et al. The effect of *Lactobacillus casei* 32G on the mouse cecum microbiota and innate immune response is dose and time dependent. **Plos One**, v.10, n.12, 19p, 2015.
- ANDRADE, R. R. et al. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, Essex v. 130, p. 351–359, 2013.
- AON, J. C.; CORTASSA, S. Metabolic rates during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* on acetate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 69, p. 257-265, 1996.
- AON, J. C.; RAPISARDA, V.A.; CORTASSA, S. Metabolic Fluxes Regulate the Success of Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Experimental Cell Research**, New York, v.222, p.157–162, 1996.
- ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, New York, v.19, p. 2258-2270, 2009.

ATTFIELD, P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Lett**, v. 225, p. 259-263, 1987.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V. et al. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde. **Rev. Dig. Nut.**, v. 2, n. 3, p. 1-29, 2008.

BASSO, L. C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Reseach**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M. A (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croácia: Intech, 2011, cap. 5, p. 85-100.

BASSO, T. P. **Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* by hybridization for increased tolerance towards inhibitors from second-generation ethanol substrate**. 2015. 106p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. doi:10.11606/T.11.2015.tde-29042015-132341

BERNET, M.F; BRASSART D; NEESER J.R.; SERVIN, A.L.. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut** 1994;35:483-489.

BIDENNE, C; BLONDIN, B; DEQUIN, S & VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** 22:1-7, 1992.

BILINSKI, C. A.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Analysis of sporulation in brewer's yeast: Induction of tetrad formation. **Journal of Institute of Brewing**, London. v. 92, p. 594-598, 1986.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana de açúcar Energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: Editora Senac Rio, 2008. 316p.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresour. Technol**, v. 101, p. 4862–4874, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.009

ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, n.5, p. 569-578, 2005.

CARASI, P. et al. Impact of kefir derived Lactobacillus kefir on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**, v.2015, n.1, 2015.

CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D.; ANTUNIASSI, U. R. Tecnologia de aplicação e inovação voltadas ao uso racional de defensivos agrícolas em culturas destinadas à produção de bioenergia. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 3, p. 271-318.

CHERUBIN, R. A. Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Piracicaba, 2003, 124 p. **Tese** (Doutor em Microbiologia Agrícola), **Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Universidade de São Paulo (USP), 2003.

CODÓN, A. C.; GASENT-RAMÍREZ, J. M.; BENÍTEZ, T. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 61, n. 2, p. 630–638, 1995.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G. G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Znd Microbiol**, v. 7, p. 191-196, 1991.

DE VIRGILIO, C.; BURCKERT, N.; BELL, W.; JEN, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Disruption of TPS2, the gene encoding the 100 kDa subunit of the trehalose-&phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. **Eur J Biochem** v. 212, p. 315-323, 1993.

DE VIRGILIO, C.; HOTTIGER, T.; DOMINGUEZ, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. 1. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. **Eur J Biochem**, v. 219, p. 179-186, 1994.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. P. Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 utilizando substratos não convencionais como alternativa à produção convencional. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. cap. 8, p. 195-250.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Cur. Iss. in Int. Microb.**, v. 8, p 44 - 61, 2007.

FUENTES, M. C. et al. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CETC 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v.109, p.1866-1872, jan. 2013.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. Lactic acid bacteria. **Win. Microb. Pract. Applic. Proced.**, v. xx, p. 2-44. 2007.

GADD, G. M.; CHALMERS, K.; REED, R. H. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 48, p. 249-254, 1987.

GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Campinas, SP, Brasil, 1989.

GIONCHETTI P., RIZZELLO F., VENTURI A., BRIGIDI P., MATTEUZZI D., BAZZOCCHI G. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial? **Gastroenterology**, v. 119, p. 305–309, 2000.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus aci-dophilus: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10 , p. 139-157, 1999.

GOMES, E. et al. Resíduos agrícolas e agroindustriais: potencialidades de uso na produção de etanol. In: GIANNINI, M. J. S. M. et al. (Ed.). **Bioenergia desenvolvimento, pesquisa e inovação**, São Paulo, Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 10, p. 271-319.

GREIG, D. et al. Hybrid Speciation in Experimental Populations of Yeast. **Science**, Washington v. 298, p. 1773-1774, 2002.

GRITZALI, M.; BROWN, JR., R.D. Relationships between purified extracellular enzymes from induce or Cellulose-grown cells. In: BROWN, JR., R.D.; JURASEK, L. (Ed.). **Hydrolysis of cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis**. American Chemical society, Washington, 1979. Cap. 12, p. 237-261.

GIUDICI, P. et al. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin. v.66, p.622–628, 2005.

GUIMARÃES, P. M. R. et al. Adaptive Evolution of a Lactose-Consuming *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 1748–1756, 2008.

HEIPIEPER, H.F.; KEWELOH, H.; REHMH.J. Influence of Phenols on Growth and Membrane Permeability of Free and Immobilized *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 57, p. 1213-1217, 1991.

HORVÁTH, I. S. et al. Effects of Furfural on the Respiratory Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Glucose-Limited Chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 4076-4086, 2003.

HOTTIGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEBS Lett**, v. 220, p. 113-115, 1987.

HOTTIGER, T.; DE VIRGILIO, C.; HALL, M. N.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. 11. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. **Eur J Biochem**, v. 219, p. 187-193, 1994.

