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

**Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da
biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**

Renata Maria Christofoleti Furlan

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

**Piracicaba
2012**

Renata Maria Christofoleti Furlan
Bacharel em Biotecnologia

**Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da
biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**

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
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Furlan, Renata Maria Christofoleti

Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras / Renata Maria Christofoleti Furlan.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

126 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Saccharomyces cerevisiae 2. Seleção 3. Etanol 4. Teor alcoólico 5. Fermentação alcoólica - Eficiência I. Título

CDD 589.23
F985s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

À meu querido amor, Luis, pelo incentivo, carinho e motivação.

Obrigada por sempre acreditar em mim!!

Aos meus pais, Edna e Osmar, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas, por serem exemplos de honestidade e bondade e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

Obrigada por tudo!!

À toda minha família, meus irmãos Josiane, Marco e Tais, meus cunhados Cintia e Ricardo, e meus sobrinhos lindos Kauã e Eloá,

Obrigada pela convivência e por momentos tão felizes em minha vida!!

À minha sogra querida, Janele,

Obrigada pelo carinho, apoio e incentivo sempre!!

Vocês são a razão do meu viver!!

Amo muito vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força interior que me conforta a cada dia e me faz seguir em frente sem desanimar e pela proteção.

Ao meu marido, Luis, por todo amor e carinho, e por me incentivar sempre.

Aos meus pais, Edna e Osmar, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

A toda minha família, pelo apoio.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pelo aprendizado, dedicação, incentivo e por me guiar na execução deste trabalho. Obrigada por confiar em mim e enriquecer meu conhecimento.

Ao amigo e técnico do laboratório, Cometa, por estar sempre disposto a ajudar e por tornar essa longa caminhada tão alegre.

Aos amigos do laboratório, Natália, Nara, Stefania, Camila, Juliana, Thalita, Elisângela e Elisa, pela amizade, ajuda, convivência e pelos momentos de descontração, risadas e altos papos. Em especial à Camila pela imensa ajuda nas análises microbiológicas.

Ao CNPq, na pessoa do Prof. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Coordenador do Projeto intitulado “Rede Nacional de Pesquisa em Leveduras. Prospecção, Biologia de Sistemas, Domesticação e desenvolvimento de cepas para a fermentação industrial no Brasil”, Proc. 560696/2010-8, referente ao edital CNPq 27/2010, pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, na pessoa do Prof. Carlos Augusto Rosa, Coordenador do Projeto intitulado “Biodiversidade de Leveduras Brasileiras aplicada à produção de Biocombustíveis”, Proc. 560715/2010-2, referente ao edital CNPq 27/2010, pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

*“Superação é ter a humildade de
aprender com o passado, não se
conformar com o presente e
desafiar o futuro.”*

HUGO BETHLEM

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e fermentação alcoólica	17
2.2 Fermentação com alto teor alcoólico.....	18
2.3 Fatores estressantes em levedura.....	21
2.3.1 Etanol.....	22
2.3.2 Temperatura.....	24
2.3.3 Pressão osmótica	25
2.3.4 pH e ácidos orgânicos.....	26
2.4 Metabólitos indicativos de fatores estressantes sobre a levedura.....	29
2.4.1 Trealose	29
2.4.2 Glicogênio	31
2.4.3 Glicerol.....	31
3 OBJETIVO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
4.2 Coleta de leveduras nas destilarias e análise pela cariotipagem eletroforética	35
4.3 Ensaio de crescimento em microplaca.....	36
4.3.1 Pré-seleção das linhagens para tolerância a alto teor de etanol.....	37
4.3.2 Avaliação de 10 diferentes meios para diferenciação fisiológica entre a linhagem PE-2 e a de panificação	37
4.3.3 Avaliação de 16 meios seletivos para maior diferenciação entre as linhagens PE-2 e a de panificação.....	38
4.3.4 Avaliação dos meios selecionados sobre o crescimento diferencial das linhagens PE-2 e de panificação em frascos com maior volume (em relação às microplacas).....	39
4.3.5 Seleção prévia para crescimento com o meio R	39
4.4 Manutenção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.5 Pré-seleção das linhagens provenientes do screening com o meio R por meio de experimento de fermentação com reciclo celular e incrementos nos teores alcoólicos	40
4.5.1 Multiplicação das linhagens	40
4.5.2 Preparo do mosto de fermentação	41
4.5.3 Condução da fermentação	41

4.6 Avaliação final das linhagens selecionadas quanto ao desempenho fermentativo em condições de reciclo e alto teor alcoólico	42
4.6.1 Multiplicação das linhagens selecionadas.....	42
4.6.2 Preparo do mosto de fermentação	42
4.6.3 Condução da fermentação	43
4.7 Determinação do teor de etanol nos vinhos delevurados	43
4.8 Quantificação de glicerol e açúcares residuais nos vinhos	43
4.9 Determinação da biomassa úmida.....	44
4.10 Estimativa da viabilidade celular da levedura.....	44
4.11 Extração e quantificação da trealose	44
4.12 Extração e quantificação de glicogênio	44
4.13 Cálculo dos parâmetros de fermentação	45
4.14 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Isolamento de linhagens mediante a cariotipagem das amostras de levedo coletadas em 5 destilarias durante a safra 2010/2011	47
5.2 Pré-seleção das linhagens para tolerância a alto teor de etanol	53
5.2.1 Avaliação de 10 diferentes meios para diferenciação fisiológica entre a linhagem PE-2 e a de panificação.....	55
5.2.2 Avaliação de 16 meios seletivos para maior diferenciação entre as linhagens PE-2 e de panificação	58
5.2.3 Avaliação dos meios selecionados sobre o crescimento diferencial das linhagens PE-2 e de panificação em frascos com maior volume (em relação às microplacas)	60
5.3 Seleção prévia para crescimento com o meio R	61
5.4 Pré-seleção das linhagens provenientes do screening com o meio R por meio de experimento de fermentação com reciclo celular e incrementos nos teores alcoólicos.....	65
5.5 Avaliação final das linhagens selecionadas quanto ao desempenho fermentativo em condições de reciclo e alto teor alcoólico	72
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS	105

RESUMO

Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras

O Brasil é o segundo maior produtor e um dos maiores exportadores de etanol no mundo e tal biocombustível tem grande impacto na economia do país. A expectativa é de grande demanda por tal produto, quer pelo crescente consumo interno, como também em decorrência do fim do protecionismo nos Estados Unidos. Portanto, o Brasil deverá produzir mais etanol e a um custo mais reduzido para manter a competitividade frente aos combustíveis fósseis. Dentre as inovações tecnológicas estaria a fermentação com alto teor alcoólico. Contudo, um dos fatores limitantes para a implantação desta tecnologia é a ausência de leveduras apropriadas para tolerar as condições severas impostas por este tipo de fermentação, onde múltiplos estresses são impostos simultaneamente às leveduras. Assim, este trabalho se propôs a selecionar, da biodiversidade de leveduras encontradas nas destilarias brasileiras, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade de conduzir fermentações com alto teor alcoólico e em condições de reciclo celular. A estratégia de seleção consistiu na busca de linhagens com tolerâncias múltiplas, frente aos estresses etanólico, osmótico, ácido e térmico. Para tal, um total de 525 linhagens, obtidas de diferentes destilarias, foram submetidas a uma seleção para destacar linhagens com múltipla tolerância. Cerca de metade destas linhagens foram submetidas a uma seleção prévia avaliando-se o crescimento ($D.O_{570nm}$, durante 24 horas a 30°C) em meio constituído de mosto misto (melaço e caldo de cana) com 25% de ART, selecionando 200 linhagens. Estas, acrescidas de mais 249 não avaliadas no meio anterior, foram igualmente submetidas a processo seletivo em meio contendo múltiplos estresses (etanólico, osmótico, ácido e térmico). Tal meio foi desenvolvido após avaliações de 26 combinações com os diferentes estresses acima mencionados e com diferentes intensidades. O objetivo foi buscar um meio que melhor discriminasse as tolerâncias das leveduras referências: as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e de panificação, com e sem capacidade de implantação no processo industrial, respectivamente. A tolerância foi avaliada pela formação de biomassa ($D.O_{570nm}$, durante 24 horas a 30°C). Assim, tal meio seletivo permitiu a seleção de 34 linhagens com perfis de tolerância igual ou superior ao da linhagem PE-2. Estas linhagens foram, a seguir, avaliadas quanto à viabilidade celular e ao crescimento em fermentações de mosto misto com teores crescentes de açúcares, ao longo de 10 reciclos a 30°C, atingindo teores de etanol de 15 a 16% (v/v). As 10 linhagens com os melhores desempenhos foram submetidas à avaliação final em fermentações simulando condições industriais, em reciclos fermentativos a 32°C empregando-se mosto misto com teores crescentes de açúcares, permitindo aumentos nos teores de etanol de 11 a 15% (v/v) ao longo dos reciclos. Para esta avaliação final os seguintes parâmetros foram estimados: rendimento em etanol, formação de biomassa e glicerol, teores de açúcares residuais, viabilidade celular, e teores celulares dos carboidratos de reserva (glicogênio e trealose). Pelo menos 4 linhagens mostraram atributos fermentativos superiores ao da linhagem referência (PE-2), permitindo concluir que linhagens capazes de conduzirem a fermentação com alto teor de etanol podem ser obtidas da biodiversidade encontrada no ambiente das destilarias.

Palavras - chave: Fermentação com reciclo celular; *Saccharomyces cerevisiae*; Alto teor alcoólico; Eficiência fermentativa

ABSTRACT

Yeast selection from the biodiversity of Brazilian distilleries for high ethanol content fermentation

Brazil is the second largest ethanol producer and one of the leading ethanol exporter in the world, and this biofuel has great impact on the country economy. Huge demand is expected for this product, not only to supply the growing domestic consumption but due to the end of the United States market protectionism. In view of this, Brazil should produce more ethanol and at a lower cost to maintain competitiveness in relation to fossil fuels. One of the technological approaches which emerges is the high ethanol content fermentation. However, one of the limiting factors for this technology is the absence of proper strains to face the very harsh fermentation condition, where several stresses are simultaneously imposed to the fermenting yeast. This work aimed at selecting *Saccharomyces cerevisiae* strains from the biodiversity of yeasts found in Brazilian distilleries to conduct high ethanol fermentation with cell reuse. The selection strategy was to search for multiple tolerant strains to ethanol, acid, osmotic and thermal stresses. For that, a total of 525 strains, which were obtained from several distilleries, were subjected to a selection in order to highlight multi-tolerant strains. About half of these strains were subjected to a pre-screening procedure to evaluate growth (O.D._{570nm}, for 24 hours at 30°C) in medium containing molasses and sugarcane juice (25% TRS), and 200 strains were selected. These 200 strains, together with 249 strains not previously evaluated, were screened in a medium imposing multiple stresses (ethanol, acid, osmotic and thermal). This medium was chosen after assessments of 26 different medium formulations with the above mentioned stresses and with different intensities. The purpose of that was to find a medium which best discriminate the tolerance of the reference yeasts: PE-2 and bakery *Saccharomyces cerevisiae* strains, with and without ability to persist in the industrial process, respectively. The strain tolerance was evaluated by biomass formation (O.D._{570nm}, for 24 hours at 30°C). By this mean 34 strains were selected displaying similar or superior performance in comparison with PE-2 strain. These strains were then assessed for cell viability and growth in cell reuse fermentations (10 cycles), using cane juice/molasses substrates with increasing sugar content, at 30°C, reaching 15-16% ethanol (v/v). The 10 strains with the best performances were subjected to final evaluation in fermentations simulating the industrial process with cell reuse, at 32°C, using the same substrate with increasing sugar content, which allowed rises in ethanol content from 11 to 15% (v/v) over the cycles. For this final evaluation, the following parameters were determined: ethanol yield, biomass and glycerol formation, residual sugar levels, cell viability and storage carbohydrate levels (trehalose and glycogen). At least four strains showed superior fermentative attributes to reference strain (PE-2), leading to the conclusion that strains able to conduct high ethanol content fermentations can be obtained from the natural biodiversity found in Brazilian distilleries.

Keywords: Cell reuse fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; High ethanol content; Ethanol yield

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas que movimenta a economia brasileira, sendo que o Brasil, além de ser o maior produtor de cana, é o primeiro do mundo na produção de açúcar e o segundo maior produtor de etanol, e vem ganhando cada vez mais espaço no mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. A produção de etanol conta com projeções positivas para os próximos anos, podendo alcançar 58,8 bilhões de litros em 2019, mais que o dobro da registrada em 2008 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2012).

Aliado a isso, o fim do protecionismo dos Estados Unidos após mais de 30 anos vem abrir portas para o etanol brasileiro. Após anos de incentivo do governo americano à produção doméstica e elevadas tarifas contra importações, o fim das barreiras tarifárias, que impediam que o etanol brasileiro chegasse ao mercado americano com preços competitivos, vem impor a necessidade de crescimento e readequação do setor sucroenergético brasileiro para que possa atender a demanda do produto dentro e fora do país (União da Indústria de Cana-de-Açúcar - UNICA, 2011). Este cenário acaba por denotar a importância do Brasil como produtor mundial de etanol e a crescente demanda do produto no futuro.

Tendo em vista esse cenário, uma tecnologia que desponta, recentemente, como atrativa e promissora para a produção de etanol aqui no Brasil é a denominada “Very High Gravity (VHG) Fermentation”, ou seja, fermentação com alto teor alcoólico. Neste tipo de fermentação, utiliza-se um mosto contendo maior concentração de açúcares do que o praticado atualmente, para que teores elevados de etanol sejam obtidos. Inúmeras vantagens, tanto ponto de vista energético e econômico quanto ambiental, despertam interesse nessa tecnologia. Menor consumo de água por litro de etanol produzido, menor consumo de vapor na destilação do vinho devido à maior concentração de etanol, redução do volume de vinhaça, cuja carga poluente é enorme, economias com o transporte e distribuição desse resíduo, minimização da contaminação bacteriana pela maior concentração de etanol no vinho são benefícios que tornam essa tecnologia extremamente atrativa.

No entanto, o fator limitante vem a ser a tolerância das leveduras hoje disponíveis frente aos estresses impostos em uma fermentação com alto teor alcoólico. Além de todos os tipos de estresses inerentes ao processo fermentativo, dois em especial são potencializados: o estresse provocado pelo etanol, o qual por ser um metabólito tóxico exerce grande inibição no crescimento celular da levedura, e o aumento da pressão osmótica devido à alta concentração de açúcares no início da fermentação (PIDDOCKE et al., 2009; PEREIRA et al., 2011). Somado a isso, no processo fermentativo brasileiro, as leveduras são impostas às condições de

reciclo celular, no qual a biomassa, após o término da fermentação, é coletada por centrifugação e utilizada no próximo ciclo fermentativo. Tal condição, aliada a outros estresses, contribui para perdas na viabilidade e taxa de propagação celular e no rendimento do processo (BASSO et al., 2008). Todos esses fatores associados a uma fermentação com teores elevados de etanol impõem às leveduras uma condição peculiar que exige linhagens com capacidade de resistência e permanência no processo.

Diante dessa situação, faz-se necessário encontrar linhagens mais robustas, e certamente a grande biodiversidade de leveduras encontradas nas dornas de fermentação (BASSO et al., 2008) se constitui num manancial de novas linhagens, dentre as quais poder-se-á selecionar aquelas com os atributos requeridos para uma fermentação com elevado teor etanólico. Assim, os benefícios desse tipo de fermentação somente seriam obtidos com novas linhagens.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* e fermentação alcoólica

A levedura do gênero *Saccharomyces* é a mais amplamente utilizada na indústria de fermentados que tem como produto final o álcool (ANDRIETTA et al., 2006). Dentre vários microrganismos que têm sido explorados para a produção de etanol, a levedura *S. cerevisiae* ainda permanece como a principal espécie e se destaca por ser uma excelente produtora de etanol dentre numerosos microrganismos fermentativos (BAI et al., 2008; MA; LIU, 2010).

Os fatores que levam esse microrganismo a ser o mais indicado para essa finalidade são: capacidade de converter os açúcares rapidamente em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido. Todos esses atributos são desejáveis para a condução de processos de produção de álcool (ANDRIETTA et al., 2006).

Na fermentação alcoólica, a principal rota metabólica envolvida é a glicólise. Por essa via uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Sob condições de anaerobiose, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂ (Figura 1). Além de etanol e CO₂, vários subprodutos também são sintetizados em rotas metabólicas alternativas. O glicerol é o principal deles, além de ácidos orgânicos e alcoóis superiores produzidos em níveis mais baixos (BAI et al., 2008).

Para a levedura, o objetivo primordial ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é sintetizar energia na forma de ATP (adenosina trifosfato), a qual é necessária à manutenção, crescimento e multiplicação celular. Na transformação do açúcar em etanol e CO₂ (Figura 1), 12 reações ocorrem em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tais enzimas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, temperatura, pH, entre outros) alguns que estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo (BASSO et al., 1996).