HOU, L. Improved Production of Ethanol by Novel Genome Shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 160, p. 1084-1093, 2010.

HOU, L. Novel methods of genome shuffling in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, p. 671–677, 2009

HOUNSA, C. G. et al. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 671-680, 1998.

HUMPHREY, A. E. The hydrolysis of cellulosic materials to useful products. BROWN, JR., R.D.; JURASEK, L. (Ed.). **Hydrolysis of cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis**. American Chemical society, Easton, 1979. cap. 2, p. 25-54.

IHAKA R.; GENTLEMAN R. R: a language for data analysis and graphics. **J. Comput. Graph. Statist.** v. 5, p. 299–314, 1996.

JAY, J.M. Modern Food Microbiology. **New York: Chapman & Hall.** 1996.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, Sweden, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.

JOSHI, B. et al. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, Lagos, v. 6, p. 172-182, 2011.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**. Sweden, v. 4 p. 1-19, 2011.

KUYPER, M. et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p. 925–934, 2005.

LADISCH, M. R. et al. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 5, p. 82-101, 1983.

LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. **Biotechnology for Biofuels**. Sweden, v.7, p. 1-8, 2014.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S. et al. Handbook of probiotics. New York: Wiley, p. 211, 1999.

LEWIS, J. G.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 687-694, 1995.

LEWIS, I. G.; LEARMONTH, R. P.; ATTFIELD, P. V.; WATSON, K. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ind Microbiol Biotechnol** v. 18, p. 30-36, 1997.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v.143, p.1384-1394, 1980.

LOPES, M. L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em levedura selecionada do processo industrial de produção de etanol**. 2000. 118p. Tese (Doutorado-Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, “Campus de Rio Claro” Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

LUNDBLAD, L.; STRUHL, K. Yeast, Introduction. In. Ausubel, F. M. Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J.G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (Ed). **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons Inc; 2003. Cap. 13.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14a ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1005p.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12a ed. Porto Alegre: Artimed, 2010. 1160p.

MANSURE, J.J. et al. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 191, n. 2, p. 309-316, 1994.

MARULLO, P. et al. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 711–719, 2004.

MIRA, N. P. et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. **Microbial Cell Factories**. Lisboa. v. 9, p. 13, 2010.

MIRANDA, E.S. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2016. 111p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

MOREIRA, I. C.; GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program. **Energy Policy**, Surrey, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999.

MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 29, p. 733-741, 1987.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 673–686, 2005.

Nagata S.; Hanayama R.; Kawane, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell** v. 140, p. 619–630, 2010.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**; v. 21 (3), p. 231-241, 1997.

NUNES, A. L. S.. Efeito do consumo de *Lactobacillus plantarum* - LP115 no perfil metabólico de amostras fecais humanas. **UNOPAR**, Londrina, 2016.

Oliva-Neto, P.; Ferreira, M.A.; Yokoya, F. Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. **Biores. Technol.**, v. 92, p. 1-6, 2004.

OLIVEIRA, A. J. et al. Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Piracicaba: **FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP**, 1996. 89p.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Far.**, v. 38, n. 1, 2002.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 17-24, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v.74, p.25-33, 2000.

PALMQVIST, E. et al. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, p. 470-476, 1996.

PATNAIK, R. et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. **Nature biotechnology**, New York, v. 20, p. 707-712, 2002.

PARKS, H. D. et al. The *S. cerevisiae* Nitrogen Starvation-Induced YVH LP and PTP2P Phosphatases Play a Role in Control of Sporulation. **YEAST**. Davis, v. 12, p. 1135-1151, 1996.

PINEL, D. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Genome Shuffling through Recursive Population Mating Leads to Improved Tolerance to Spent Sulfite Liquor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 4736-4743, 2011.

POPOFF, T.; THEANDER, O. Formation of aromatic compounds from carbohydrates: Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 30, p. 397-402, 1976.

PRETORIUS, L. S.; VAN DER WESTHUIZEN, T. J. The Impact of Yeast Genetics and Recombinant DNA Technology on the Wine Industry - A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 12, p. 3-31, 1991.

QUEIROZ, R, J, B. Quantificação da trealose e da prolina livre em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica do solo. 2006. xi, 58 f. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/96878>>.

RAINIERI, S.; PRETORIUS, L. S. Selection and improvement of wine yeasts. **Annals of Microbiology**. Stellenbosch. v. 50, p. 15-31, 2000.

RASK, C. et al. Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli. **Clinical and Experimental Immunology**, v.172, n.1, p.321-332, 2012.

ROBINSON, R. Therapeutics properties of fermented milks. Essex (England): **Elsevier**, p. 185, 1991.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed.). **The Alcohol Textbook**, 4th Edition. Alltech Inc. 2003. England, cap. 9, p. 85-120.

SANCHEZ, R. G.; SOLODOVNIKOVA, N.; WENDLAND, J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. **Yeast**. Davis, v. 29, p. 343–355, 2012.

SANDERSON, K. A chewy problem. Outlook Biofuels. **Nature**, London, v. 474, p. 12-14, 2011.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 130-166, 2001.

SCHNEITER, R. **Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast**. University Fribourg, 2004, 86 p.