Por serem microrganismos anaeróbios facultativos, as leveduras metabolizam os açúcares tanto pela via fermentativa como pela via respiratória (oxidativa). O que determina a ocorrência de cada um destes processos é a condição do meio. *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de fermentar açúcares mesmo na presença de oxigênio, exibindo flexibilidade na regulação das enzimas que mediam o metabolismo fermentativo e oxidativo (FEREA et al., 1999). O denominado efeito Pasteur, no qual a taxa de consumo de açúcar é reduzida em condições de aerobiose, é insignificante nesta espécie (BARNETT; ENTIAN, 2005). No

entanto, quando a glicose é fornecida em concentrações elevadas, independentemente da presença ou não de oxigênio, a levedura realiza fermentação. Isso é conhecido como efeito Crabtree, e ocorre por repressão catabólica das enzimas respiratórias (DE DEKEN, 1966 apud BREUNIG et al., 2000).

Figura 1 – Rota metabólica da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* (BAI et al., 2008)

2.2 Fermentação com alto teor alcoólico

As indústrias alcooleiras têm almejado altas concentrações de etanol em seus processos fermentativos desde que vantagens significativas nos âmbitos energético, econômico e ambiental têm sido destacadas.

Na década de 80, a “High Gravity (HG) Fermentation”, onde se fermenta com um substrato contendo 18-22% (p/v) de açúcares totais e obtêm-se cerca de 10-12% (v/v) de etanol, foi proposta e comercializada com êxito. Posteriormente, na década de 90, foi proposta a “Very High Gravity (VHG) Fermentation”, após pesquisas revelarem que linhagens de *S. cerevisiae* tinham potencial para tolerar maiores teores de etanol (BAI et al., 2008; PULIGUNDLA et al., 2011).

A “VHG fermentation”, que pode ser traduzida como fermentação com alto teor alcoólico, consiste na fermentação de meios contendo mais que 25% (p/v) de açúcares totais,

com o objetivo de atingir concentrações de etanol acima de 15% (v/v) (THOMAS et al., 1996; LI et al., 2009a).

Esse tipo de fermentação desponta como uma tecnologia atrativa devido ao apelo econômico e ambiental. O grande interesse na fermentação com alto teor alcoólico decorre de vantagens econômicas como: obtenção de maiores concentrações de etanol, menor investimento de capital, redução nos custos de mão-de-obra e energia por litro de etanol produzido, menor consumo de água, facilidades de limpeza e sanitização, melhor assepsia, entre outros (THOMAS et al., 1996).

No entanto, o apelo ambiental também tem se destacado devido à redução no consumo de água e no volume de vinhaça produzida. Na fermentação com alto teor alcoólico, uma redução de aproximadamente 40% no consumo de água pode ser obtida através do preparo do mosto com alta concentração de sólidos, da mesma forma notáveis economias de energia em outras etapas do processo podem ser esperadas porque há menos fluido para aquecer, resfriar e destilar (PULIGUNDLA et al., 2011).

Cerca de 30% do custo operacional total do processo advém da etapa de destilação. Operando com um teor alcoólico mais elevado, os custos com a destilação podem ser reduzidos, devido ao menor consumo de vapor e consequentemente menor consumo de água. Além disso, o volume de vinhaça pode ser reduzido pela metade quando se conduz fermentações com elevados teores alcoólicos (PULIGUNDLA et al., 2011).

Em fermentações tradicionais são produzidos cerca de 9 a 14 litros de vinhaça para cada litro de etanol obtido (JIMÉNEZ et al., 2003). A carga poluente da vinhaça é extremamente elevada por ser rica em matéria orgânica e minerais (WILKIE et al., 2000; PANT; ADHOLEYA, 2007). Disposições inadequadas e sem controle podem comprometer o solo e as águas dos lençóis freáticos, causando sérios prejuízos ao meio ambiente. Assim, menores volumes desse resíduo seria de um interesse ímpar.

Ademais, um menor consumo de antibióticos também seria possível, uma vez que um maior teor alcoólico exerceria maior efeito repressor sobre a contaminação bacteriana (THOMAS et al., 1996). Assim sendo, ganhos adicionais na eficiência do processo brasileiro de produção de etanol poderiam ser obtidos mediante a fermentação com maior teor alcoólico.

No entanto, o fator limitante vem a ser a tolerância das leveduras hoje disponíveis (mesmo as selecionadas) para suportar o estresse de uma fermentação industrial com elevado teor alcoólico (13 a 16%), quando atualmente a média estaria ao redor de 8,0-9,0%. Assim é, que a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 fermentou, em ensaio de laboratório, mosto misto (caldo e melaço) atingindo teores alcoólicos de 14% de etanol a 33°C, porém, ao

longo de 6 ciclos apresentou queda da viabilidade celular de 99 para 90% (BASSO et al., 2003). Embora estes dados mostrem a robustez da linhagem, a mesma não é adequada a uma fermentação alcoólica com tal teor alcoólico em condições industriais, devido às ações estressantes contínuas sobre a mesma população de células ao longo dos ciclos fermentativos.

Isso vem denotar uma diferença crucial entre o processo fermentativo empregado no Brasil (que utiliza a cana-de-açúcar) e aqueles de outros países que utilizam cereais (como nos Estados Unidos). Enquanto o processo brasileiro, utilizando-se de centrífugas, reutiliza 95% das células de leveduras de uma fermentação para a seguinte, nos processos que utilizam cereais toda a levedura é descartada. A viabilidade ou vitalidade da levedura ao final de cada ciclo fermentativo é de suprema importância para os processos com ciclos de células, o que não é o caso das fermentações de cereais. A alta densidade de células torna a fermentação mais rápida (6-10 horas), o que não acontece com a fermentação de cereais (ou qualquer outro substrato, como a glicose), que, não dispondo de grande quantidade de biomassa, se inicia a fermentação com pequena quantidade de inóculo. Desse modo, as fermentações são mais lentas (40-60 horas) até a formação de uma biomassa que finalize a fermentação (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2011). Tal condição peculiar do processo brasileiro impõe às leveduras um estresse adicional, além de todos aqueles inerentes ao processo, exigindo linhagens mais robustas que aquelas utilizadas no processo norte americano.

Atualmente, vários estudos têm dirigido esforços na busca de linhagens capazes de suportar fermentações com elevados teores alcoólicos, seja para a produção de cerveja ou álcool (ORTIZ-ZAMORA et al., 2009; HUUSKONEN et al., 2010; STANLEY et al., 2010). Em particular, os trabalhos de Pereira et al., (2010, 2011) avaliaram linhagens de *S. cerevisiae* de processos industriais brasileiros de produção de etanol e de cachaça para fermentação com alto teor alcoólico, dentre essas incluindo a PE-2, que se destacou em ambos os trabalhos.

No entanto, tais fermentações foram conduzidas de modo semelhante à fermentação conduzida nos Estados Unidos, onde o meio altamente concentrado (280-350 g/L de glicose) é adicionado ao inóculo em uma única porção, tornando a fermentação extremamente lenta (100 horas), e sem ciclo celular.

Por tudo, justifica-se a busca de linhagens capazes de tolerar as condições estressantes do processo de produção de etanol brasileiro. Porém, com maior necessidade ainda, linhagens que sejam não apenas tolerantes ao etanol, mas igualmente tolerantes ao processo fermentativo com ciclo de células, no qual a levedura é continuamente submetida aos estresses do processo.

2.3 Fatores estressantes em levedura

Variadas condições estressantes, tanto ambientais quanto fisiológicas, desafiam constantemente todos os organismos vivos. Para lidar com os efeitos deletérios do estresse, as células têm desenvolvido rápidas respostas moleculares com o intuito de reparar os danos e se proteger contra exposições adicionais ao mesmo ou outras formas de estresse (ESTRUCH, 2000; MENSIONIDES et al., 2002).

Para microrganismos, reações a fatores estressantes são de singular importância, pois o ambiente em que vivem é altamente sujeito a variações, tais como temperatura, osmolaridade ou disponibilidade de nutrientes, os quais estão longe de serem constantes. Dentre os microrganismos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem se tornado um modelo de organismo para o estudo de como as células eucarióticas respondem ao estresse. O alto grau de conservação evolucionária das rotas de estresse entre leveduras e eucariotos superiores sugere que a levedura pode servir como um modelo apropriado para a caracterização de respostas a situações estressantes para organismos mais complexos (ESTRUCH, 2000).

No ambiente da fermentação alcoólica, condições estressantes são impostas às leveduras a todo o momento. Alguns são ambientais como deficiência nutricional, altas temperaturas, estresse osmótico por açúcares e sais, acidez, sulfito, contaminação bacteriana, enquanto outros são decorrentes do próprio metabolismo celular da levedura, tais como o acúmulo de etanol e sua correspondente inibição do crescimento celular e da produção do etanol (BAI et al., 2008; BASSO et al., 2008).

Todos são fatores estressantes do processo industrial com os quais as leveduras se deparam (Figura 2). Alguns agem sinergisticamente (DORTA et al., 2006; BAI et al., 2008), particularmente quando há reciclo de células (BASSO et al., 2008), afetando a levedura mais severamente do que um fator atuando isoladamente, o que culmina na redução da viabilidade e vitalidade celular, assim como na produtividade do etanol.

Figura 2 – Fatores estressantes em *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica (INGLEDEW, 1999 apud BAI et al., 2008)

2.3.1 Etanol

As leveduras da espécie *S. cerevisiae* apresentam tolerância ao etanol, no entanto tal tolerância é finita. À medida que o teor de etanol aumenta observa-se uma redução no crescimento e na viabilidade celular (JONES, 1989; PIPER, 1995).

O efeito tóxico do etanol pode causar vários danos às células. O principal alvo de atuação do etanol é a membrana citoplasmática (INGRAM, 1976; JONES, 1989), onde ele age de forma a alterar a polaridade da mesma, modificando sua fluidez (BANAT et al., 1998).

O etanol e outros alcoóis de cadeia curta se alojam no interior hidrofóbico da membrana, se alocando nos espaços resultantes de interações entre os ácidos graxos insaturados e proteínas, o que acaba por restringir o movimento das cadeias dos ácidos graxos e causar um aparente decréscimo na fluidez da membrana (INGRAM, 1976).

No entanto, o etanol, ao inserir-se na região hidrofóbica, aumenta a polaridade da mesma enfraquecendo a barreira hidrofóbica à livre troca de moléculas polares, enfraquece as interações hidrofóbicas e afeta o posicionamento das proteínas na membrana (INGRAM; BUTTKE, 1984 apud SALGUEIRO et al., 1988).

Este dano na integridade da membrana diminui a habilidade celular em manter o gradiente de concentração através da membrana plasmática, e vários sistemas envolvidos no transporte de solutos podem ser afetados. O etanol e outros agentes caotrópicos, como a temperatura, interferem na organização da membrana aumentando sua fluidez e permeabilidade aos íons e outros metabólitos. (INGRAM; BUTTKE, 1984 apud SALGUEIRO et al., 1988).

Em vista disso, pode ocorrer inibição da taxa de captação máxima do sistema de transporte de glicose por mudanças no ambiente lipídico da membrana citoplasmática (LEÃO; van UDEN, 1982), efluxo de compostos como aminoácidos através da célula, o que é potencializado por aumento da temperatura e dos teores de etanol (SALGUEIRO et al., 1988).

Também pode levar ao aumento do influxo passivo de prótons, pois o etanol e outros alcoóis afetam o potencial de membrana e o gradiente de prótons seja pela inibição do efluxo ativo de prótons ou pelo aumento do influxo passivo dos mesmos, afetando vários sistemas de transporte (LEÃO; van UDEN, 1984).

Além disso, algumas enzimas chaves na rota glicolítica, tais como a hexoquinase e a ADH (álcool desidrogenase), podem ser afetadas pelo etanol, e o mesmo também pode prejudicar a captação de nutrientes (PASCUAL, 1988; BAI et al., 2008) e o potencial de membrana pela redução da atividade da enzima ATPase de membrana citoplasmática (PIPER, 1995).

A enzima ATPase de membrana citoplasmática consiste em uma bomba de prótons que tem como função básica criar um gradiente eletroquímico, importante para a captação de nutrientes e regulação do pH intracelular (DUFOUR; GOFFEAU, 1980). No trabalho de Rosa e Sá-Correia (1992), o etanol, em baixas concentrações, ativou a ATPase de membrana em *S. cerevisiae*, já em altas concentrações (8-10% (v/v)) inibiu sua atividade.

No estudo de Cartwright et al., (1987), o etanol, em concentrações de até 2,0M, (11,65% v/v) inibiu a atividade da ATPase na membrana de *S. cerevisiae* em culturas com 8 e 16 horas, e a composição da porção lipídica dos fosfolipídios também sofreu alteração, com a proporção de insaturação diminuindo com a idade da cultura.

Os fosfolipídios da membrana desempenham um papel importante no mecanismo de tolerância ao etanol, e outros fatores fisiológicos tais como composição do meio e modo de alimentação, acúmulo de etanol intracelular, temperatura e pressão osmótica também podem contribuir para tal tolerância (BANAT et al., 1998).

Vários trabalhos têm relatado a importância da composição lipídica da membrana citoplasmática em relação à tolerância ao etanol, mostrando que a membrana apresenta grande versatilidade para se adaptar a esse estresse (INGRAM, 1976; JIMÉNEZ; BENÍTEZ, 1987). Alterações como aumento dos níveis de ergosterol (WALKER-CAPRIOGLIO et al., 1990; VANEGAS et al., 2012), aumento da concentração de ácidos graxos insaturados (YOU et al., 2003; VANEGAS et al., 2012) foram observadas em células de *S. cerevisiae* expostas ao etanol, indicando que a levedura sobrevive melhor com esse ajustes.

Contudo, os mecanismos pelos quais o etanol causa inibição celular ainda permanecem obscuros em muitos aspectos, em especial em nível genético (BAI et al., 2008). A base molecular do mecanismo pelo qual o etanol exerce efeito inibitório na fermentação torna-se complicada, pois o etanol, sendo um agente desnaturante, pode agir não somente sobre as proteínas e provocar inativação ou inibição de enzimas da rota glicolítica, como também pode atuar sobre a integridade das membranas lipídicas, prejudicando outros fatores, como proteínas transportadoras e enzimas associadas à membrana (PASCUAL et al., 1988).

2.3.2 Temperatura

O crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos são profundamente afetados pela temperatura na qual eles crescem (JONES; HOUGH, 1970). Tanto para o crescimento quanto para a atuação das enzimas do metabolismo existe uma temperatura ótima.

Há várias evidências de que as alterações induzidas nas leveduras por níveis tóxicos de etanol são idênticas às provocados pelo calor. Existe um sinergismo entre esses dois fatores, fazendo com que o etanol seja ainda mais severo sob elevadas temperaturas (PIPER, 1995; ALDIGUIER et al., 2004).

Madeira et al., (2010) observaram que o aumento da temperatura e da concentração de etanol estimularam o influxo de prótons através da membrana. Também relataram que o aumento da permeabilidade da mesma pelo etanol foi potencializado pela temperatura, facilitando a entrada de íons H^+ na célula.

Aldiguier et al., (2004) estudaram o efeito da temperatura e do etanol em *S. cerevisiae* através do processo de batelada alimentada a 27, 30, 33, 36 e 39°C. Os melhores resultados foram obtidos a 30 e 33°C, com um pequeno benefício para o crescimento celular a 30°C e para a produção de etanol a 33°C. Sob 39°C a fermentação teve um desempenho muito baixo em termos de crescimento e produção de etanol.

Quando a levedura é exposta ao estresse térmico, elevadas temperaturas se mostram desfavoráveis do ponto de vista energético, causando uma redistribuição dos fluxos catabólicos e anabólicos, e observa-se uma estreita linha entre crescimento, sobrevivência e morte em relação a aumentos na temperatura de crescimento (MENSONIDES et al., 2002).

Há vários fatores que podem induzir a aquisição de termotolerância em leveduras, e os mecanismos concernentes a isso são altamente conservados na natureza. Células vegetativas de *S. cerevisiae* podem adquirir termotolerância através de choque térmico,

desidratação osmótica, exposição a agentes químicos, e limitação de nutrientes (PIPER, 1993).

A exposição ao estresse térmico induz a síntese de proteínas de choque-térmico (hsps) (LINDQUIST; CRAIG, 1988) e o acúmulo de trealose (ATTFIELD, 1987). Ambas as moléculas estão envolvidas na aquisição de termotolerância nas células, embora tal condição não requeira necessariamente essas substâncias. Swan et al., (1998) relataram que células com altos níveis de ergosterol na membrana citoplasmática exibiram maior tolerância ao calor e ao etanol.

Células de *S. cerevisiae* expostas a temperaturas sub-letais mostraram um aumento da termotolerância, e esse processo se mostrou dependente também do tempo de exposição ao calor. Outros fatores como etanol, ácido sórbico e baixo pH externo também induziram tal condição, por uma mecanismo envolvendo o pH e a atividade aumentada da ATPase plasmática (COOTE et al., 1991).

A aquisição de termotolerância e a busca por linhagens com tal característica se faz muito pertinente, partindo do ponto de vista de que as fermentações industriais são conduzidas principalmente com o uso de microrganismos mesofílicos, os quais apresentam uma temperatura ótima de crescimento entre 25-37°C. Assim, o controle da temperatura ao nível ótimo é geralmente usado nos sistemas fermentativos, pois as atividades metabólicas dos microrganismos produzem calor durante este processo. Consequentemente, na ausência de resfriamento, a fermentação pode induzir a um estresse térmico, ocasionando problemas relacionados ao crescimento e à própria fermentação nos microrganismos envolvidos (ABDEL-BANAT et al., 2010).

Linhagens termotolerantes possibilitariam economias no processo, uma vez que gastos com o resfriamento do processo fermentativo seriam minimizados, ainda mais em países tropicais como o Brasil.

2.3.3 Pressão osmótica

O estresse osmótico é um fenômeno universal desde bactérias até plantas e humanos. Fatores estressantes osmóticos tendem a desestabilizar a homeostase celular nos organismos (JOHN et al., 2012), sendo a membrana citoplasmática considerada o alvo primário do dano osmótico (MORRIS et al., 1983).

A exposição celular a condições hiperosmóticas causa, em primeira instância, a perda de água citoplasmática, que diminui a pressão de turgor exercida pela membrana plasmática sobre a parede celular (VARELA; MAGER, 1996), repressão temporária do crescimento na

fase G1 (BELLÍ et al., 2001) e G2 (ALEXANDER et al., 2001), contração ou enrugamento da célula (MORRIS et al., 1983) e numa fase posterior, ocorre o acúmulo de glicerol no citoplasma, como forma de neutralizar a desidratação (MAGER et al., 2002).

Assim como para a temperatura, o aumento da pressão osmótica age de forma sinérgica com o etanol, potencializando o efeito tóxico do mesmo levando a redução da viabilidade celular em *S. cerevisiae* (JOHN et al., 2012). Também se observa que há queda na viabilidade celular de leveduras cultivadas em meio hiperosmótico (99 MPa) à medida que se aumenta a temperatura (BENEY et al., 2001). A forma de alimentação é outro fator que influencia na viabilidade da levedura. No estudo de Nagodawithana et al. (1974), *S. cerevisiae*, quando alimentada em porções de 2,5 ou 5,0 % de açúcar ao invés de uma única porção de 25% de açúcar, exibiram uma melhor taxa de sobrevivência celular.

Em fermentações usando mosto com até 31% de sólidos dissolvidos, o efeito inibitório da elevada pressão osmótica e do alto teor de etanol produzido sobre a viabilidade da levedura foi superado pela suplementação do meio com nitrogênio, ergosterol e ácido oléico. A razão para isso não decorreu do aumento da tolerância da levedura, mas sim da elevação da duração e do nível da síntese de massa celular (CASEY et al., 1984).

Também no trabalho de Thomas et al., (1994), em fermentação com meio contendo 35% de glicose, a viabilidade celular foi mantida acima de 80% quando o meio foi suplementado com aminoácidos, e o consumo de açúcar foi potencializado quando adicionou-se material particulado (farelo de trigo, farinha de soja, etc) ao mesmo.

Apesar do exposto, as células possuem a capacidade de osmorregulação, que é o controle ativo do balanço hídrico e da homeostase celular que são cruciais à vida (HOHMANN et al., 2007). Em *S. cerevisiae*, o sistema osmorregulatório é bem compreendido (HOHMANN et al., 2007; PARMAR et al., 2011). A célula responde ao estresse hiperosmótico primeiramente reprimindo seu crescimento ((BELLÍ et al., 2001; ALEXANDER et al., 2001), depois ocorre o acúmulo de glicerol no interior celular com o objetivo de recuperar o turgor. Isso ocorre pela prevenção do efluxo do glicerol e pelo aumento da síntese do mesmo através da ativação de uma rota sinalizadora conhecida como rota HOG (high-osmolarity glicerol). O glicerol desempenha o papel central na adaptação celular ao estresse osmótico (HOHMANN, 2002; MAGER et al., 2002).

2.3.4 pH e ácidos orgânicos

Vários fatores estressantes como calor, álcool, ácidos orgânicos, dessecação e congelamento podem levar ao declínio do pH intracelular. Consequentemente, as células

devem usar ATP para expelir os prótons através da enzima ATPase de membrana (ATTFIELD, 1997).

A atividade adequada da ATPase de membrana é a base para as leveduras manterem o pH intracelular fisiológico, porque os íons H^+ produzidos durante a fermentação precisam ser continuamente bombeados para fora da célula através da força protomotiva desta enzima (BAI et al., 2008).

Dorta et al., (2006) observaram que o pH de 3,6 se mostrou o fator mais estressante durante a fermentação alcoólica usando as linhagens de *S. cerevisiae* PE-2 e M-26. Esse fator foi que mais contribuiu para a redução da taxa de brotamento e para a produtividade.

No entanto, quando leveduras são crescidas em meio com pH abaixo de 4,0, a atividade da ATPase de membrana triplica, dobrando sua afinidade pelo ATP, sem modificar seu pH ótimo. Essa ativação enzimática é um mecanismo de manutenção do pH intracelular durante o crescimento em meio ácido (ERASO; GANCEDO, 1987). Em fermentações em batelada também se observou a manutenção do pH intracelular próximo à neutralidade apesar da acidificação do meio e do acúmulo de mais de 12% de etanol (DOMBEK; INGRAM, 1987).

Nas fermentações industriais, os valores de pH do mosto geralmente encontram-se na faixa de 4,5 a 5,5 com uma boa capacidade tamponante. No entanto, as leveduras mantêm sua homeostase de forma quase independente do pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido (BASSO et al., 1996). Hernández-Cortés et al., (2010) relataram que, em fermentação contínua de suco de agave para a produção de tequila usando linhagens de *S. cerevisiae*, não houve diferença significativa na produção de biomassa e de etanol em meio com pH controlado (pH 4,0) e sem controle (ajuste natural - pH 2,5).

Além de efeitos no crescimento da levedura, o pH é importante no controle da contaminação bacteriana, a qual é um agente estressante que acarreta perdas significativas no rendimento fermentativo. Por isso a necessidade de se optar entre dois fatores estressantes, como no caso do tratamento ácido, que estressa a levedura, mas acaba sendo benéfico, pois controla a contaminação (BASSO et al., 1996).

Narendranath e Power (2005) relataram que a redução do pH de 5,5 para 4,0 reduziu o crescimento de lactobacilos e sua correspondente produção de ácido láctico, assim como o aumento da concentração de açúcares no meio, aumentando a pressão osmótica. No entanto, isso causou uma redução do etanol produzido pela levedura em pH 4,0, embora não tenha afetado o crescimento da mesma em nenhuma concentração de açúcar em particular.

Da mesma forma, Huang et al., (2011) sugerem conduzir fermentações com valores de pH mais elevados, utilizando meios com elevadas concentrações de sólidos solúveis, como forma de controlar a contaminação e evitar o efeito deletério do baixo pH sobre a levedura. No entanto, isso, na prática, não é de fácil condução, uma vez que, para tanto, necessita-se de leveduras osmotolerantes e que mantenham elevada viabilidade celular frente a uma fermentação com reciclo de células, como é conduzida aqui no Brasil.

Outro fator que contribui para a redução do pH intracelular da levedura e prejudica sua homeostase é a presença de ácidos orgânicos fracos no meio. Os ácidos fracos, em pH baixo, adquirem uma forma protonada, que facilmente atravessa a membrana plasmática, e dentro do citoplasma, onde o pH está próximo à neutralidade, a maioria dos ácidos fracos se dissocia, liberando prótons e ânions, acidificando o citoplasma. Ambos podem ser expelidos para o exterior celular ao custo do ATP. No entanto, uma vez expelidos, os ânions se reassociam com os prótons, devido ao baixo pH do meio e então podem difundir-se novamente através da membrana, formando um ciclo que leva a um gasto dispendioso de energia pela célula no intuito de manter sua homeostase (ORIJ et al., 2011).

No âmbito da fermentação alcoólica, o ácido acético e o ácido láctico despertam um particular interesse, uma vez que ambos são inibidores potenciais do crescimento e do metabolismo da levedura. O ácido láctico é produzido por bactérias lácticas contaminantes do processo, e o ácido acético é sintetizado em pequenas quantidades pela levedura, porém concentrações tóxicas advêm de bactérias lácticas e/ou acéticas (NARENDRANATH et al., 2001; GRAVES et al., 2006).

Maiorella et al., (1983) relataram uma redução de 80% na produção de biomassa em *S. cerevisiae* quando 7,5 g/L de ácido acético e 38 g/L de ácido láctico estavam presentes no meio. A concentração inibitória mínima, observada por Narendranath et al., (2001), do ácido acético sobre o crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* foi de 0,6% (p/v) ou 100 mM e para o ácido láctico foi de 2,5% (p/v) ou 278 mM. Também relataram que o efeito inibitório da presença de ambos os ácidos no meio sobre a levedura é altamente sinérgico.

O efeito do ácido acético sobre a fermentação e o sobre o pH intracelular é potencializado pelo etanol (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989). E o efeito inibitório tanto do ácido acético quanto do ácido láctico torna-se maior quanto menor for o pH do meio, devido a maior concentração da forma não dissociada dos mesmos (GRAVES et al., 2006).

2.4 Metabólitos indicativos de fatores estressantes sobre a levedura

Mudanças expressivas ocorrem no metabolismo do carbono em resposta a situações estressantes, ocasionando alterações do ponto de vista enzimático e aumentando a capacidade celular em produzir glicerol e trealose para fins de proteção, e glicogênio como fonte de reserva (HOHMANN, 2002).

As rotas metabólicas envolvidas na produção de glicerol, trealose e glicogênio iniciam-se a partir de intermediários formados na glicólise. Esses três componentes apresentam papéis fisiológicos diferentes: o glicerol serve como um osmólito, a trealose desempenha função protetora e o glicogênio atua como carboidrato de reserva (HOHMANN, 2002).

2.4.1 Trealose

A trealose é um dissacarídeo não-redutor formado por duas unidades de glicose. Originalmente, a trealose, juntamente com o glicogênio, eram considerados substâncias de reserva energética para a levedura. No entanto, vários trabalhos têm sugerido que a trealose possui também a função de proteção para a célula de levedura durante processos de estresse (ALCARDE; BASSO, 1997).

O acúmulo deste dissacarídeo ocorre quando a célula passa por um período de baixo crescimento, privação de nutrientes ou sofre estresses ambientais. Tem sido encontrado em diversos organismos capazes de sobreviver sob condições severas como congelamento, altas temperaturas, desidratação, pressão osmótica, concentrações tóxicas de etanol (THEVELIAN, 1984).

A trealose confere proteção celular à medida que confere estabilidade à membrana plasmática. O modelo mais aceito é aquele proposto por Crowe et al., (1984), no qual a membrana mantém sua integridade em situações de desidratação-hidratação porque a trealose substitui as moléculas de água que interagem com os grupos polares dos fosfolipídios, evitando assim, separações laterais dos componentes da membrana, mantendo sua fluidez. Este dissacarídeo também confere estabilidade às proteínas, evitando a desnaturação das mesmas durante altas temperaturas (SINGER; LINDQUIST, 1998).

Segundo Lillie e Pringle (1980), a trealose está presente em baixos níveis durante a fase exponencial do crescimento em glicose e passa a se acumular durante a fase lag da diauxia, quando o meio está quase exaurido em glicose. Além disso, quando o meio é privado de nutrientes como o nitrogênio, o enxofre ou o fósforo, as células aumentam seus teores de trealose, o que parece ser uma resposta em comum frente a vários tipos de limitação

nutricional. Tal observação foi também confirmada no trabalho de Aranda et al., (2004), que relataram que os níveis de trealose atingem até 13% do peso da biomassa seca da levedura sob privação de carbono e nitrogênio.

Outro fator que induz o acúmulo de grandes quantidades de trealose em *S. cerevisiae* é o tratamento térmico. Células de levedura quando incubadas de 27 para 40°C aumentaram seu conteúdo de trealose rapidamente, já quando a temperatura de 27°C foi retomada a trealose foi degradada. Paralelamente, a atividade da enzima responsável pela síntese da mesma, a trealose-6-fosfato sintetase, aumentou cerca de seis vezes durante o estresse térmico (HOTTIGER et al., 1987). Este mesmo comportamento dos teores de trealose foi também observado por Attfield (1987) elevando-se a temperatura do meio de 30 para 45°C, e depois retornando aos 30°C de novo.

Recentemente, no trabalho de An et al., (2011) a super expressão do gene que codifica a enzima trealose-6-fosfato sintetase em *S. cerevisiae*, durante a fermentação alcoólica sob 30 e 38°C, aumentou a atividade desta enzima, da mesma forma que a síntese da trealose, particularmente na temperatura maior. Além disso, o etanol produzido pelos transformantes com e sem a superexpressão do gene a 38°C foi de 60 e 37 g/L respectivamente, indicando que este gene superexpresso teve um efeito benéfico na capacidade fermentativa das leveduras a altas temperaturas.

O acúmulo de trealose em linhagens de *S. cerevisiae* está relacionado com a manutenção da viabilidade celular e tolerância ao etanol durante a fermentação alcoólica (MANSURE et al., 1997). No estudo de Sharma (1997), observou-se que células de *S. cerevisiae*, quando crescidas previamente sob concentrações crescentes de NaCl e depois expostas a 16% de etanol (v/v), apresentaram maior tolerância ao etanol, maior viabilidade e maior acúmulo de trealose do que as células controle. O pré-tratamento de linhagens de *S. cerevisiae* a 38°C proporcionou um aumento exponencial no conteúdo de trealose e notavelmente elevou a viabilidade das células expostas ao estresse oxidativo (BENAROUDI et al., 2001).

Contudo, numa fermentação industrial, a levedura encontra-se exposta continuamente a um conjunto de situações estressantes, que de acordo com a intensidade podem acarretar a exaustão do seu conteúdo de trealose acompanhada pela queda da viabilidade. Muitas destas situações constituem os fatores físico-químicos e microbiológicos que afetam o desempenho fermentativo como um todo (BASSO et al., 1996).

2.4.2 Glicogênio

O glicogênio é o principal carboidrato de reserva em leveduras. Ele começa a se acumular na célula quando aproximadamente metade da glicose fornecida inicialmente já foi consumida (LILLIE; PRINGLE, 1980; PARROU et al., 1999).

O teor de glicogênio em leveduras aumenta exponencialmente um pouco antes do início da fase estacionária do crescimento (ROTHMAN-DENES; CABIB, 1970). Sob limitação de nitrogênio, este carboidrato de reserva começa a se acumular na célula exatamente no momento em que a fonte de nitrogênio é exaurida do meio (PARROU et al., 1999).

Silljé et al., (1999) relataram que o glicogênio e a trealose podem ter uma dupla função sob condições de limitação de açúcares. Após um decréscimo na taxa de crescimento, as leveduras começam a acumular ambos os carboidratos, e estes podem então, serem usados para manutenção celular em situações de exaustão de carbono ou serem usados no início de um novo ciclo de divisão celular, fornecendo rapidamente um fluxo maior de carbono e ATP quando as condições melhoram.

Quando as células estão em estado quiescente prolongado, o glicogênio é metabolizado primeiro em favor da trealose, talvez para que esta possa desempenhar suas funções protetoras posteriormente. No entanto, imediatamente após a saída do estado quiescente, as células metabolizam preferencialmente a trealose. Aliás, células com falta de trealose iniciam o crescimento mais vagarosamente e em geral exibem pouca sobrevivência (SHI et al., 2010).

2.4.3 Glicerol

Durante a fermentação anaeróbica por *S. cerevisiae*, vários subprodutos são formados, sendo o glicerol o principal deles (BAI et al., 2008). Este poliol é o mais importante dentre tais componentes, tendo-se estimado que até 4% da fonte de açúcar é desviada para a síntese do mesmo em fermentações industriais (NISSEN et al., 2000a).

A formação do glicerol em condições anaeróbicas está relacionada com a manutenção do balanço de redox intracelular. Nessa condição, o NADH é reoxidado a NAD^+ através da formação do glicerol. A síntese de 1 mol de glicerol a partir da glicose leva a oxidação de um 1 mol de NADH (ANSELL et al., 1997; WANG et al., 2001). Como a síntese do glicerol utiliza o poder redutor (NADH), a produção do mesmo é aumentada quando há excesso de NADH na célula, que ocorre quando processos oxidativos se desenvolvem, sejam decorrentes da produção de biomassa ou formação de ácidos orgânicos (BASSO et al., 1996).

O glicerol também pode ser formado sob condições aeróbicas, porém normalmente em menores quantidades do que em anaerobiose. Uma exceção a isso ocorre na presença de um baixo potencial osmótico, no qual o glicerol age como um osmorregulador e quantidades substanciais podem ser formadas (BLOMBERG; ADLER, 1992 apud COSTENOBLE et al., 2000).

O acúmulo do glicerol é crucial à resposta hiperosmótica. A exposição ao estresse osmótico faz com que célula ajuste seu metabolismo para proporcionar um aumento na síntese de glicerol e para reduzir o efluxo do mesmo. Sua síntese e acúmulo intracelular são importantes para que a célula recupere a pressão de turgor perdida durante o choque osmótico (ATTFIELD, 1997).

Durante a fermentação alcoólica, a formação do glicerol decorre em função de vários fatores. A linhagem de levedura influencia fortemente a quantidade formada. Outras condições como aumento de temperatura, pH e concentração de sacarose do meio também contribuem para sua produção em maiores concentrações, de modo geral (GUTIERREZ, 1991).

O glicerol se forma na mesma via de síntese do etanol, como um desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor do NADH, motivo pelo qual sua produção é inversamente proporcional a do etanol, causando queda na eficiência fermentativa (BASSO et al., 1996).