SILVA, J. G. da; Identificação molecular de bactérias ácido-láticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais, **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2016.

SILVA, E. A.; MELO, W.F.; ANTUNES, D.F. et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 2005; v. 32(10), p. 481-486.

SILVELLO, C. **Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mediante hibridação**. 2016. 111p. Dissertação (Mestra em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin and Yang of trehalose. **Tibtech**. v. 16, p. 460-468, 1998.

STEENSELS, J. et al. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 38, p. 947-995, 2014.

STEINMETZ, L. M. et al. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. **Nature**, London, v. 416, p.326-330, 2002.

SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1990–1998, 2003.

SONG, M. et al. Characterization of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.35, n.4, p.551-556, 2015.

SOUZA, M.A.C; MUTTON, M.J.R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência Agrotec.** v.28, n.4, p.893-898, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUOMALAINEN, H.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. **Journal of the Institute of Brewing**, v.67, p.249-254, 1961.

TAHERZADEH, M. J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 701-708, 2000.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; MILLATI, R.; NIKLASSON, C. Continuous Cultivation of Dilute-Acid Hydrolysates to Ethanol by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 95, p. 45-57, 2001

THEVELEIN, J. M.. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol Rev**, v. 48, p. 42-59, 1984.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1519–1524, 1994.

TOMÉ, J. A. T. R. Etanol de segunda geração: O grande salto tecnológico. In: VICENTINI, B. H.; GUIMARÕES JUNIOR, O.; BASSO, T. P. (Ed.). **Temas de Agronegócios**. Piracicaba, Linha Impressa, 2015. Cap. 1, p.13-25.

TOSSETTO, M. G. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibidores no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. 2008. 257 f. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2008.

TRECO, D. A.; WINSTON, F. Growth and Manipulation of Yeast. In. AUSUBEL, F. M. et al. (Ed). **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons Inc; 2003. cap. 13, Unit 13.2.

TREININ, M.; SIMCHEN, G. Mitochondrial activity is required for the expression of *ime1*, a regulator of meiosis in yeast. **Current Genetics**, New York, v. 23, p. 223-227, 1993.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, J. S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **The Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956.

TUKEY, J. W. The problem of multiple comparisons. **Dittoed manuscript of 386 pages**, New Jersey: Department of Statistics, Princeton University, 1953.

ÚNICA. Etanol, 60 países já adotam mistura obrigatória de biocombustíveis aos combustíveis fósseis. Disponível em:

<<http://www.unica.com.br/noticia/27251092920325965467/60-paises-ja-adotam-mistura-obrigatoria-de-biocombustiveis-aos-combustiveis-fosseis/>>.

VAN LAERE, A. Trehalose, reserve and /or stress metabolite? **FEMS Microbiol Ver**, v. 63, p. 201-210, 1989.

Venturi, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, p. 1103–1108, 1999. doi:10.1046/j.1365-2036.1999.00560.x

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SRCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**. London v. 136, p. 395-403, 1990.

VIEGAS, R.P. et al . Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo de coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 62, n. 2, p. 460-467, Apr. 2010 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000200028&lng=en&nrm=iso>.

ZAGO, E. A. et al. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool. Piracicaba: **FERMENTEC**; FEALQ, ESALQ, 1996. 194p.

ZHENG, D. Q. et al. Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 415 – 422, 2011b.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. 1st Edition. Wiley, 2009. p. 478-491. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/villalvaa/2009-yeast>>.

WANG, H.; HOU, L. Genome Shuffling to Improve Fermentation Properties of Top fermenting Yeast by the Improvement of Stress Tolerance. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 145-150, 2010.

WIEMKEN, A., Trehalose in yeast: stress protectant rather than reserve carbohydrate? **Antonie van Leeuwenhoek**, 1990, p. 58, 209-217.

WIGGERS, H. A. L. Untersuchung über das Mutterkorn, Secale cornutum. **Ann. Pharm.**, v. 1: p. 129–182, 1832. doi:10.1002/jlac.18320010202

YARRIS, L. **The Evolutionary Road to Biofuels**. Berkeley Lab. U.S. Department of Energy, California, 2009. Disponível em: <<http://www2.lbl.gov/Publications/YOS/Feb/>>.

YANG, J. et al. Induction of regulatory dendritic cells by *Lactobacillus paracasei* L9 prevents allergy sensitization to bovine β -lactoglobulin in mice. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.10, p.1678-1696, jun. 2015.

YOSHIYAMA, Y.; TANAKA, K.; YOSHIYAMA, K.; HIBI, M.; OGAWA, J.; SHIMA, J. Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. **J Biosci Bioeng** 119(2):172–175, 2015.

ANEXOS & DADOS

ANEXO A – Rendimento em etanol (%) e evolução da biomassa (g) das leveduras panificação (PAN), PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	RENDIMENTO (%)				BIOMASSA (g)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
INICIAL	1					4,20	4,24	4,27	4,23
	2					4,15	4,17	4,30	4,21
	3					4,19	4,16	4,28	4,24
	MÉDIA					4,18	4,19	4,28	4,23
1	1	91,65	88,18	88,87	87,94	4,49	4,68	4,74	4,68
	2	90,25	88,42	88,39	88,51	4,50	4,57	4,75	4,64
	3	90,50	88,37	89,67	88,07	4,51	4,58	4,72	4,66
	MÉDIA	90,80	88,32	88,98	88,17	4,50	4,61	4,74	4,66
2	1	90,85	90,23	90,86	90,04	4,72	4,95	5,07	4,93
	2	91,38	90,07	91,43	90,83	4,73	4,83	5,04	4,91
	3	90,55	90,20	90,49	91,11	4,75	4,84	4,96	4,98
	MÉDIA	90,93	90,16	90,93	90,66	4,73	4,87	5,02	4,94
3	1	89,75	90,32	90,93	90,45	4,83	5,15	5,23	5,10
	2	91,91	89,38	91,44	90,49	4,84	5,09	5,23	5,06
	3	90,93	89,92	91,23	89,73	4,89	5,12	5,17	5,13
	MÉDIA	90,86	89,88	91,20	90,23	4,85	5,12	5,21	5,10
4	1	89,10	87,52	89,47	88,44	4,87	5,23	5,35	5,24
	2	88,85	87,87	88,95	88,55	4,89	5,23	5,31	5,16
	3	89,26	87,58	89,82	88,79	4,93	5,20	5,21	5,23
	MÉDIA	89,07	87,66	89,41	88,59	4,90	5,22	5,29	5,21
5	1	87,69	87,42	87,11	88,36	4,95	5,36	5,59	5,37
	2	87,84	87,62	88,48	88,23	5,05	5,42	5,50	5,29
	3	88,62	87,22	88,48	87,60	5,03	5,39	5,37	5,37
	MÉDIA	88,05	87,42	88,02	88,06	5,01	5,39	5,49	5,34
6	1	88,74	89,87	90,83	89,38	4,87	5,25	5,73	5,26
	2	90,64	89,51	91,12	88,84	5,01	5,33	5,59	5,14
	3	90,88	88,71	91,77	89,83	4,98	5,36	5,39	5,30
	MÉDIA	90,09	89,38	91,24	89,35	4,95	5,31	5,57	5,23
7	1	88,78	89,77	89,83	89,20	4,80	5,39	6,12	5,46
	2	89,70	89,03	90,72	90,16	4,99	5,52	5,90	5,30
	3	90,25	87,77	90,46	89,21	4,97	5,60	5,68	5,50
	MÉDIA	89,58	88,86	90,34	89,52	4,92	5,50	5,90	5,42
	1	89,30	89,78	88,34	90,18	4,74	5,53	6,41	5,58

8	2	89,61	89,60	89,48	90,18	4,89	5,69	6,20	5,41
	3	89,52	88,23	87,98	88,64	4,88	5,79	5,97	5,70

ANEXO A (Continuação) – Rendimento em etanol (%) e evolução da biomassa (g) das leveduras panificação (PAN), PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	RENDIMENTO (%)				BIOMASSA (g)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
9	1	88,01	89,46	89,16	88,68	4,52	5,59	6,62	5,70
	2	87,95	89,22	89,73	89,44	4,73	5,79	6,38	5,43
	3	89,99	88,71	90,50	89,95	4,70	5,93	6,16	5,70
	MÉDIA	88,65	89,13	89,80	89,36	4,65	5,77	6,39	5,61
10	1	72,27	90,82	88,76	90,30	3,82	5,49	6,67	5,58
	2	80,32	90,76	90,01	90,25	3,85	5,73	6,40	5,33
	3	80,39	90,36	89,86	89,99	3,87	5,85	6,15	5,61
	MÉDIA	77,76	90,65	89,54	90,18	3,85	5,69	6,41	5,51
11	1	58,30	89,63	90,20	91,43	3,79	5,43	6,63	5,60
	2	46,56	90,09	91,09	89,90	3,74	5,73	6,33	5,37
	3	50,51	90,08	92,07	90,13	4,07	5,85	6,08	5,63
	MÉDIA	51,76	89,93	91,12	90,49	3,87	5,67	6,35	5,53
12	1	54,40	90,92	91,14	91,60	3,63	5,39	6,44	5,48
	2	48,81	90,24	93,54	91,42	3,65	5,62	6,11	5,42
	3	51,05	90,83	93,46	91,74	3,66	5,71	5,87	5,66
	MÉDIA	51,42	90,66	92,71	91,59	3,65	5,57	6,14	5,52
13	1		91,79	91,25	90,56		5,29	6,15	5,34
	2		91,80	91,40	91,50		5,49	5,81	5,24
	3		91,40	92,06	91,08		5,54	5,62	5,51
	MÉDIA		91,66	91,57	91,05		5,44	5,86	5,36
14	1		88,48	88,52	88,12		5,26	6,03	5,26
	2		88,84	88,23	88,34		5,37	5,65	5,15
	3		88,80	87,64	88,11		5,38	5,46	5,30
	MÉDIA		88,71	88,13	88,19		5,34	5,71	5,24
15	1		88,21	88,84	88,89		5,06	5,67	5,13
	2		88,79	88,60	89,92		5,23	5,30	5,05
	3		87,86	88,90	88,88		5,13	5,12	5,11
	MÉDIA		88,29	88,78	89,23		5,14	5,36	5,10
16	1		87,56	86,66	88,85		4,95	5,57	5,05
	2		88,90	87,00	88,90		5,14	5,21	5,01
	3		88,06	85,32	88,06		5,04	5,05	5,06
	MÉDIA		88,17	86,33	88,60		5,04	5,28	5,04