De tal forma, vários trabalhos têm dirigido esforços na tentativa de reduzir a formação do glicerol e aumentar a produtividade em etanol, através de deleções dos genes que codificam a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (NISSEN et al., 2000ab; PAGLIARDINI et al., 2010). No entanto, deve-se considerar que o glicerol tem implicações como um protetor sob várias condições de estresse (LI et al., 2009b), principalmente sob elevada pressão osmótica, assim leveduras engenheiradas poderiam não conseguir manter o equilíbrio adequado para manutenção celular, em termos de viabilidade, produção de biomassa e tolerância ao etanol. E no caso de fermentações com elevados teores alcoólicos, a alta concentração de açúcares seria um importante agente estressante sobre a levedura.

Assim, linhagens encontradas na própria biodiversidade das dornas de fermentação, que apresentassem a característica de menor produção de glicerol sem que houvesse perda do efeito protetor ao qual esse metabólito está associado, seria de peculiar interesse no que tange a minimização de desvios do esqueleto de carbono e aumento da produtividade em etanol quando essas leveduras fossem submetidas a uma fermentação com alta concentração de açúcares.

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo selecionar, da biodiversidade de leveduras encontradas nas destilarias brasileiras, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com a capacidade de conduzir fermentações com elevado teor alcoólico em condições de reciclo de células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Neste trabalho, foram avaliadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de amostras de levedo coletadas em destilarias durante a safra 2010/2011, e linhagens da Coleção de Leveduras do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, do Departamento de Ciências Biológicas - ESALQ-USP. Ao todo, foram avaliadas mais de 500 cepas. Todas as linhagens desta coleção são *Saccharomyces cerevisiae*, que foram obtidas da biodiversidade de destilarias brasileiras ao longo de 15 anos, linhagens estas tipificadas mediante a técnica de cariotipagem eletroforética, portanto com grande chance de que correspondam a diferentes cepas.

Como referências (controle), foram utilizadas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e/ou CAT-1 e de panificação. As primeiras por possuírem características de dominância nos processos industriais e grande resistência a fatores estressantes, e a segunda por ser muito utilizada como “starter” nos processos fermentativos, porém sem a capacidade de suportar os estresses da fermentação industrial. Estas linhagens foram fornecidas pela Coleção de Leveduras do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, do Departamento de Ciências Biológicas - ESALQ-USP.

4.2 Coleta de leveduras nas destilarias e análise pela cariotipagem eletroforética

Amostras de creme de levedo foram coletadas durante a safra 2010/2011 em 5 destilarias brasileiras (denominadas de A, B, C, D e E). Essas amostras foram convenientemente diluídas e plaqueadas em meio YEPD sólido (2% glicose; 1% peptona, 1% extrato de levedura; 2% ágar) com os antibacterianos cloranfenicol e tetraciclina (100 mg/L cada). As placas foram incubadas a 30°C até crescimento das colônias em tamanho adequado à análise pela cariotipagem eletroforética, conforme descrito por Basso et al., (1993).

Foi utilizado o protocolo desenvolvido por Blondin e Vézinhét (1988), com algumas modificações descritas por Basso et al., (2008). Para tal, de cada amostra foram tomadas, ao acaso, 10 a 15 colônias e isoladamente processadas. Uma porção de 2 a 4 mg de biomassa úmida de cada colônia foi diretamente suspensa em 30 µL de solução de enzima lítica e 40 µL de agarose 1,3% a 60°C contidos em molde. Os blocos obtidos após gelificação da agarose foram incubados como recomendado (BLONDIN; VÉZINHET, 1988) e submetidos à eletroforese de campo pulsado, a 14°C, modalidade CHEF, empregando-se equipamento BioRad, modelo DR III, programado para 6V/cm por 9 horas com pulsos de 5s, seguido de

6v/cm por 8 horas com pulsos de 60 segundos, ambos os blocos com configuração angular de 120°. Após coloração com brometo de etídio o gel foi fotografado pela iluminação ao UV, obtendo-se assim perfis de bandejamento dos cromossomos intactos.

Cada linhagem apresenta um perfil eletroforético característico sendo possível a identificação da mesma numa população heterogênea composta de várias outras linhagens. Dessa forma, linhagens cujos perfis eletroforéticos se repitam ao longo da safra seriam leveduras persistentes, enquanto a frequência de um mesmo perfil na amostra se relaciona com a dominância da respectiva linhagem.

Assim, para cada amostra, as colônias com perfis de bandejamento idênticos foram agrupadas, sendo, portanto, correspondentes à mesma linhagem. Já as colônias com perfis de bandejamento diferentes foram resgatadas isoladamente, cada qual configurando uma linhagem distinta.

O resgate das colônias foi feito assepticamente, com o auxílio de alça de platina, em tubos estéreis contendo 3,0 mL de meio YEPD líquido, e foram incubadas a 30°C para crescimento.

4.3 Ensaio de crescimento em microplaca

As linhagens indígenas resgatadas anteriormente assim como as linhagens da Coleção foram submetidas a ensaios de crescimento em meios estressantes. Todas as cepas, antes de serem submetidas aos ensaios de crescimento, foram previamente crescidas em 3,0 ml de YEPD líquido a 30°C, por 48 horas.

A nomenclatura das linhagens foi baseada em uma sequência numérica. Portanto, cada cepa foi referida como um número.

O ensaio foi miniaturizado utilizando-se microplacas transparentes de fundo chato com 96 poços. Para isso foi utilizado um leitor multifuncional de microplacas (Tecan, modelo Infinite M200 – RChisto). O ensaio foi conduzido em triplicata, avaliando-se o crescimento das linhagens em meio seletivo a 30°C durante 24 horas, por medida da densidade óptica (D.O.) a 570 nm, em intervalos de 2 horas precedidas sempre de agitações lineares durante 10 minutos. Todas essas condições foram executadas automaticamente pelo leitor de placas.

O preparo da microplaca foi feito adicionando-se, em cada poço, 90 µL do meio seletivo e 10 µL da cultura homogeneizada de cada linhagem a ser avaliada. Para o branco, utilizou-se 90 µL do meio e 10 µL de água Milli-Q estéril. A placa foi selada e inserida em compartimento próprio, onde ocorreu a incubação, agitação e leitura de D.O..

Cada placa permitiu a avaliação de um lote constituído de até 29 strains (em triplicata), somando 87 poços utilizados, sendo os 9 poços restantes utilizados para a prova em branco (apenas meio) e para as linhagens de referências (PE-2 e/ou CAT-1 e de panificação).

4.3.1 Pré-seleção das linhagens para tolerância a alto teor de etanol

Como primeira tentativa de realizar a seleção prévia das linhagens, formulou-se um meio com mosto misto (50% do açúcar oriundo de caldo e 50% oriundo de melaço) com 25% de ART (açúcares redutores totais), esterilizado a 120°C durante 20 minutos. Procedeu-se o ensaio de crescimento (3 repetições por linhagem) em microplaca, conforme descrito anteriormente.

No entanto, no decorrer das avaliações dos strains, observou-se que este meio pouco diferenciou o crescimento das linhagens de referência (PE-2 e panificação), tal discriminação não foi considerada suficiente. Como a linhagem de panificação é sabidamente menos tolerante aos estresses da fermentação (BASSO et al., 2008), o ideal seria utilizar um meio que permitisse uma discriminação mais acentuada dessas duas linhagens.

Na literatura, o que há disponível sobre metodologia para seleção de linhagens de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico contempla meios formulados com glicose e/ou etanol (ORTIZ-ZAMORA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010). No entanto, fermentações com alto teor alcoólico estão também associadas a outros estresses como sais, acidez, etc. Dessa forma, antes de continuar a seleção das linhagens, foram realizados dois experimentos para definir um meio seletivo adequado. Assim, nos dois experimentos, diferentes tipos de meios foram formulados buscando intensificar os estresses (etanol, ácidos orgânicos fracos, teor de açúcar e pH).

4.3.2 Avaliação de 10 diferentes meios para diferenciação fisiológica entre a linhagem PE-2 e a de panificação

Neste experimento foram formulados 10 meios abrangendo diferentes tipos e intensidades de estresses (Tabela 1). Os meios foram preparados com mosto a base de melaço, assepticamente. O ajuste do pH foi feito com ácido sulfúrico 5 N, após a adição de todos os componentes. As linhagens PE-2 e de panificação foram tomadas como referência empregando-se a mesma metodologia anteriormente descrita (item 4.3) para avaliar o crescimento das mesmas.

Tabela 1 - Composição dos 10 meios seletivos

Meio	ART (%)	Etanol (%)	Ácido acético (mg/L)	Ajuste do pH
A	15	-	-	-
B	15	6	-	-
C	15	6	1000	3
D	15	-	1000	3
E	15	6	2000	3
F	20	-	-	-
G	20	8	-	-
H	20	8	1000	3
I	20	-	1000	3
J	20	8	2000	3

4.3.3 Avaliação de 16 meios seletivos para maior diferenciação entre as linhagens PE-2 e a de panificação

Neste experimento, foram formulados 16 meios abrangendo diferentes tipos e intensidades de estresses (Tabela 2). Os meios foram preparados com mosto misto (50% do açúcar oriundo de caldo e 50% oriundo de melaço). O ajuste do pH foi feito com ácido sulfúrico 5 N, após a adição de todos os componentes aos meios. As linhagens PE-2 e de panificação foram tomadas como referência empregando-se a mesma metodologia anteriormente descrita (item 4.3) para avaliar o crescimento das mesmas.

Tabela 2 - Composição dos 16 meios seletivos. Todos os meios foram preparados com 15% de ART e 6,7% (v/v) de etanol

(continua)			
Meio	Ácido acético (mg/L)	Ácido láctico (mg/L)	Ajuste do pH
K	-	-	3
L	667	3000	3
M	-	-	3,2
N	667	3000	3,2
O	-	-	3,5
P	1000	3000	3,5
Q	1000	-	3,5

Tabela 2 - Composição dos 16 meios seletivos. Todos os meios foram preparados com 15% de ART e 6,7% (v/v) de etanol

(conclusão)			
Meio	Ácido acético (mg/L)	Ácido láctico (mg/L)	Ajuste do pH
R	667	3000	3,5
S	667	-	3,5
T	-	3000	3,5
U	-	-	4
V	1000	3000	4
X	1000	-	4
W	667	3000	4
Y	667	-	4
Z	-	3000	4

4.3.4 Avaliação dos meios selecionados sobre o crescimento diferencial das linhagens PE-2 e de panificação em frascos com maior volume (em relação às microplacas)

Os meios selecionados (R, V e W) na etapa anterior foram avaliados em escala maior, agora medindo-se o crescimento das linhagens PE-2 e de panificação em espectrofotômetro (Micronal, modelo B380). Foram preparados, assepticamente, 60 mL de cada meio com as mesmas concentrações descritas anteriormente (Tabela 2), em erlenmeyers com capacidade para 125 mL. Cada linhagem, antes de ser inoculada nos meios, foi previamente crescida em 5 mL de YEPD líquido a 30°C por 48 horas. Cada meio foi inoculado separadamente com as linhagens a serem avaliadas e os erlenmeyers foram incubados a 30°C, sob agitação a 150 r.p.m. Foram coletadas amostragens para medida do crescimento por transmitância (600 nm) nos seguintes intervalos de tempo: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 33, 40 e 58 horas. Os valores de transmitância foram convertidos em absorbância para desenhar a curva de crescimento, segundo a fórmula: Absorbância = 2 – log Transmitância. Ao final do experimento, determinou-se a viabilidade celular das linhagens em cada meio.

4.3.5 Seleção prévia para crescimento com o meio R

Após análise dos resultados obtidos nos experimentos 4.3.3 e 4.3.4, o meio R foi selecionado para realizar o screening das linhagens mediante avaliação do crescimento, conforme descrito no item 4.3. Por placa, avaliou-se um lote com até 29 strains (em

triplicata), além das linhagens PE-2 e de panificação, tomadas como referência. No total foram avaliados 16 lotes.

Para analisar os resultados do crescimento em microplaca, as comparações das linhagens com a PE-2 foram feitas por lote. Em cada lote, comparou-se o crescimento das linhagens com o crescimento da PE-2 referenciada na respectiva microplaca do mesmo lote. As linhagens cujos crescimentos ao final de 24 horas foram superiores ao da PE-2 foram selecionadas para a etapa seguinte.

4.4 Manutenção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens estavam estocadas em tubos contendo 3,0 mL de meio YEPD líquido e o estoque era renovado a cada 6 meses, transferindo-se 100 µL da cultura homogeneizada para tubos contendo o mesmo volume do meio estéril, seguido de incubação a 30°C por 48 horas. Com a disponibilidade de um ultra-freezer, o armazenamento foi modificado pela transferência de um volume de suspensão do cultivo anterior com igual volume de glicerol a 30% (p/v) para tubos eppendorf, seguido de homogeneização e armazenamento a -80°C.

4.5 Pré-seleção das linhagens provenientes do screening com o meio R por meio de experimento de fermentação com reciclo celular e incrementos nos teores alcoólicos

Esse experimento foi realizado para avaliar as 34 linhagens provenientes do screening anterior com o objetivo de selecionar as cepas com capacidade para conduzir fermentações com alto teor alcoólico e com reciclo de células. A linhagem PE-2 foi usada como referência. Como seria inviável fazer um experimento de fermentação com as 34 cepas de uma vez, o ensaio foi conduzido em dois lotes: o primeiro com 15 linhagens e o segundo com as 19 restantes, sem repetições para as cepas.

4.5.1 Multiplicação das linhagens

As linhagens foram propagadas primeiramente transferindo-se 100 µL da cultura para tubos contendo 5,0 mL de meio YEPD líquido, seguido de incubação a 30°C por 48 horas. Posteriormente, o conteúdo desses tubos foi transferido para erlenmeyers com 150 mL de meio de melaço com 10% de ART (esterilizados a 121°C por 20 minutos), e foram incubados a 30°C até consumo de todo açúcar. A biomassa úmida para o primeiro ciclo foi coletada por centrifugação (800 x g, por 20 minutos) e foi ajustada para que todas as linhagens iniciassem a fermentação com o mesmo teor de fermento.

4.5.2 Preparo do mosto de fermentação

Para a fermentação, foi preparado mosto misto utilizando a proporção de 50% do açúcar oriundo de caldo e 50% oriundo de melaço, ambos diluídos com água até teor de ART desejável. O mosto foi centrifugado a 10.000 r.p.m., a 20°C por 20 minutos, acondicionado em erlenmeyers e esterilizado a 121°C durante 25 minutos. Após resfriamento, foi armazenado em frascos e congelado a -20°C até o momento do uso.

4.5.3 Condução da fermentação

O experimento de fermentação foi conduzido em tubos de fundo cônico de 50 mL de capacidade na temperatura de 30°C. A biomassa úmida das linhagens proveniente da etapa de propagação foi ajustada para 1,16 g (para o primeiro lote) e 1,24 g (para o segundo lote) para que todas iniciassem a fermentação com o mesmo teor de fermento.

As fermentações foram conduzidas de modo a simular, tanto quanto possível, o processo industrial de batelada alimentada. Para tal, um “pé-de-cuba” foi preparado suspendendo-se a levedura em um volume de água e vinho oriundo da fermentação anterior de modo a simular uma concentração na centrífuga de 65% (média do processo industrial). O mosto foi acrescido em 3 parcelas iguais, espaçadas de 2 horas, e num volume que resultasse em cerca de 10% de biomassa ao final da fermentação.

Os mostos para alimentação foram preparados para conter açúcares suficientes para resultar em aumentos graduais dos teores de etanol a cada ciclo, de modo que a primeira fermentação resultasse em torno de 8% (v/v) de álcool e a última fermentação chegasse a uma graduação alcoólica de 15-16% (v/v). Ao final da fermentação (que foi monitorada por pesagens a cada 2 horas), a levedura foi separada do vinho mediante centrifugação (800 x g, por 20 minutos), pesada, ressuspensa novamente em água e vinho (conforme mencionado acima), sendo em seguida alimentada com mosto, perfazendo-se assim, 11 (para o primeiro lote) e 10 (para o segundo lote) ciclos fermentativos.

Nos vinhos deleiturados (ou delevedurados) de cada ciclo fermentativo foram dosados os teores de etanol (destilação com vapor seguida de densimetria eletrônica) e densidade. Na avaliação do primeiro lote, até o 8º ciclo, foi feita uma estimativa do teor alcoólico da mistura dos vinhos deleiturados de todas as cepas, como forma de acompanhar a evolução da fermentação. A partir do 9º ciclo, o teor alcoólico foi avaliado individualmente para cada linhagem. Para o segundo lote, os teores alcoólicos foram determinados individualmente para cada linhagem a partir do 6º ciclo.

Nas leveduras foram estimados os teores de biomassa úmida, em todos os ciclos. As viabilidades celulares foram feitas ao final do último ciclo fermentativo (para o primeiro lote) e ao final dos dois últimos ciclos (para o segundo lote).

Adicionalmente à determinação de biomassa, etanol e viabilidade, foram analisadas as concentrações de açúcares residuais no vinho ao final do último ciclo (somente para o segundo lote).