ANEXO A (Continuação) – Rendimento em etanol (%) e evolução da biomassa (g) das leveduras panificação (PAN), PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	RENDIMENTO (%)				BIOMASSA (g)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
17	1		86,88	85,61	87,20		4,89	5,55	4,99
	2		86,54	83,66	87,17		5,09	5,21	4,93
	3		87,09	84,14	87,40		4,98	5,04	4,95
	MÉDIA		86,84	84,48	87,26		4,99	5,27	4,96
18	1		90,73	85,42	90,40		4,82	5,23	4,87
	2		91,35	83,52	91,41		4,94	4,87	4,81
	3		90,25	82,85	90,12		4,81	4,70	4,83
	MÉDIA		90,78	83,93	90,64		4,86	4,93	4,84
19	1		91,19	87,62	91,64		4,73	5,05	4,71
	2		91,77	83,70	91,64		4,76	4,81	4,70
	3		90,28	85,14	91,31		4,65	4,64	4,71
	MÉDIA		91,08	85,49	91,53		4,71	4,83	4,71
20	1		91,01	85,88	90,43		4,68	5,07	4,66
	2		89,79	85,35	90,25		4,69	4,96	4,62
	3		89,76	85,48	89,14		4,54	4,77	4,63
	MÉDIA		90,19	85,57	89,94		4,64	4,93	4,64

ANEXO B – Taxa de brotamento (%) e viabilidade celular (%) das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	TAXA DE BROTAMENTO (%)				VIABILIDADE (%)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
INICIAL	1								
	2								
	3								
	MÉDIA	37,85	22,59	9,9	9,35	100	100	100	100
	1	38,86	11,51	2,17	2,98	100	100	100	100
	2	36,73	14,61	2,11	4,10	99	100	100	100
	3	41,00	13,90	4,44	4,66	100	100	100	100
	MÉDIA	38,86	13,34	2,91	3,91	100	100	100	100
	1	36,48	9,25	1,92	2,08	99	100	100	100
	2	46,48	11,58	2,13	2,08	99	100	100	99
1	3	36,50	11,57	1,43	3,16	100	100	100	99
	MÉDIA	39,82	10,80	1,83	2,44	99	100	100	99
	1	36,19	5,43	1,66	0,99	97	100	100	100
	2	36,24	6,70	2,79	1,15	95	100	100	100
	3	34,50	5,87	1,83	2,45	97	100	100	99
	MÉDIA	35,64	6,00	2,09	1,53	96	100	100	100
	1	29,83	1,60	7,87	0,62	94	100	100	100
	2	32,51	2,39	5,45	1,43	94	100	100	100
	3	30,74	1,27	7,96	0,51	95	100	100	100
	MÉDIA	31,13	1,75	7,09	0,85	94	100	100	100
2	1	27,16	0,75	12,47	1,39	94	100	100	100
	2	26,34	1,48	11,22	1,02	93	100	100	100
	3	23,51	2,50	16,94	0,79	97	99	100	100
	MÉDIA	25,67	1,58	13,54	1,07	95	100	100	100
	1	21,53	3,67	15,71	7,19	94	100	99	100
	2	18,89	1,24	12,92	6,68	96	100	99	100
	3	22,81	1,11	14,14	8,71	94	100	100	100
	MÉDIA	21,08	2,01	14,26	7,53	95	100	99	100
	1	23,40	5,93	14,60	5,37	92	100	99	99
	2	22,26	7,56	16,50	2,44	94	100	99	99
3	3	22,15	5,50	14,78	4,46	94	100	100	99
	MÉDIA	22,60	6,33	15,29	4,09	93	100	99	99
	1	12,66	5,18	17,91	6,09	82	100	100	100
	2	12,04	6,63	19,76	5,59	82	100	99	100
	3	17,21	8,33	16,75	6,86	81	100	100	100
	MÉDIA	13,97	6,71	18,14	6,18	82	100	100	100

ANEXO B (Continuação) – Taxa de brotamento (%) e viabilidade celular (%) das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	TAXA DE BROTAMENTO (%)				VIABILIDADE (%)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
9	1	22,88	6,66	13,09	2,10	81	99	100	100
	2	28,30	6,47	12,06	2,69	78	99	100	100
	3	19,21	8,71	14,04	3,97	83	100	100	100
	MÉDIA	23,46	7,28	13,06	2,92	81	99	100	100
10	1	2,03	6,91	12,30	3,70	53	99	100	99
	2	0,81	6,09	13,46	4,64	51	99	100	99
	3	1,06	5,05	14,16	3,41	47	99	100	99
	MÉDIA	1,30	6,02	13,31	3,92	50	99	100	99
11	1	2,94	3,14	10,43	4,37	45	99	98	99
	2	4,65	4,14	10,05	0,65	39	99	99	98
	3	6,59	4,06	15,16	7,81	33	99	99	98
	MÉDIA	4,73	3,78	11,88	4,28	39	99	99	98
12	1	2,78	6,82	8,49	3,61	20	98	97	95
	2	0,00	6,96	9,03	2,57	19	98	96	97
	3	0,00	9,71	7,51	4,71	22	98	95	97
	MÉDIA	0,93	7,83	8,34	3,63	20	98	96	96
13	1		3,43	6,11	1,93		92	98	94
	2		4,71	8,09	1,27		97	96	93
	3		4,11	11,18	2,41		97	95	94
	MÉDIA		4,08	8,46	1,87		95	96	94
14	1		6,79	8,95	3,45		96	93	89
	2		5,10	8,74	3,24		94	87	94
	3		5,56	8,88	3,82		93	91	92
	MÉDIA		5,82	8,86	3,50		94	90	92
15	1		4,56	7,36	2,62		92	87	88
	2		4,28	6,37	3,12		91	78	92
	3		4,72	6,60	4,50		90	86	88
	MÉDIA		4,52	6,78	3,41		91	84	89
16	1		3,92	8,05	2,48		93	85	88
	2		4,64	11,32	2,43		93	81	91
	3		4,08	11,64	3,52		90	83	89
	MÉDIA		4,21	10,34	2,81		92	83	89

ANEXO B (Continuação) – Taxa de brotamento (%) e viabilidade celular (%) das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	TAXA DE BROTAMENTO (%)				VIABILIDADE (%)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
17	1		5,53	7,23	3,36		90	86	87
	2		5,86	10,08	3,15		90	79	90
	3		6,90	8,39	3,06		88	81	87
	MÉDIA		6,10	8,57	3,19		89	82	88
18	1		3,90	2,73	1,33		90	73	87
	2		4,38	3,79	0,50		89	70	88
	3		3,97	6,08	2,19		88	71	88
	MÉDIA		4,08	4,20	1,34		89	71	88
19	1		2,54	7,11	1,17		87	64	82
	2		1,59	8,42	0,49		83	64	85
	3		3,86	5,32	3,12		80	61	84
	MÉDIA		2,66	6,95	1,59		83	63	84
20	1		4,49	8,24	1,31		86	62	80
	2		2,90	7,88	1,60		86	52	84
	3		2,46	13,11	1,69		84	58	82
	MÉDIA		3,28	9,74	1,53		85	57	82

ANEXO C – Contaminação bacteriana (cel/mL x 10⁷) e teores de glicerol (g/100mL) nos vinhos brutos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (cel/ml x 10 ⁷)				GLICEROL NO VINHO (g/100mL)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
INICIAL	1								
	2								
	3								
	MÉDIA	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10				
1	1					0,392	0,488	0,404	0,471
	2					0,440	0,461	0,410	0,482
	3					0,375	0,470	0,380	0,475
	MÉDIA	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	0,402	0,473	0,398	0,476
2	1								
	2								
	3								
	MÉDIA	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10				
3	1								
	2								
	3								
	MÉDIA	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10				
4	1								
	2								
	3								
	MÉDIA	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10				
5	1	5,45	6,43	4,32	3,51	0,360	0,418	0,419	0,415
	2	7,28	4,01	5,27	4,25	0,444	0,441	0,386	0,422
	3	6,11	2,31	3,97	4,27	0,421	0,449	0,371	0,442
	MÉDIA	6,28	4,25	4,52	4,01	0,408	0,436	0,392	0,426
6	1	3,81	1,95	0,95	1,27				
	2	4,63	1,54	1,45	1,40				
	3	3,54	2,04	0,73	0,77				
	MÉDIA	3,99	1,84	1,04	1,15				
7	1	3,22	1,45	0,73	0,14				
	2	4,09	2,68	1,68	0,18				
	3	3,45	2,81	0,55	0,10				
	MÉDIA	3,59	2,31	0,99	0,14				

ANEXO C (Continuação) – Contaminação bacteriana (cel/mL x 10⁷) e teores de glicerol (g/100mL) nos vinhos brutos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	CONTAMINAÇÃO				GLICEROL NO VINHO (g/100mL)			
		BACTERIANA (cel/ml x 10 ⁷)							
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
8	1	3,81	0,55	0,45	0,25				
	2	2,68	0,36	0,14	0,18				
	3	1,81	0,27	0,18	0,21				
	MÉDIA	2,77	0,39	0,26	0,21				
9	1	3,31	0,41	0,82	0,38				
	2	2,31	0,18	1,04	0,18				
	3	2,72	0,50	0,55	0,25				
	MÉDIA	2,78	0,36	0,80	0,27				
10	1	6,24	1,00	1,68	3,41				
	2	6,72	0,87	1,96	2,32				
	3	5,19	1,36	1,27	1,50				
	MÉDIA	6,05	1,08	1,64	2,41				
11	1	9,27	1,72	1,45	2,77				
	2	12,60	1,04	2,50	1,45				
	3	14,10	1,31	1,31	1,77				
	MÉDIA	11,99	1,36	1,75	2,00				
12	1	19,70	2,18	3,78	2,59	0,751	0,548	0,465	,537
	2	17,90	2,46	2,82	1,82	0,701	0,539	0,473	0,547
	3	17,60	1,87	3,96	1,64	0,723	0,545	0,460	0,549
	MÉDIA	18,40	2,17	3,52	2,02	0,725	0,544	0,466	0,544
13	1		2,91	4,27	3,13				
	2		2,36	3,91	2,45				
	3		3,27	3,68	1,77				
	MÉDIA		2,85	3,95	2,45				
14	1		10,10	18,90	10,10	0,631	0,558	0,626	
	2		6,35	15,47	7,35	0,612	0,577	0,609	
	3		7,10	16,42	7,30	0,611	0,587	0,615	
	MÉDIA		7,85	16,93	8,25	0,618	0,574	0,617	