4.6 Avaliação final das linhagens selecionadas quanto ao desempenho fermentativo em condições de reciclo e alto teor alcoólico

Pela etapa de pré-seleção, 10 linhagens foram selecionadas para serem avaliadas quanto ao desempenho fermentativo sob condições de alto teor alcoólico e reciclo celular. Cada cepa foi avaliada em triplicata, assim como a linhagem de referência PE-2. Com seria inviável avaliar as 10 linhagens em triplicata em um único experimento, conduziu-se a avaliação em dois lotes, com 4 cepas no primeiro, e 6 cepas no segundo, sendo ambos contrastados com a linhagem PE-2.

4.6.1 Multiplicação das linhagens selecionadas

As linhagens foram propagadas primeiramente transferindo-se 100 µL da cultura para tubos contendo 5,0 mL de meio YEPD líquido, seguido de incubação a 30°C por 48 horas. Posteriormente, o conteúdo desses tubos foi transferido para erlenmeyers contendo 600 mL de meio de melaço com 15% de ART, enriquecido com ureia (0,86 g/l), (NH₄)₂SO₄ (1,89 g/l), K₂HPO₄ (0,42 g/l), MgSO₄.7H₂O (0,21 g/l) e extrato de levedura (2,5 g/l), incubados a 30°C até consumo de todo açúcar. Em seguida, todo o conteúdo dos erlenmeyers foi transferido para erlenmeyers com 2 L de capacidade contendo 1000 mL de mosto misto (50% do açúcar oriundo de melaço e 50% oriundo de caldo) com 13% de ART e incubados a 30°C. Após o término da propagação, os frascos foram acondicionados na câmara fria a 4°C até que toda a biomassa decantasse.

4.6.2 Preparo do mosto de fermentação

Para a fermentação, foi preparado mosto misto utilizando a proporção de 50% de açúcar oriundo de caldo e 50% oriundo de melaço, ambos diluídos com água até teor de ART desejável. O mosto foi centrifugado a 10.000 r.p.m., a 20°C por 20 minutos, acondicionado em erlenmeyers e esterilizado a 121°C durante 25 minutos. Após resfriamento, foi armazenado em frascos e congelado a -20°C até o momento do uso.

4.6.3 Condução da fermentação

O ensaio de fermentação foi conduzido em tubos de fundo cônico de 50 mL de capacidade (três repetições para cada tratamento) contendo, como pé-de-cuba, 12 mL de suspensão da levedura (inicialmente cerca de 4,0 g de biomassa úmida para o primeiro ciclo fermentativo em 6 mL de água milli-Q e 2 mL de vinho da fermentação anterior - simulando assim uma situação industrial de concentração na centrífuga de 65% de levedura).

As fermentações foram conduzidas na temperatura de 32,5°C (para o primeiro lote) e 32°C (para o segundo lote), e se iniciaram pela adição de 28 mL de mosto misto, dividido em 3 porções iguais, espaçadas de 2 horas cada a contar do início da fermentação. Os mostos para alimentação foram preparados para conter açúcares suficientes para resultar em aumentos graduais dos teores de etanol a cada ciclo.

Ao final da fermentação (que foi monitorada por pesagens a cada 2 horas), a levedura foi separada do vinho mediante centrifugação (800 x g por 20 minutos), pesada, ressuspensa novamente em água e vinho (conforme mencionado acima), sendo em seguida novamente alimentada com mosto, perfazendo-se assim, no mínimo 7 ciclos fermentativos.

Ao final de cada ciclo foram dosados, no vinho deleiturado, o teor de etanol, glicerol e açúcares residuais (glicose, frutose e sacarose), e densidade, enquanto que nas leveduras foram estimados os teores de biomassa úmida e viabilidade celular. O conteúdo de trealose da levedura foi estimado nos seguintes estágios: ao final da fase de propagação do fermento, ao final do 4º ciclo (somente para o primeiro lote) e ao final do último reciclo. O teor de glicogênio da levedura foi estimado somente ao final do último ciclo.

4.7 Determinação do teor de etanol nos vinhos deleiturados

Para a determinação do teor alcoólico dos vinhos deleiturados, transferiu-se 10 ou 25 mL do vinho para o interior de um microdestilador Kjeldahl e procedeu-se a destilação por arraste de vapor recolhendo-se o condensado em balão volumétrico de 50 mL. As amostras destiladas foram transferidas para um densímetro digital (ANTON PAAR – DMA48) para estimativa do teor de etanol (% v/v). O valor dado pelo aparelho foi multiplicado por 5 ou por 2, quando destilou-se, respectivamente 10 ou 25 mL de vinho, para compensar a diluição ocorrida durante a destilação (ZAGO et al., 1996).

4.8 Quantificação de glicerol e açúcares residuais nos vinhos

As concentrações de glicerol e açúcares residuais (glicose, frutose e sacarose) foram determinadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando cromatógrafo

de troca iônica (DIONEX – DX-300) equipado com coluna CarboPac PA-1 4 x 250 mm e detector de amperometria de pulso. A fase móvel utilizada foi NaOH 100 mM a um fluxo de 0,9 mL/min (BASSO et al., 2008).

4.9 Determinação da biomassa úmida

Antes de iniciar as fermentações, os tubos de fundo cônico utilizados nos ensaios fermentativos foram previamente tarados. Ao final de cada ciclo, o vinho foi separado do fermento mediante centrifugação, e os tubos com as biomassas precipitadas foram pesados. Por diferença de peso do tubo com fermento do peso do tubo tarado, estimava-se o teor de biomassa úmida ao final de cada ciclo fermentativo.

4.10 Estimativa da viabilidade celular da levedura

A viabilidade celular foi estimada ao final de cada ciclo fermentativo mediante microscopia óptica através de coloração diferencial de células, usando como corante solução de eritrosina em tampão fosfato. As células viáveis, não coradas, e as não viáveis, coradas de rosa, foram contadas em câmara de Neubauer (OLIVEIRA et al., 1996). A viabilidade foi expressa em porcentagem, em função da proporção de células viáveis sobre o total de células (viáveis e não viáveis).

4.11 Extração e quantificação da trealose

A trealose foi extraída de uma massa úmida de 200 mg de levedura (massa centrifugada), pelo método de extração seletiva com ácido tricloroacético a 0°C (TREVELYAN; HARRISON, 1956). Tal biomassa foi lavada com água destilada gelada e precipitada mediante centrifugação em tubo de fundo cônico (3500 r.p.m. durante 6 minutos). A extração foi feita com 2 mL de ácido tricloroacético 0,5 M, em banho de gelo durante 20 minutos e com agitações casuais. Após centrifugação, coletou-se o extrato sobrenadante, o qual foi armazenado em tubo eppendorf a -20°C até momento da análise. A quantificação da trealose foi realizada por HPLC, conforme descrito por Basso et al., (2008), usando cromatógrafo iônico DIONEX (modelo DX-300) nas mesmas condições empregadas para a dosagem de glicerol e açúcares residuais.

4.12 Extração e quantificação de glicogênio

O glicogênio foi determinado pelo método de Becker (1978) modificado de acordo com Rocha-Leão et al., (1984). Para a extração, preparou-se uma suspensão de cada levedura

contendo 200 mg de biomassa úmida e transferiu-se para tubos de ensaio com tampa de rosca. Em todos os tubos adicionou-se 5 mL de água destilada gelada, seguida de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3500 r.p.m. durante 6 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Em cada tubo contendo a biomassa precipitada, foram adicionados 2,0 mL de Na_2CO_3 0,25 M recém preparado, e os tubos foram estocados a -20°C até o momento da análise. A quantificação do glicogênio foi realizada mediante hidrólise enzimática com amiloglicosidase e dosagem colorimétrica da glicose liberada após reação com glicose-oxidase e peroxidase, efetuando-se as leituras a 500 nm.

4.13 Cálculo dos parâmetros de fermentação

O fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S} = P/S$) foi calculado pela razão entre a quantidade de etanol produzido (P) e a quantidade de açúcar metabolizado (S).

O rendimento fermentativo foi calculado com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac, na qual considerando-se um rendimento de 100% ocorre a formação de 51,1 g de etanol a partir de 100 g de açúcares totais. Para o cálculo considerou-se a quantidade de etanol produzido em função do açúcar fornecido.

4.14 Análise estatística

Os experimentos de fermentação (3 repetições para cada tratamento) foram conduzidos com delineamento experimental inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. As parcelas consistiram nos tratamentos (linhagens de levedura) e as subparcelas nos ciclos fermentativos.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o software ESTAT (Sistema para análise estatística, versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas – UNESP, Jaboticabal, 1992). As comparações das médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de linhagens mediante a cariotipagem das amostras de levedo coletadas em 5 destilarias durante a safra 2010/2011

Para a destilaria A, o plaqueamento resultou em colônias com apenas o biótipo rugoso, opaco e de bordo irregular. A cariotipagem (Figura 3) revelou a presença de linhagens com muita proximidade genética entre si, devido ao partilhamento de muitas bandas idênticas (mesma mobilidade eletroforética). A população parece ser constituída de pelo menos 2 linhagens dominantes, uma delas representando cerca de 40% (6 perfis dentre 15) da população (perfis 2, 3, 5, 6, 7 e 9) e outra correspondendo a cerca de 20% da população (perfis 12, 13 e 14). Com pouca dominância se observam duas outras linhagens, cada qual representando 13% da população (perfis 1 e 15, representando uma delas, e perfis 4 e 11, representando outra linhagem). Tais linhagens podem ser consideradas indígenas (pois que seus perfis eletroforéticos não correspondem àqueles de linhagens introduzidas no processo) e se apresentam com rearranjos cromossômicos, como observado por Basso et al. (2008). Tais rearranjos cromossômicos dificultam a tipificação estrita das linhagens, mas permitem agrupar linhagens com proximidade genética entre si. Rearranjos cromossômicos dentro de uma mesma linhagem podem ser verificados por novas bandas, desaparecimentos de bandas, mudanças nas posições de bandas, e vem a ser decorrência de translocações e deleções nos cromossomos em eventos meióticos e mitóticos (LOPES, 2000).

Figura 3 – Cariotipagem eletroforética de 15 colônias tomadas ao acaso da amostra da destilaria A

Para a destilaria B, o plaqueamento igualmente resultou em colônias com o biótipo apenas rugoso, opaco e de bordo irregular, sendo que a cariotipagem (Figura 4) evidenciou uma população com ausência de linhagem prevalente, porém uma delas correspondendo a 20% da população (perfis 1 e 4). No entanto, algumas das demais linhagens apresentam proximidade genética entre si, sugerindo pequena biodiversidade nessa destilaria.

Figura 4 – Cariotipagem eletroforética de 10 colônias tomadas ao acaso da amostra da destilaria B

Também para a destilaria C, observou-se somente o biótipo rugoso no plaqueamento. A cariotipagem (Figura 5) revelou a presença de uma população heterogênea, sendo que três linhagens representavam, cada qual, 13% da população (perfis 1 e 2; 3 e 5; 7 e 8; 9 e 11). Da mesma forma que na destilaria B, se observa que algumas linhagens tem grande proximidade genética entre si.

Figura 5 – Cariotipagem eletroforética de 15 colônias tomadas ao acaso da amostra da destilaria C

No caso da destilaria D, foram coletadas 3 amostras, duas no ano de 2010, e uma em 2011. Desta forma, foram identificadas como D(1), D(2) e D(3), respectivamente. O plaqueamento da amostra D(1) resultou em colônias com 3 biótipos: rugosa, opaca, com bordo irregular; rugosa, opaca, com bordo regular; e lisa, brilhante e de bordo regular, correspondendo a, respectivamente, 88%, 10% e 2% do total de colônias na placa.

A cariotipagem da amostra D(1) (Figura 6A) foi realizada tomando-se ao acaso 15 colônias com os dois biótipos rugosos (com bordo irregular - perfis 1 a 13, e com bordo regular – demais perfis). A colônia com o biótipo liso era muito pequena, o que impediu a confecção dos respectivos “plugs”. Então ela foi resgatada em YEPD líquido, incubada a 30°C para crescimento. Posteriormente, ela foi plaqueada e seu perfil eletroforético foi determinado na composição do gel da amostra D(2) (Figura 6B), correspondendo aos perfis de 11 a 15.

Para a amostra D(1), a cariotipagem (Figura 6A) revelou a presença de uma linhagem dominante correspondendo a 33% da população (perfis 2, 9, 12, 14 e 15). Com menor dominância, outra linhagem se destacou (perfis 5 e 7), abrangendo 13% da população. A proximidade genética entre as linhagens revela que a biodiversidade nessa destilaria é pequena.

Figura 6 – Cariotipagem eletroforética de 15 colônias tomadas ao acaso da amostra D(1) (**A**) e de 10 colônias da amostra D(2), perfis 11 a 15 correspondem às colônias lisas (**B**)

O plaqueamento da amostra D(2) apresentou colônias somente com o biótipo rugoso, opaco e com bordo irregular. A Figura 6B mostra os perfis 1 a 10 (referentes à 10 colônias da amostra D(2)) e os perfis 11 a 15 (referentes às colônias lisas observadas na amostra D(1)). Observa-se a presença de uma linhagem dominante (perfis 2, 3, 6, 7, 8 e 10) correspondendo a 60% da população e outra linhagem abrangendo 20% (perfis 4 e 9). Essa linhagem é a mesma que dominou a população na amostra D(1) (perfis 2, 9, 12, 14 e 15), o que é confirmado pelo perfil que se repete em ambas as cariotipagens. Isso reforça ainda mais a sugestão de que a população dessa destilaria seja composta por uma linhagem dominante e persistente no processo. Quanto aos perfis 11 a 15, conforme era esperado, compõem uma única linhagem, pois se originaram de uma única colônia.

A cariotipagem da amostra D(3) (Figura 7), cujo plaqueamento também obteve somente colônias com o biótipo rugoso, com bordo irregular, revelou a presença de linhagens com pouca dominância, destacando-se uma correspondendo a 20% da população (perfis 1, 5 e 8), e outras duas abrangendo, cada qual, 13% (perfis 2 e 3, e perfis 6 e 7).

Figura 7 – Cariotipagem eletroforética de 15 colônias tomadas ao acaso da amostra D(3)

Por fim, para a destilaria E foram coletadas duas amostras, ambas em 2011. Assim, foram referidas como E(1) e E(2). Os plaqueamentos de ambas as amostragens resultaram em colônias somente com o biótipo normal, ou seja, lisa, brilhante e de bordo regular. As cariotipagens das duas amostras (Figura 8A e B) revelaram a presença, em sua maioria, dos perfis correspondentes às linhagens industriais selecionadas PE-2 (perfis 1, 4, 5, 10, 12 a 15 – Figura 8A; perfis 2 e 3 – Figura 8B) e CAT-1 (perfis 2, 3, 6, 9 e 11 – Figura 8A; perfis 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13 a 15 – Figura 8B) (Perfis da PE-2 e CAT-1 – Figura 9). Pelo banco de dados do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras (LCB, ESALQ), os perfis 7 e 8 da Figura 8A, assim como os perfis 4 e 12 da Figura 8B, correspondem a rearranjos cromossômicos da linhagens PE-2 ou FT-134 (Figura 9). O mesmo é observado para a amostra E(2) (Figura 8B), onde o perfil 9 corresponde a rearranjo cromossômico da linhagem CAT-1 (Figura 9).

Figura 8 – Cariotipagem eletroforética de 15 colônias tomadas ao acaso da amostra da destilaria E(1) (A) e da destilaria E(2) (B)

Figura 9 – Cariotipagem eletroforética das linhagens padrões CAT-1 (perfis 1 a 7) e PE-2/FT-134 (perfis 8 a15)

Para todas as destilarias nas quais as amostras foram coletadas, todas as colônias obtidas no plaqueamento, exceto para a destilaria E, apresentaram a morfologia rugosa. De acordo com o estudo de Basso et al., (2008), linhagens cujos biótipos das colônias eram rugosos exibiram, em grande proporção, características fermentativas indesejáveis como floculação, formação de espuma, aumento do tempo de fermentação e da concentração de açúcares residuais. E embora, neste mesmo estudo, muitas linhagens indígenas tenham sido identificadas como dominantes e persistentes, a maioria delas não exibiu comportamento fermentativo desejável.

Os resultados da cariotipagem orientaram a escolha das linhagens com prevalência nas amostras, assim como aquelas com proximidade genética entre si, de modo que 57

linhagens foram identificadas (nomeadas quanto a numeração descrita na Tabela 3 – Anexo A). As colônias cujos perfis de bandeamento foram semelhantes dentro de uma mesma amostra foram juntadas e consideradas como sendo uma linhagem, e as colônias com perfis diferentes foram tratadas individualmente como linhagens distintas. Dentre as 57 linhagens, 41 juntamente com mais 235 pertencentes à Coleção do laboratório foram avaliadas conforme descrito no item seguinte.

5.2 Pré-seleção das linhagens para tolerância a alto teor de etanol

Inicialmente, a estratégia utilizada para realizar o “screening” foi empregar um substrato industrial, o “mosto misto” (caldo e melaço, cada qual contribuindo com 50% do açúcar) com 25% de ART. Considerando um rendimento de 90%, o teor alcoólico ao final do crescimento estaria ao redor de 14,5%, caso todo o açúcar tenha sido consumido. Essa condição iria impor às leveduras os estresses típicos de uma fermentação com alto teor alcoólico, ou seja, a alta pressão osmótica, o elevado teor de etanol e o estresse ácido (decorrente da acidez do melaço).