ANEXO C (Continuação) – Contaminação bacteriana (cel/mL x 10⁷) e teores de glicerol (g/100mL) nos vinhos brutos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (cel/ml x 10 ⁷)				GLICEROL NO VINHO (g/100mL)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
15	1		2,91	20,90	9,04				
	2		6,32	20,40	6,91				
	3		7,59	19,90	9,36				
	MÉDIA		5,61	20,40	8,44				
16	1		5,19	22,20	7,46				
	2		7,87	19,40	5,96				
	3		6,37	23,60	6,60				
	MÉDIA		6,48	21,73	6,67				
17	1		4,30	20,80	8,36				
	2		5,70	18,90	5,41				
	3		5,95	21,40	5,59				
	MÉDIA		5,32	20,37	6,45				
18	1		8,01	21,90	8,47				
	2		7,65	21,40	8,78				
	3		8,83	22,30	10,30				
	MÉDIA		8,16	21,87	9,18				
19	1		7,23	23,20	9,77				
	2		5,32	23,10	8,45				
	3		6,95	22,30	10,10				
	MÉDIA		6,50	22,87	9,44				
20	1		8,09	22,60	10,60	0,524	0,663	0,541	
	2		7,23	21,80	8,19	0,529	0,672	0,503	
	3		6,54	23,00	9,24	0,580	0,681	0,548	
	MÉDIA		7,29	22,47	9,34	0,544	0,672	0,531	

ANEXO D – Teores de etanol (% v/v) e açúcares residuais (g/100 mL) nos vinhos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	ETANOL NO VINHO (% v/v)				AÇÚCARES RESIDUAIS (g/100mL)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
INICIAL	1								
	2								
	3								
	MÉDIA	5,50	5,44	5,40	5,38				
1	1	8,50	8,20	8,25	8,15	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
	2	8,40	8,20	8,20	8,20	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
	3	8,40	8,20	8,30	8,15	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
	MÉDIA	8,43	8,20	8,25	8,17	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
2	1	8,60	8,55	8,55	8,55				
	2	8,65	8,50	8,60	8,55				
	3	8,60	8,50	8,60	8,60				
	MÉDIA	8,62	8,52	8,58	8,57				
3	1	8,70	8,70	8,75	8,70				
	2	8,80	8,65	8,75	8,70				
	3	8,75	8,65	8,75	8,65				
	MÉDIA	8,75	8,67	8,75	8,68				
4	1	8,65	8,55	8,65	8,55				
	2	8,60	8,50	8,65	8,55				
	3	8,60	8,50	8,70	8,55				
	MÉDIA	8,62	8,52	8,67	8,55				
5	1	8,50	8,45	8,50	8,50	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
	2	8,50	8,50	8,55	8,50	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
	3	8,55	8,45	8,60	8,50	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
	MÉDIA	8,52	8,47	8,55	8,50	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050
6	1	7,65	7,65	7,75	7,65				
	2	7,75	7,65	7,80	7,65				
	3	7,80	7,60	7,85	7,70				
	MÉDIA	7,73	7,63	7,80	7,67				
7	1	7,75	7,75	7,75	7,70				
	2	7,75	7,70	7,85	7,80				
	3	7,80	7,65	7,85	7,75				
	MÉDIA	7,77	7,70	7,82	7,75				
8	1	7,80	7,80	7,70	7,80				
	2	7,75	7,75	7,75	7,80				
	3	7,80	7,70	7,70	7,75				
	MÉDIA	7,78	7,75	7,72	7,78				

ANEXO D (Competição) – Teores de etanol (% v/v) e açúcares residuais (g/100 mL) nos vinhos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	ETANOL NO VINHO (% v/v)				AÇÚCARES RESIDUAIS (g/100mL)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
9	1	7,70	7,75	7,75	7,75	0,103	0,074	0,069	0,100
	2	7,70	7,75	7,80	7,80	0,075	0,061	0,072	0,064
	3	7,80	7,70	7,85	7,80	0,060	0,069	0,074	0,059
	MÉDIA	7,73	7,73	7,80	7,78	0,079	0,068	0,072	0,074
10	1	9,50	11,70	11,45	11,60				
	2	10,45	11,70	11,55	11,65				
	3	10,50	11,65	11,60	11,65				
	MÉDIA	10,15	11,68	11,53	11,63				
11	1	7,85	11,85	11,90	12,00	6,368	0,132	0,135	0,126
	2	6,60	11,85	11,90	11,90	7,597	0,151	0,117	0,145
	3	7,05	11,90	12,00	11,90	5,579	0,097	0,120	0,105
	MÉDIA	7,17	11,87	11,93	11,93	6,515	0,127	0,124	0,125
12	1	7,15	11,90	11,95	12,00	6,711	0,123	0,050	0,099
	2	6,35	11,85	12,15	11,95	7,680	0,138	0,059	0,104
	3	6,65	11,90	12,15	12,05	7,283	0,080	0,108	0,112
	MÉDIA	6,72	11,88	12,08	12,00	7,245	0,114	0,072	0,105
13	1		12,05	12,05	11,95				
	2		12,05	12,10	12,00				
	3		12,05	12,10	12,00				
	MÉDIA		12,05	12,08	11,98				
14	1		11,95	11,90	11,85		0,106	0,115	0,113
	2		11,95	11,85	11,90		0,104	0,098	0,106
	3		11,90	11,80	11,90		0,128	0,108	0,129
	MÉDIA		11,93	11,85	11,88		0,113	0,107	0,116
15	1		10,00	10,05	10,05				
	2		10,05	9,95	10,10				
	3		9,95	9,95	10,00				
	MÉDIA		10,00	9,98	10,05				
16	1		9,85	9,75	9,90				
	2		9,90	9,70	9,95				
	3		9,85	9,65	9,90				
	MÉDIA		9,87	9,70	9,92				

ANEXO D (Competição) – Teores de etanol (% v/v) e açúcares residuais (g/100 mL) nos vinhos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	ETANOL NO VINHO (% v/v)				AÇÚCARES RESIDUAIS (g/100mL)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
17	1		9,80	9,60	9,80		0,061	0,069	0,077
	2		9,75	9,40	9,80		0,079	0,076	0,075
	3		9,75	9,45	9,80		0,065	0,097	0,093
	MÉDIA		9,77	9,48	9,80		0,068	0,081	0,082
18	1		10,10	9,55	10,10				
	2		10,15	9,30	10,20				
	3		10,15	9,30	10,05				
	MÉDIA		10,13	9,38	10,12				
19	1		10,00	9,55	10,05				
	2		10,05	9,40	10,10				
	3		9,95	9,30	10,00				
	MÉDIA		10,00	9,42	10,05				
20	1		9,95	9,45	10,00		0,075	0,069	0,089
	2		9,95	9,40	10,00		0,073	0,092	0,070
	3		9,90	9,40	9,80		0,053	0,081	0,078
	MÉDIA		9,93	9,42	9,93		0,067	0,081	0,079

ANEXO E – Teores de lactato (g/L) e acetato (g/L) nos vinhos das leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	LACTATO NO VINHO (g/L)				ACETATO NO VINHO (g/L)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1	PAN	PE-2	JP-1	ST-1
1	1	0,440	0,444	0,475	0,447	0,308	<0,120	<0,120	<0,120
	2	0,421	0,478	0,521	0,460	0,228	<0,120	<0,120	<0,120
	3	0,437	0,441	0,458	0,507	0,371	<0,120	<0,120	<0,120
	MÉDIA	0,433	0,454	0,485	0,471	0,302	<0,120	<0,120	<0,120
5	1	1,589	1,603	1,631	1,588	0,422	0,482	0,261	0,383
	2	1,787	1,668	1,638	1,599	0,408	0,391	0,308	0,450
	3	1,698	1,627	1,594	1,645	0,480	0,337	0,317	0,412
	MÉDIA	1,691	1,633	1,621	1,611	0,437	0,403	0,295	0,415
12	1	8,266	3,245	4,073	3,437	4,258	1,280	1,259	1,334
	2	8,044	3,373	4,268	3,539	4,113	1,200	1,370	1,391
	3	7,647	3,245	4,306	3,497	3,892	1,314	1,359	1,419
	MÉDIA	7,986	3,288	4,216	3,491	4,088	1,265	1,329	1,381
14	1		7,499	8,687	7,879		2,043	2,339	2,142
	2		7,449	9,372	7,841		2,021	2,554	2,102
	3		7,401	9,959	7,946		2,045	2,705	2,168
	MÉDIA		7,450	9,339	7,889		2,036	2,533	2,137
20	1		3,394	6,531	3,913		1,321	2,599	1,394
	2		3,670	6,847	3,656		1,388	2,770	1,310
	3		4,010	7,233	4,053		1,489	2,876	1,494
	MÉDIA		3,691	6,870	3,874		1,399	2,748	1,399

ANEXO F – Teores celulares de trealose (% na matéria seca) nas leveduras PAN, PE-2, JP-1 e ST-1 no transcorrer de 20 ciclos fermentativos.

CICLOS	Repetição	TREALOSE (% de gramas por massa seca)			
		PAN	PE-2	JP-1	ST-1
1	1	2,22	6,10	7,71	5,34
	2	2,12	6,06	7,41	5,34
	3	2,18	6,08	7,46	5,24
	MÉDIA	2,18	6,08	7,53	5,31
5	1	2,77	7,52	11,57	7,92
	2	3,28	6,55	12,10	7,60
	3	3,34	7,09	11,89	8,07
	MÉDIA	3,13	7,05	11,85	7,86
12	1	3,21	8,23	7,89	9,48
	2	2,57	8,44	8,13	9,38
	3	2,98	9,59	8,40	10,20
	MÉDIA	2,92	8,75	8,14	9,69
14	1		8,65	8,48	11,21
	2		9,01	8,90	9,65
	3		8,89	9,47	9,29
	MÉDIA		8,89	8,95	10,05
20	1		7,74	5,51	9,10
	2		8,59	5,08	10,11
	3		7,84	5,49	9,31
	MÉDIA		8,06	5,36	9,51