Desta forma, iniciou-se o “screening” das 276 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Tal seleção foi conduzida em lotes, que encerravam, cada qual, cerca de 28 linhagens, perfazendo-se no total 10 lotes.

No transcorrer das avaliações notou-se que o meio empregado possibilitou pouca diferenciação entre as linhagens tomadas como referências (PE-2/CAT-1 e de panificação), conforme se percebe na Figura 10. No entanto, sabe-se que estas leveduras apresentam comportamentos completamente diferentes no processo industrial. As linhagens PE-2 e CAT-1, mais tolerantes, possuem alta capacidade de sobrevivência no processo apresentando alta taxa de implantação. Enquanto a linhagem de panificação, menos tolerante, não permanece no processo, sendo rapidamente substituída por linhagens indígenas (BASSO et al., 2008). Essa grande diferença de comportamento na indústria entre essas leveduras não foi observada utilizando-se o meio com 25% de ART. Essas observações nos sugeriram, antes de dar continuidade ao screening das leveduras, a busca de um meio seletivo que destacasse ainda mais os atributos destas linhagens referenciais.

Figura 10 – Perfil de crescimento, medido por D.O. (570 nm) a cada 2 horas no decorrer de 24 horas, das linhagens padrões CAT-1 , PE-2 e linhagem de panificação, em meio composto de mosto misto com 25% de ART. Padrões avaliados junto com as linhagens do 9º lote

No decorrer das avaliações em meio com 25% de ART atentou-se também que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) mostrou uma fraca correlação com a biomassa final (D.O. avaliada às 24 horas) para a população de linhagens testadas (Figura 11). Observou-se linhagens com elevado $\mu_{\text{máx}}$ porém com biomassa menor, e cepas com $\mu_{\text{máx}}$ menor mas com maior biomassa final. Assim, optou-se por priorizar os valores de D.O. para o screening das melhores cepas. Isto porque este parâmetro se relaciona melhor com a capacidade da linhagem em atingir a maior biomassa no período, desconsiderando-se assim, a velocidade com que ocorre este crescimento. A biomassa foi considerada prioritária porque a produção de etanol está acoplada à síntese de biomassa em condições de anaerobiose. O estresse sofrido pela levedura se relaciona muito bem com o crescimento da mesma.

Por isso, para os demais lotes, foi calculado o $\mu_{\text{máx}}$ somente para as cepas cujas densidades ópticas, ao final de 24 horas, foram superiores a 80% da D.O. da linhagem PE-2 (Tabela 4 – Anexo B).

Nessa etapa de pré-seleção, 76 linhagens foram descartadas por apresentarem valores de D.O. (24 horas) inferiores a 50% da D.O. observada para a referência PE-2 e 200 foram escolhidas para serem avaliadas posteriormente.

Figura 11 – Gráfico de correlação entre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$) e a densidade óptica (D.O. (570 nm)) com 24 horas, para as linhagens avaliadas no (a) 1º lote, (b) 2º lote e (c) 3º lote

5.2.1 Avaliação de 10 diferentes meios para diferenciação fisiológica entre a linhagem PE-2 e a de panificação

Os perfis de crescimento das duas linhagens referenciais (PE-2 e de panificação) obtidos mediante ensaio em microplacas com 96 poços mostraram diferenças interessantes quanto à composição dos meios testados (Tabela 1, p. 38). De maneira geral, quanto maior foi a intensidade dos fatores estressantes, menor foi o crescimento tanto da PE-2 como da linhagem de panificação (Figura 12). A presença do etanol juntamente com o ácido acético, associado ao baixo pH, foram as condições que exerceram o maior efeito tóxico sobre as linhagens, prejudicando drasticamente o crescimento das mesmas (Figura 12c, e, h e j).

Figura 12 – Perfil de crescimento, medido por D.O. (570 nm) a cada 2 horas no decorrer de 24 horas, das linhagens PE-2 e panificação, em meios com diferentes intensidades de estresses

Na literatura, relata-se que o etanol potencializa o efeito do ácido acético, exercendo efeito inibitório na fermentação e levando a acidificação do citoplasma (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989). O baixo pH do meio potencializa consideravelmente o efeito tóxico de ácidos fracos sobre a célula, devido a maior concentração da forma não dissociada

do mesmo (GRAVES et al., 2006). Maiorella et al., (1983) relataram que o ácido acético exerce efeito inibitório na faixa de 0,5 a 9,0 g/L, causando uma queda no crescimento celular à medida que ocorre incrementos na concentração do ácido no meio.

A presença dos três fatores estressantes no meio afeta mais severamente as leveduras do que presença de um ou outro isoladamente. Observou-se pouca diferença de crescimento somente com o aumento da concentração de açúcares no meio (de 15 para 20% de ART) (Figura 12a, f). No entanto, o aumento do teor de etanol inicial (de 6 para 8% (v/v)), associado ao maior teor de ART (Meio G – Tabela 1), retardou o crescimento das linhagens, principalmente da linhagem de panificação (Figura 12b, g), fato observado pelo atraso no início da fase log de 6 (Figura 12b) para 12 horas (Figura 12g), além de um menor crescimento (D.O. da PE-2 caiu pela metade).

Os meios contendo ácido acético e pH 3,0, sem a adição de etanol inicial, porém com concentração de ART de 15% (Meio D – Tabela 1) e 20% (Meio I – Tabela 1), foram menos tóxicos (Figura 12d, i) que aqueles com etanol inicial (Figura 12c, e, h, j), o que deixou evidente o efeito deletério do etanol associado ao baixo pH e ao ácido acético. No entanto, o crescimento, em especial o da linhagem de panificação, foi afetado pelo aumento da pressão osmótica (Figura 12d, i).

Em uma fermentação com alto teor alcoólico, os fatores mais atuantes sobre a fisiologia da levedura são a pressão osmótica e o teor de etanol, os quais, quando elevados, provocam queda no crescimento celular, baixa viabilidade e alto consumo de energia (DEVANTIER et al., 2005). Tais fatores agem de forma sinérgica, de modo que seus efeitos sobre a célula são potencializados (JOHN et al., 2012).

O etanol, o baixo pH e o ácido láctico, assim como o acético, agem de forma sinérgica sobre a levedura. O baixo pH em especial, na presença do etanol (9,5%), foi o fator que mais prejudicou o crescimento e a viabilidade celular de *S. cerevisiae* (DORTA et al., 2006). A inibição da levedura em condições de baixo pH e presença de ácidos orgânicos ocorre porque os ácidos orgânicos não dissociados atravessam livremente a membrana plasmática por difusão simples, penetrando no interior celular (CÁSSIO et al., 1987).

Os resultados mostraram que os meios D, G e I (Figura 12d, g, i) foram aqueles que promoveram discriminação quanto ao crescimento das linhagens PE-2 e de panificação. Por tais observações, delineou-se outro experimento buscando avaliar outros 16 meios com diferentes composições, igualmente variando as intensidades (concentrações) para alguns estresses para destacar ainda mais os atributos dessas linhagens referenciais e encontrar um meio adequado para a seleção das leveduras. Os meios foram formulados com mosto misto

com 15% de ART e teor alcoólico inicial de aproximadamente 6,7% (v/v), de modo que fosse possível observar o efeito específico do pH, associado a outros fatores como presença dos ácidos orgânicos láctico e/ou acético, sobre as leveduras, desde que tais ácidos são gerados no ambiente de uma fermentação (ALVES, 1994).

5.2.2 Avaliação de 16 meios seletivos para maior diferenciação entre as linhagens PE-2 e de panificação

Observando o perfil de crescimento (Figura 13) das linhagens frente aos 16 diferentes meios (Tabela 2, p. 38), observou-se que o efeito do pH é potencializado pela presença dos ácidos orgânicos, principalmente do ácido acético, que agiu de forma mais tóxica sobre as leveduras, de modo geral.

O efeito do pH 3,0 (Figura 13a) é maximizado pela adição dos ácidos acético e láctico (Figura 13b), inibindo drasticamente o crescimento de ambas as leveduras. Com um pequeno aumento do pH para 3,2, tanto a PE-2 quanto a de panificação cresceram melhor (Figura 13c), e a mesma inibição do crescimento é observada, principalmente para a linhagem de panificação, quando ambos os ácidos são adicionados (Figura 13d).

Quando o pH foi elevado para 3,5, ambas as leveduras foram beneficiadas, crescendo mais (Figura 13e) que nos meios com menor pH. O mesmo foi observado em pH 4,0, porém neste a linhagem de panificação conseguiu se desenvolver melhor, exibindo uma curva de crescimento semelhante à da PE-2 (Figura 13k).

O efeito da adição simultânea de ambos os ácidos nos meios com pH 3,5 (Figura 13f, h) foi maior que nos meios com pH 4,0 (Figura 13l, n). O mesmo se observou quando somente o ácido acético, independente da concentração, foi adicionado ao meio com pH 3,5 (Figura 13g, i), quando comparado ao meios com pH 4,0 (Figura 13m, o).

A observação mais marcante desse experimento foi que o ácido acético, quando adicionado ao meio com pH 3,5 (Figura 13g, i), exerceu, sobre as linhagens, praticamente o mesmo efeito que quando adicionado juntamente com o ácido láctico (Figura 13f, h). Além disso, o meio (pH 3,5) contendo somente ácido láctico pouco afetou o crescimento das linhagens (Figura 13j), quando comparado com o meio sem os ácidos (Figura 13e).

Figura 13 – Perfil de crescimento, medido por D.O. (570 nm) a cada 2 horas no decorrer de 24 horas, das linhagens PE-2 e de panificação, em meios com diferentes intensidades de estresses

Para pH 4,0, na presença de ambos os ácidos, o crescimento da linhagem de panificação foi mais prejudicado que o da PE-2 (Figura 13l, n). Da mesma forma que nos meios com pH 3,5, verificou-se que o comportamento das linhagens nos meios (pH 4,0) contendo somente o ácido acético (Figura 13m, o), independente da concentração, foi praticamente o mesmo que nos meios contendo ambos os ácidos (Figura 13l, n). Já o meio contendo somente o ácido lático não afetou o crescimento da PE-2, observando-se somente um leve declínio da D.O. da linhagem de panificação nessa condição (Figura 13p).

Os resultados mostraram que o ácido acético exerceu o maior, senão todo, efeito tóxico sobre as leveduras. O dano causado pelo ácido láctico sobre o crescimento das mesmas pôde ser considerado desprezível na concentração de 3 g/L. Outra observação relevante foi que, na presença de ácidos orgânicos, quanto menor foi o pH do meio maior foi a inibição do crescimento das linhagens.

A concentração da forma não-dissociada dos ácidos orgânicos fracos é fortemente influenciada pelo pH do meio. Segundo a literatura, a forma não dissociada destes ácidos orgânicos é a responsável por causar danos às leveduras, levando à acidificação do citoplasma e comprometendo a homeostase celular (ORIJ et al., 2011). Segundo Graves et al., (2006), o aumento da toxicidade do ácido acético em relação ao ácido láctico ocorre devido ao aumento da concentração de moléculas não-dissociadas do ácido em pH baixo. No mesmo trabalho, tais autores observaram que, em pH 4,0, a quantidade de ácido acético não dissociado era mais de 80%, enquanto que a do ácido láctico era cerca de 40%, e que tais concentrações diminuíram quando o pH do meio foi elevado.

O ácido acético (pKa 4,75) possui um valor de pKa mais elevado que o do ácido láctico (pKa 3,86). Em condições nas quais o pH do meio está abaixo do valor do pKa, um ácido fraco se apresentará essencialmente no estado não dissociado, forma na qual eles são potentes inibidores do crescimento microbiano, pois, por estarem descarregados, se difundem facilmente através da membrana celular, se dissociando no citoplasma, onde o pH é mais elevado (PIPER et al., 2001).

No estudo de Narendranath et al., (2001), a concentração inibitória mínima do ácido acético sobre o crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* foi de 0,6% (p/v) e para o ácido láctico foi de 2,5% (p/v). Também relataram que o efeito inibitório da presença de ambos os ácidos no meio sobre a levedura é altamente sinérgico.

Pelos crescimentos diferenciais observados nas linhagens referenciais, os meios R, V e W foram selecionados e o ensaio seguinte foi conduzido para uma confirmação dos resultados em condições de outra modalidade de crescimento, ou seja, em frascos de maior volume de meio.

5.2.3 Avaliação dos meios selecionados sobre o crescimento diferencial das linhagens PE-2 e de panificação em frascos com maior volume (em relação às microplacas)

As curvas de crescimento obtidas para as linhagens referenciais propagadas em maior volume dos 3 meios anteriormente selecionados, mediante avaliação de densidade ótica em espectrofotômetro (600 nm), mostraram resultados com certa coerência com aqueles

encontrados nas avaliações em microplacas. O meio R se destacou como aquele que melhor diferencia as linhagens PE-2 e de panificação, quando comparados os crescimentos de ambas as linhagens (Figura 14).

Figura 14 – Perfil de crescimento, medido por D.O. (600 nm), nos intervalos de tempo de 6, 9, 12, 15, 18, 21, 33, 40 e 58 horas, das linhagens PE-2 e panificação, nos meios R, V e W

A linhagem de panificação se desenvolveu bem nos meios V e W e as diferenças entre as linhagens poderiam ser mais significativas se atingidas as fases estacionárias. O meio R foi capaz de definir diferenças entre as linhagens mesmo sem se atingir a biomassa final máxima, ou seja, já no início do crescimento. No entanto, em todos os meios a viabilidade de ambas as leveduras estiveram ao redor de 95%, evidenciando os efeitos dos meios sobre o crescimento da linhagem, sem provocar, durante este período, a morte celular. Por tais características o meio R foi escolhido para a fase seguinte de seleção.

5.3 Seleção prévia para crescimento com o meio R

Como o meio R se mostrou mais discriminatório que o primeiro utilizado (mosto misto com 25% de ART), as linhagens foram novamente submetidas à avaliação mediante o crescimento em 24 horas em microplacas. Para tal foram escolhidas 200 linhagens selecionadas pelo maior crescimento no meio com 25% de ART ($D.O._{24\text{horas}}$ superior a 50% do valor observado para a PE-2), às quais se somaram mais 249 linhagens ainda não avaliadas, pertencentes à coleção do laboratório, resultando num total de 449 linhagens. Cada

linhagem foi avaliada em triplicata, sendo que o valor apresentado se refere à média dos valores da densidade óptica.

Os resultados dos crescimentos, em 16 placas (lotes) de 96 poços, mostram que o meio R foi eficiente em discriminar o crescimento das linhagens, de modo que foi possível selecionar aquelas que apresentaram crescimento superior ao da PE-2, referenciada na respectiva placa do mesmo lote (Figura 15).

Figura 15 – Perfil de crescimento, medido por densidade óptica (D.O.) a 570 nm ao final de 24 horas, das diferentes linhagens avaliadas sob exposição ao meio R, em cada lote. Barras negras correspondem às cepas selecionadas em cada lote

(continua)

Figura 15 – Perfil de crescimento, medido por densidade óptica (D.O.) a 570 nm ao final de 24 horas, das linhagens avaliadas sob exposição ao meio R, em cada lote. Barras negras correspondem às cepas selecionadas em cada lote

(continuação)

Figura 15 – Perfil de crescimento, medido por densidade óptica (D.O.) a 570 nm ao final de 24 horas, das linhagens avaliadas sob exposição ao meio R, em cada lote. Barras negras correspondem às cepas selecionadas em cada lote

(conclusão)

Fica claro, pela observação das figuras, que dentre centenas de linhagens avaliadas poucas se destacaram em termos de D.O. ao final de 24 horas, e que portanto o uso desse meio para selecionar cepas com potencial para fermentar com alto teor alcoólico foi eficiente,

visto que até o momento nenhuma linhagem com tolerância superior à PE-2 foi relatada na literatura. Assim, pelo parâmetro empregado, apenas 34 cepas foram selecionadas dentre mais de 500 linhagens testadas.

Dentre as cepas provenientes das amostras cariotipadas oriundas das destilarias na safra 2010/2011, uma única linhagem apresentou crescimento superior ao da PE-2 no screening com o meio R (linhagem 4 – Figura 15 (Lote 6)). Essa linhagem destacou-se como dominante na destilaria A (Figura 3 - perfis 2, 3, 5, 6, 7 e 9, Tabela 3 – Anexo A). O crescimento das demais cepas oriundas das outras destilarias foi inferior ou semelhante ao da PE-2 (Figura 15 - linhagens 1, 2, 8, 9, 10, 13, 23, 28, 35 36, 41, 42, 43, 44, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 60, 507 a 522), inclusive àquelas referidas como rearranjos cromossômicos da PE-2 ou da CAT-1 (Figura 15 – linhagens 507 a 509, 521 e 522).

5.4 Pré-seleção das linhagens provenientes do screening com o meio R por meio de experimento de fermentação com reciclo celular e incrementos nos teores alcoólicos

As 34 linhagens isoladas na etapa anterior foram avaliadas em condições de reciclos fermentativos com incrementos nos teores de etanol. Para tal, a avaliação foi conduzida em dois lotes (com 15 e 19 cepas cada um), sendo ambos contrastados com a linhagem PE-2 como referência.

As 15 cepas avaliadas no primeiro lote foram as linhagens referidas como 4, 114, 150, 179, 190, 207, 210, 228, 232, 257, 271 281, 285, 291 e 292 (Figura 15).

O parâmetro biomassa foi considerado importante para a etapa de seleção, pois o crescimento celular é um indicativo de que a levedura está conseguindo se adaptar às condições impostas na fermentação. Segundo a literatura, a produção de etanol está fortemente acoplada ao crescimento celular da levedura devido ao consumo contínuo de ATP pelo crescimento das mesmas, sem isso o metabolismo glicolítico da glicose seria imediatamente interrompido devido ao acúmulo de ATP que acaba por inibir a fosfofrutoquinase (PFK), uma das enzimas regulatórias mais importantes da glicólise (BAI et al., 2008). Pelo motivo descrito, a taxa de fermentação alcoólica de células de levedura que não exibem crescimento são ao menos 30 vezes menores que para aquelas que crescem (INGLEDEW, 1999 apud BAI et al., 2008).

Figura 16 – Formação de biomassa (g), no decorrer de 11 ciclos fermentativos, para as linhagens (a) PE-2, (b) 4, (c) 114, (d) 150, (e) 179, (f) 190, (g) 207, (h) 210, (i) 228, (j) 232, (k) 257, (l) 271, (m) 281, (n) 285, (o) 291, (p) 292, avaliadas no primeiro lote

A Figura 16 mostra os ganhos em biomassa ao longo de 11 ciclos fermentativos para as 15 linhagens e a referência (PE-2), avaliadas no primeiro lote. As linhagens 207, 210, 228 e 281 se destacaram pelo crescimento superior ao da PE-2, sugerindo uma maior tolerância aos estresses impostos pelo meio. No entanto a linhagem 281 exibiu característica de elevada formação de espumas com flotação de fermento, o que é indesejável para uma levedura industrial (BASSO et al., 2008). Esta característica foi igualmente notada nas linhagens 4, 190, 232 e 271. Com crescimento semelhante ao da PE-2 se destacaram as linhagens 150 e 292.

Quanto à viabilidade celular tomada no último ciclo fermentativo (Figura 17), percebe-se que apenas 10 linhagens apresentaram viabilidade ao redor do valor exibido pela

PE-2 (acima de 90%). Reputa-se à viabilidade um parâmetro de extrema significância, visto que é determinante para o sucesso das fermentações com reciclos, que juntamente com o crescimento definem a tolerância de uma linhagem (BASSO et al., 2008). Dentre estas linhagens com maior viabilidade se destacam a 150, 190, 207, 210, 228, 232, 281, 285, 291 e 292, e dentre elas as linhagens 207, 210, 228 e 281 com elevadas taxas de crescimento.

Figura 17 – Viabilidades celulares (%) das diferentes linhagens avaliadas no primeiro lote em comparação com a referência PE-2, ao final do último ciclo fermentativo

Quanto à produção de etanol, avaliada nos ciclos 9, 10 e 11 (Figura 18), se nota que realmente os teores alcoólicos aumentaram no transcorrer dos reciclos, ultrapassando 16% para algumas linhagens no último ciclo. As linhagens 207, 210, 228 e 292 (destacadas acima) apresentam valores de etanol igual ou superiores ao da linhagem referência por ocasião do último ciclo fermentativo.

Figura 18 – Produção de etanol (% v/v), ao final dos 9º, 10º e 11º ciclos fermentativos, para as diferentes linhagens avaliadas no primeiro lote em comparação com a referência PE-2

A cepa 292 produziu igual biomassa (Figura 16), sintetizou maiores ou iguais teores de etanol (Figura 18) e exibiu viabilidades semelhantes à linhagem referência (PE-2), sendo também considerada uma linhagem promissora para a fermentação com alto teor alcoólico.

Embora as linhagens 190, 232 e 281 apresentaram desempenho notável em um ou mais parâmetros avaliados, as mesmas exibiram comportamento indesejável com formação de espuma com arraste de fermento em direção a borda do tubo, ocorrendo até transbordamento no caso das cepas 190 e 281, o que leva a descartar tais linhagens das etapas seguintes de seleção. Basso et al., (2008) relatam sobre o aumento do uso de anti-espumantes quando as linhagens produzem quantidade excessiva de espuma, o que eleva os custos de produção do etanol.

Em vista do exposto, levando-se em consideração as associações de características desejáveis destacadas em determinadas linhagens, selecionou-se as cepas 150, 207, 210, 228, 291 e 292 para uma avaliação mais pormenorizada em fermentações com ciclos e alto teor alcoólico.

Na avaliação do segundo lote, as 19 linhagens restantes que foram selecionadas com o meio R foram as cepas 324, 328, 351, 355, 361, 371, 373, 386, 388, 390, 402, 412, 415, 419, 431, 438, 476, 480 e 506 (Figura 15).

Quanto à avaliação do segundo lote, se observa igualmente cepas com elevada capacidade de produção de biomassa no transcorrer de 10 ciclos fermentativos, igualmente em condições de incrementos graduais nos teores alcoólicos (Figura 19).

Figura 19 – Formação de biomassa (g), no decorrer de 10 ciclos fermentativos, para as linhagens (a) PE-2, (b) 324, (c) 328, (d) 351, (e) 355, (f) 361, (g) 371, (h) 373, (i) 386, (j) 388, (k) 390, (l) 402, (m) 412, (n) 415, (o) 419, (p) 431, (q) 438, (r) 476, (s) 480 e (t) 506, avaliadas no segundo lote

A evolução da biomassa durante os ciclos (Figura 19) demonstra que as linhagens 351, 371, 390, 419 e 506 apresentaram maiores crescimento que a referência, e, com exceção das linhagens 388 e 431, que exibiram menores crescimentos, as demais se mostraram com crescimentos próximos aos da referência.

Analisando o parâmetro biomassa, verificou-se que a linhagem que mais se destacou foi a 419 (Figura 19o), permanecendo maior que a PE-2 em todos os ciclos fermentativos. Paralelamente a tal observação, esta mesma linhagem produziu também maiores teores alcoólicos nos ciclos 7, 8, 9 e 10 (Figura 20). No ciclo 9, esta cepa apresentou viabilidade maior que a da PE-2, embora no ciclo 10 tenha havido um decréscimo um pouco mais pronunciado que para a PE-2 (Figura 21).

Figura 20 – Produção de etanol (% v/v), ao final dos 6º, 7º, 8º, 9º e 10º ciclos fermentativos, para as diferentes linhagens avaliadas no segundo lote, em comparação com a referência PE-2

Quanto à viabilidade celular (Figura 21) ao final do ciclo 9 se percebe que apenas duas linhagens (388 e 431) exibiram redução drástica no mencionado parâmetro, enquanto que as demais mantiveram valores muito próximos ao da PE-2. Foi por esta razão que para o ciclo 10 optou-se por provocar um estresse adicional (as leveduras foram mantidas no meio fermentado a 30°C por várias horas após o final da fermentação). Este tratamento, aplicado a todas as linhagens, levou a uma intensificação dos estresses térmico, etanólico e ácido, permitindo observar linhagens com maiores tolerâncias a esta condição. Percebe-se os efeitos desta condição estressante adicional já nos ganhos em biomassa por ocasião do último ciclo (Figura 19), quando a maioria das linhagens tiveram redução nas biomassas.

Figura 21 – Viabilidades celulares (%) das diferentes linhagens avaliadas no segundo lote, em comparação com a referência PE-2, ao final do 9º e 10º ciclos fermentativos

Tais efeitos foram muito severos nas viabilidades observadas no ciclo 10 (Figura 21), quando se nota quedas acentuadas em todas as linhagens. As linhagens 328, 351, 371, 415 e 480 apresentaram valores de viabilidades semelhantes aos da PE-2, enquanto as linhagens 361, 390 e 506 se mostraram mais tolerantes.

Os teores alcoólicos foram crescentes ao longo dos ciclos atingindo 16,5% de etanol para algumas linhagens (Figura 20). Duas (419 e 438) se destacaram neste parâmetro, quando comparadas com a linhagem referência, especialmente no último ciclo. As cepas 361 e 390 produziram quantidades semelhantes ao da PE-2, na maioria dos ciclos. A linhagem PE-2 é conhecida pelo seu alto rendimento em etanol (BASSO et al., 2008), e portanto linhagens com eficiência próximas da mesma, seriam linhagens com atributos desejáveis neste parâmetro.

No último ciclo fermentativo foram estimados os teores de açúcares residuais após a fermentação (Figura 22), e tais resultados mostram que as linhagens com os maiores teores remanescentes de açúcares foram as mesmas que exibiram os menores teores de etanol (Figura 20). Tal constatação demonstra que estas linhagens não foram capazes de assimilar todo o substrato, o que vem a ser um dos efeitos do elevado teor alcoólico destas fermentações (BAI et al., 2008), pois sabe-se que o etanol prejudica sistemas de transporte envolvidos na captação de glicose e outros nutrientes por motivos de danos na membrana citoplasmática (LEÃO; van UDEN, 1982; 1984).

Basso et al., (2008) também relataram que a maioria das cepas produtoras de espuma também levaram à flotação celular, e que tanto a flotação quanto a floculação reduzem o contato das leveduras com o substrato, elevando o tempo de fermentação e resultando em alta concentração de açúcares residuais após a fermentação.

Figura 22 – ART residual (%) das diferentes linhagens avaliadas no segundo lote, em comparação com a referência PE- 2, ao final do 10º ciclo fermentativo

Convém destacar, que à semelhança do que ocorreu no lote anterior, algumas linhagens, inclusive com bom desempenho em relação a alguns parâmetros avaliados, exibiram a característica indesejável de produção de espumas em excesso (linhagens 324, 351, 355, 371, 373, 415 e 480), sendo descartadas quanto à avaliação seguinte. Linhagens produtoras de espuma em excesso impossibilitam o uso da capacidade total do fermentador e requerem o consumo de produtos anti-espumantes, o que leva ao aumento dos custos de produção do etanol (BASSO et al., 2008). Assim, para a próxima etapa da seleção, foram escolhidas as linhagens 361, 390, 419 e 438, em função de uma avaliação conjunta dos diversos parâmetros considerados.

5.5 Avaliação final das linhagens selecionadas quanto ao desempenho fermentativo em condições de reciclo e alto teor alcoólico

No primeiro lote foram avaliados os desempenhos fermentativos das cepas 292, 228, 150 e 207 em condições de fermentação com alto teor alcoólico na temperatura de 32,5°C, buscando potencializar os estresses associados a esse tipo de fermentação. Tais fermentações

foram conduzidas de modo a simular, tanto quanto possível, os procedimentos adotados na indústria, quanto ao tipo de mosto (misto) e preparo do pé-de-cuba (concentração de creme de levedo na centrífuga ao redor de 65-70%). Para maior segurança estatística os ensaios foram conduzidos durante 7 ciclos fermentativos com 3 repetições por tratamento (diferentes linhagens). Durante o terceiro ciclo fermentativo foi imposto um estresse adicional às leveduras: após a fermentação as mesmas foram mantidas à 32,5°C por várias horas no próprio vinho.

A produção de biomassa foi bastante discriminatória quanto às possíveis diferenças fisiológicas entre as linhagens avaliadas (Figura 23). Tal parâmetro foi destacadamente maior para a linhagem 207 em todos os ciclos, enquanto que para a linhagem 228 este parâmetro foi maior que o da linhagem referência (PE-2) na maioria dos ciclos e especificamente no último ciclo fermentativo. A linhagem 292 igualmente apresentou uma recuperação da biomassa notadamente nos dois últimos ciclos, superando a linhagem referência.

Percebe-se que no terceiro ciclo, ocasião na qual foi imposto o estresse térmico adicional, as leveduras tiveram o crescimento reduzido, sendo que as linhagens 228 e 207 foram menos afetadas.

O glicerol é o composto secundário mais abundantemente produzido pela levedura durante a fermentação alcoólica e se constitui em desvio significativo do açúcar em detrimento da formação de etanol (ALVES, 1994). As linhagens avaliadas apresentaram diferentes capacidades de produção de glicerol (Figura 24), sendo que tais produções foram maiores a partir do ciclo 3, coincidindo com as quedas de viabilidade celular (Figura 25) e elevação nos teores alcoólicos (Figura 31). Este incremento na formação de glicerol parece estar mais acoplado aos estresses desta fermentação do que em relação ao crescimento em biomassa. Tanto assim que a linhagem 207, que apresentou os maiores crescimentos, igualmente produziu os menores teores de glicerol, notadamente a partir do ciclo 3 (Figura 24). Da mesma forma, a cepa 228 que geralmente cresceu mais que a referência PE-2 também sintetizou menores concentrações de glicerol ao longo dos ciclos.

Figura 23 – Biomassa úmida centrifugada (g) para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 24 – Teores de glicerol nos vinhos (% m/v) para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

É importante ressaltar que a síntese do glicerol em condições de anaerobiose serve para a manutenção do equilíbrio de redox intracelular desbalanceado por metabolismos oxidativos conduzidos pela levedura (formações de biomassa e ácidos succínico e acético), resultando em excesso de NADH na célula (NORDSTROM, 1966; ALVES, 1994; BASSO et al., 1996; ANSELL et al., 1997; WANG et al., 2001). Tal restabelecimento do potencial de redox é conseguido quando o NADH em excesso é reoxidado na formação de glicerol,

resultando em menor formação de etanol. Estima-se que 5 a 8% do açúcar metabolizado pela levedura seria convertido neste poliálcool, em condições de fermentação com reciclo de células (ALVES, 1994).

Igualmente o glicerol é produzido em maiores quantidades quando de uma elevação na pressão osmótica, tanto pela alta concentração de açúcar como de sais (ALVES, 1994; MYERS et al., 1997; SHARMA, 1997). No presente experimento os mostos com crescentes teores de açúcares obtidos de melaço e caldo, seguramente impuseram tais estresses.

Dessa forma é de peculiar interesse linhagens que apresentem crescimento vigoroso, mas que, no entanto produzam menores quantidades de glicerol, uma vez que a linhagem de levedura influencia fortemente a quantidade formada (GUTIERREZ, 1991) e pelo fato deste metabólito se formar na mesma via de síntese do etanol, como um desvio, sua produção é inversamente proporcional a do etanol, causando queda na eficiência fermentativa (BASSO et al., 1996). Isso é um indicativo de que tanto a cepa 207 quanto a 228 são produtoras de baixas quantidades de glicerol.

Os teores de trealose foram diferentes para as linhagens, tanto antes quanto durante os ciclos fermentativos (Figura 26), sendo que as linhagens 228 e 207 sempre apresentaram os maiores valores. O acúmulo desse dissacarídeo em linhagens de *S. cerevisiae* está relacionado com a manutenção da viabilidade celular e tolerância ao etanol durante a fermentação alcoólica (MANSURE et al., 1997).

A mesma tendência foi observada em relação aos teores celulares de glicogênio e reservas totais (trealose e glicogênio) (Figura 27), demonstrando que estas linhagens possuem uma vantagem fisiológica em relação às demais, quanto às tolerâncias aos diversos estresses propiciadas pelos maiores teores das reservas. Tanto assim que tais linhagens puderam sustentar maior viabilidade (Figura 25) na maioria dos ciclos fermentativos.

Existe um sinergismo entre temperatura e etanol, fazendo com que este último seja ainda mais severo sob elevadas temperaturas e várias evidências sugerem que as alterações induzidas nas leveduras por níveis tóxicos de etanol são idênticas às provocados pelo calor (PIPER, 1995; ALDIGUIER et al., 2004).

No entanto se percebe uma redução nos níveis de trealose para todas as linhagens por ocasião do último ciclo fermentativo (Figura 26). Intrigante em relação ao já estabelecido na literatura é o fato da linhagem 150 apresentar altos valores de glicerol a despeito de menor formação de biomassa e menor acúmulo de carboidratos de reserva (glicogênio e trealose) e mesmo assim manter maior viabilidade ao final dos ciclos. Neste particular é importante lembrar que valores de viabilidade de diferentes linhagens de leveduras e respectivos níveis

de trealose, nem sempre mostram uma relação direta (GUTIERREZ, 1989), pois que muito do efeito protetor da trealose se deve à mesma estar alocada na membrana plasmática, e esta proporção pode ser dependente da linhagem. Da mesma forma, também se observa que o efeito protetor da trealose relaciona-se com uma adequada alocação das moléculas em ambos os lados da membrana, executada por um transportador (ELEUTHERIO et al., 1993)

Figura 25 – Viabilidade celular (%) das diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 26 – Teores celulares de trealose (% na matéria seca) nas diferentes linhagens, no início da 1ª fermentação e ao final dos ciclos 4 e 7. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 27 – Teores celulares de glicogênio (% na matéria seca) e de reservas totais (glicogênio + trealose - % na matéria seca) das diferentes linhagens, ao final do último ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Neste experimento, a levedura foi continuamente exposta a um conjunto de fatores estressantes, seja pela pressão osmótica ou pelas elevadas concentrações alcoólicas, ou mesmo pela acidez do melaço. Por conseguinte, verificou-se para todas as linhagens a mobilização da trealose ao final do último reciclo, denotado pelo decréscimo dos teores em relação ao conteúdo inicial. Permaneceram com maiores concentrações de trealose as linhagens 207 e 228.

Na literatura, vários trabalhos sugerem que a trealose possui também a função de proteção para a célula de levedura durante processos de estresse (THEVELIAN, 1984; ALCARDE; BASSO et al., 1997). O acúmulo deste dissacarídeo ocorre quando a célula passa por um período de baixo crescimento, privação de nutrientes ou sofre estresses ambientais (THEVELIAN, 1984). Em fermentações industriais, a levedura encontra-se exposta continuamente a um conjunto de situações estressantes, que de acordo com a intensidade podem acarretar a exaustão do seu conteúdo de trealose acompanhada pela queda da viabilidade (BASSO et al., 1996).

Notavelmente, a linhagem 207 seguida da 228 foram as que apresentaram maior resistência aos estresses impostos ao longo das fermentações, exibindo viabilidade superior à PE-2 ao longo dos reciclos. Isso é corroborado pelos teores de trealose que sempre se mantiveram em níveis maiores para estas linhagens.

Quanto aos teores de glicogênio presentes na biomassa ao final do último reciclo, observou-se maior acúmulo para a linhagem 207, seguida da 228 e da PE-2, embora foram

considerados iguais estatisticamente (Figura 27). O acúmulo de glicogênio é um parâmetro muito importante, pois este componente fornece energia e esqueleto de carbono para a célula em condições de privação de nutrientes. Sua síntese, assim como a da trealose, ocorrem devido à alterações no metabolismo do carbono em resposta a situações estressantes (HOHMANN, 2002). Silljé et al., (1999) relataram que após um decréscimo na taxa de crescimento, as leveduras começam a acumular ambos os carboidratos, e estes podem então, serem usados para manutenção celular em situações de exaustão de carbono ou serem usados no início de um novo ciclo de divisão celular, fornecendo rapidamente um fluxo maior de carbono e ATP quando as condições melhoram.

As eficiências de produção de etanol, mostradas pelo fator de conversão de substrato em etanol (Y_p/s), foram variáveis para as diferentes linhagens (Figura 28) e notadamente menores a partir do ciclo 4, ocasião na qual o glicerol foi produzido em maiores quantidades (Figura 24). A partir do ciclo 4 este parâmetro parece ser superior para a linhagem 228 e, especialmente a 207. Para esta cepa, as maiores sínteses de biomassa não afetaram a produção de etanol (Figura 31), pelo contrário, em vários ciclos a síntese deste produto foi igual ou maior que a da referência PE-2. O Y_p/s se mostra bem reduzido para a linhagem 292 no ciclo 4, ocasião onde o teor de açúcar residual foi bastante elevado (Figura 29), mostrando a coerência da metodologia empregada nestas avaliações.

Vale a pena ressaltar que as linhagens 292 e 228 conseguiram se recuperar ao final do último reciclo tanto em crescimento, como em viabilidade e produção de etanol, de modo que tais parâmetros ficaram superiores ou iguais estatisticamente à PE-2. Tal comportamento poderia se tornar mais acentuado se houvesse continuidade nos reciclos.

Da mesma forma, o rendimento em etanol expresso na fração do açúcar fornecido às leveduras que se transformou em etanol (Figura 30), permite as mesmas deduções. Para o cálculo deste parâmetro não se considera o açúcar residual, porém, como estes valores foram baixos (em relação ao açúcar fornecido) os dois parâmetros (Y_p/s e rendimento %) apresentam um paralelismo. Assim, o maior desvio entre os dois parâmetros fica por conta da linhagem 292 no ciclo 4, onde se nota alto valor de açúcar residual (Figura 29).

Cabe destaque novamente para a linhagem 207 que apresentou maiores valores de conversão de substrato notavelmente nos últimos reciclos. Associando tal fator às mínimas concentrações de açúcares residuais (Figura 29) nos vinhos ao longo dos reciclos pode-se dizer que esta cepa exibiu um excelente desempenho fermentativo.

Figura 28 – Fator de conversão de substrato em etanol (Y_p/s , expresso em g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado), para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 29 – Açúcar residual total (%), g/100mL de vinho) para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 30 – Rendimento fermentativo (% , fração do açúcar que se converteu em etanol) das diferentes linhagens, ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 31 – Concentração de etanol (% , v/v) nos vinhos deleiturados das diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

No segundo lote foram avaliados os desempenhos fermentativos das cepas 291 e 210, 361, 438, 419 e 390 em condições de fermentação com alto teor alcoólico na temperatura de 32°C, simulando as mesmas condições do ensaio anterior.

De modo geral, analisando-se a formação de biomassa (Figura 32), foi possível constatar que as linhagens conseguiram crescer até o 3º ciclo, onde o teor alcoólico atingido foi ao redor de 14,5%. No 4º ciclo houve um leve incremento no teor alcoólico para 14,8%, o

que prejudicou o crescimento, com tendência para a queda da biomassa até o último ciclo, no qual o teor alcoólico chegou próximo de 15,5%.

A produção de biomassa foi notavelmente superior para as cepas 210 e 419, de modo que a diferença em relação à referência (PE-2) se tornou mais proeminente a partir do 5º ciclo. A linhagem 361, a partir desse mesmo ciclo, comportou-se igualmente à referência para este parâmetro.

A exposição ao estresse osmótico faz com que a célula ajuste seu metabolismo para proporcionar um aumento na síntese de glicerol que age como osmólito compatível (ATTFIELD, 1997), sendo que o mesmo é excretado após o desaparecimento do estresse osmótico, ao final da fermentação. A produção do glicerol está relacionada também com o crescimento celular (NORDSTRÖM, 1966) e formação de ácidos orgânicos (ALVES, 1994), e sabe-se que a linhagem de levedura influencia fortemente a quantidade formada (GUTIERREZ, 1991).

Para os conteúdos de glicerol formado (Figura 33) observou-se uma tendência de maior produção ao final dos últimos ciclos, possivelmente decorrente dos estresses impostos pela fermentação com alto teor alcoólico do que pela produção de biomassa, especialmente para as linhagens 291 e 438. Para as cepas 210 e 419 quantidades semelhantes àsquelas produzidas pela PE-2 foram observadas para a maioria dos ciclos.

Figura 32 – Biomassa úmida centrifugada (g) para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 33 – Teores de glicerol nos vinhos (% m/v) para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

As leveduras PE-2, 210, 419 e 390 apresentaram viabilidades constantes e elevadas (acima de 95%) até o 4º ciclo (Figura 34), o que é condizente com a observação feita para o crescimento. A partir deste ciclo ocorreu um declínio gradual da viabilidade para todas as linhagens avaliadas. Porém com a feliz observação de que as cepas 210 e 419 apresentaram viabilidades superiores a da referência, em especial no último ciclo.

As menores viabilidades observadas ocorreram para a cepa 438, destacadamente a partir do ciclo 5. Observa-se certa correlação entre a queda na viabilidade e o aumento da produção de glicerol por esta linhagem. Esta mesma observação prevalece para as cepas 291 e 361. Uma possível explicação para isso seria o efeito da pressão osmótica exercida pelo mosto de alimentação, que foi mantida em todos os ciclos. As linhagens com o objetivo de tentar se recuperar desse estresse aumentaram a síntese do glicerol. Como descrito na literatura, a resposta celular frente ao estresse hiperosmótico resulta primeiramente em repressão do crescimento ((BELLÍ et al., 2001; ALEXANDER et al., 2001), seguida do acúmulo de glicerol no interior celular com o objetivo de recuperar o turgor (HOHMANN, 2002). Porém ao final da fermentação este glicerol produzido é extravasado para o exterior e detectado no vinho delevedurado (SHEN et al., 1999). Além disso, assim como para a temperatura, o aumento da pressão osmótica age de forma sinérgica com o etanol, potencializando o efeito tóxico do mesmo levando a redução da viabilidade celular em *S. cerevisiae* (JOHN et al., 2012).

Quanto aos teores de trealose (Figura 35) se observa maiores conteúdos celulares nas linhagens 210 e 419 antes do início dos ciclos. No entanto, os conteúdos desta reserva no final dos ciclos não se correlacionaram às viabilidades observadas na mesma ocasião (Figura 34). Por outro lado, os conteúdos celulares de glicogênio foram superiores para as linhagens 210 e 419 no final dos ciclos fermentativos (Figura 36). A literatura a respeito das relações entre a viabilidade ou vitalidade de *Saccharomyces cerevisiae* e os conteúdos dessas reservas é bastante polêmica. Embora a maior parte dos trabalhos mostrem que elevados teores destas reservas estão associadas às maiores viabilidades ou vitalidades, outros relatos mostram ausência de correlação entre estes parâmetros (GUTIERREZ, 1989; GUTIERREZ; De MARTIN ORELLI, 1991). Se percebe que tais faltas de correlações se devem às comparações entre diferentes linhagens ou da mesma linhagem porém em condições fisiológicas distintas.

Slaughter e Nomura (1992) observaram que teores elevados de glicogênio estão associados com alta viabilidade, embora não de forma quantitativa. E neste mesmo trabalho, sob condições estressantes, a fase inicial de perda de viabilidade correlacionou com a perda de glicogênio, e o mesmo prevaleceu para a trealose.

As mesmas relações entre trealose, glicogênio e viabilidade podem ser percebidas analisando os dados de Ferreira et al. (1999) e Paulillo (2001). Nestes trabalhos foram avaliadas, respectivamente, as linhagens PE-2 e VR-1, e PE-2 e SA-1, sob diferentes condições estressantes (etanol, diferentes temperaturas, e ação estressante do sulfito). Destes dois trabalhos se depreende que os níveis elevados de trealose e glicogênio são capazes de sustentar alta viabilidade da levedura, porém ao se prolongar a situação estressante se percebe que estas reservas vão se esgotando. Quando os níveis de trealose atingem valores inferiores a 0,2% na matéria seca, a viabilidade da levedura se mostra extremamente afetada, conforme observado por Basso et al., (1996). Os teores de glicogênio sofrem redução contínua durante a imposição da condição estressante, enquanto aqueles de trealose podem oscilar, ocorrendo mesmo aumentos desta reserva às custas da degradação do glicogênio. A partir do momento em que as reservas de glicogênio não mais contribuem para a ressíntese de trealose, os níveis desta mostram drástica redução com consequente morte das células.

Em função de tais informações se deduz que ambas as reservas colaboram para a manutenção da viabilidade da levedura. Assim sendo, ao observarmos os conteúdos de ambas as reservas (glicogênio + trealose) se nota que tais parâmetros são superiores para as linhagens 210 e 419 (Figura 36), que se mostram com as maiores viabilidades.

De acordo com Eleutherio et al., (1993), para que o efeito protetor da trealose seja exercido em células de levedura, é necessário que a trealose esteja disposta em ambos os lados da membrana celular. Essa alocação é feita por uma proteína transportadora de trealose, sendo que um mutante deficiente neste transportador não pode sobreviver ao estresse da desidratação, mesmo tendo acumulado trealose endogenamente. Tais resultados evidenciam que não apenas os teores de trealose são importantes, como também a capacidade da linhagem de levedura em fazer a distribuição adequada deste carboidrato protetor em ambos os lados da membrana plasmática.

Assim é possível que as linhagens 210 e 419 apresentem uma distribuição adequada da trealose na membrana plasmática (alocada em ambos os lados) e, beneficiadas pelo maior conteúdo de glicogênio, venham a melhor superar os estresses da fermentação com alto teor alcoólico.

Figura 34 – Viabilidade celular (%) das diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 35 – Teores celulares de trealose (% na matéria seca) nas diferentes linhagens, no início das fermentações e ao final do ciclo 8. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 36 – Teores celulares de glicogênio (% na matéria seca) e de reservas totais (glicogênio + trealose - % na matéria seca) das diferentes linhagens, ao final do último ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de significância

A eficiência de conversão de substrato em etanol (Y_p/s) foi variável entre as linhagens (Figura 37), principalmente a partir do 5º ciclo. Em especial no último reciclo as linhagens 210 e 419 se destacaram quanto a esse parâmetro. No entanto quando se compara o

rendimento fermentativo (Figura 39) dessas duas cepas com a referência, a diferença não é significativa, possivelmente devido à maior concentração de açúcares residuais para as mesmas (Figura 38) e também pelo maior crescimento em biomassa apresentados por tais linhagens. A linhagem 361 se destacou na produção de etanol nos dois últimos ciclos (Figura 40), e a produção para a cepa 210 foi semelhante a da PE-2 em todos os ciclos. Para a linhagem 419 a produção foi semelhante a da referência em vários ciclos, embora um pouco menor no último ciclo, onde a concentração de açúcar residual foi mais acentuada. A linhagem PE-2 é conhecida pelo seu alto rendimento em etanol (BASSO et al., 2008), e portanto linhagens com eficiência próximas da mesma, seriam linhagens com atributos desejáveis.

Os menores valores de Y_p/s , rendimento e produção de etanol da linhagem 291 coincidem com as maiores concentrações de glicerol produzidas pela mesma (Figura 33). O mesmo vale para o Y_p/s reduzido da cepa 361 no último ciclo apesar de ter produzido os maiores teores de etanol e ter consumido todo o açúcar fornecido. Isso condiz com a produção de glicerol que se acentuou no 8º ciclo.

Pela análise conjunta dos parâmetros avaliados, pode-se dizer que as linhagens 210 e 419 exibiram desempenho fermentativo melhor que o da referência. As maiores viabilidades observadas para estas linhagens associadas ao maior acúmulo de reservas totais as qualificam como sendo mais tolerantes que a linhagem PE-2 para conduzir fermentação com alto teor alcoólico e reciclo celular.

Figura 37 – Fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$, expresso em g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado), para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 38 – Açúcar residual total (% g/100mL de vinho) para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 39 – Rendimento fermentativo (% , fração do açúcar que se converteu em etanol) das diferentes linhagens, ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Figura 40 – Concentração de etanol (% , v/v) nos vinhos deleverados das diferentes linhagens ao final de cada ciclo fermentativo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Vários trabalhos relatam sobre a fermentação com alto teor alcoólico, porém poucos se relacionam com o processo industrial tipo batelada alimentada, com reciclo total das leveduras e com alta densidade de células (10% de biomassa úmida), como praticado no

Brasil. Na maioria dos casos são fermentações em batelada pura, nos quais o mosto é adicionado de uma só vez empregando-se baixa concentração de inóculo e com tempo de fermentação com até 60 horas (PEREIRA et al., 2010, 2011).

Depreende-se que as condições fisiológicas impostas às leveduras são extremamente diferentes em ambos os processos (com alta e baixa densidade de células), pois que no processo com ciclos fermentativos a mesma célula de levedura irá se submeter a várias fermentações, enquanto num processo com baixo inóculo a célula irá participar de apenas uma fermentação. Assim, altos teores alcoólicos são mais facilmente obtidos em fermentações com baixo inóculo e sem reciclo de células (WHEALS et al., 1999; BASSO et al. 2011). Mesmo a linhagem PE-2 com seu notável perfil de tolerância a vários estresses não se mostrou adequada à fermentação com reciclo total de células (BASSO et al., 2003), embora os trabalhos de Pereira et al. (2010; 2011; 2012) evidenciem que a mesma linhagem foi considerada apta a conduzir fermentação com alto teor alcoólico.

Tal incoerência justifica-se pela observação de que nos dois primeiros trabalhos (PEREIRA et al., 2010 e 2011) as fermentações foram conduzidas sem reciclo iniciando-se com pequena quantidade de inóculo, e no último trabalho (PEREIRA et al., 2012) pelo sistema de ciclos conduzido pelos autores, onde a biomassa era removida e o inóculo era reduzido toda vez que a queda da viabilidade celular inviabilizava o processo. Desse modo se permitia que novas células fossem geradas (e para tal uma fonte de aminoácidos e minerais era acrescentada). Tais células seriam novamente substituídas após alguns ciclos quando a viabilidade celular novamente se reduzia.

Assim, Pereira et al. (2012) sugerem que a linhagem PE-2 tenha a capacidade de conduzir fermentações com alto teor de etanol (até 18% v/v) empregando-se mosto sintético a base de glicose (31 a 40%) suplementada com água de maceração de milho (fonte de aminoácidos e outros nutrientes), ureia e sais minerais. No entanto, houve grande incremento na formação de glicerol (1,8%), drástica queda da viabilidade celular da biomassa quando totalmente reciclada (valores menores que 30%), exigindo a inoculação com baixos teores de células (1,1% de biomassa úmida) para restaurar a viabilidade das mesmas, com consequente aumento no tempo de fermentação (até 50 horas). Tal processo não permitiria a economicidade desejada para a produção de etanol combustível.

No processo brasileiro a reutilização quase que total das células de levedura (95%) de um ciclo fermentativo para outro impõe uma situação estressante única (BASSO et al., 2011). Basso et al.(2003) avaliaram a linhagem PE-2 durante 6 ciclos fermentativos a 33°C com mosto misto (60% do açúcar oriundo de melaço) atingindo teores alcoólicos de 14,3% de

etanol. Embora a levedura tenha manifestado capacidade de crescimento e sustentado alta viabilidade durante os ciclos (90% ao final do último ciclo), as elevadas formações de glicerol (quase 1% no vinho) e o baixo rendimento em etanol (média de 68%) igualmente inviabilizaram a sua utilização num processo de fermentação com alto teor alcoólico.

Rendimentos mais elevados foram possíveis com a mesma linhagem em escala piloto (1000 litros) atingindo teores de 14-16% de etanol em condições de ciclo de células, porém exigindo uma temperatura mais baixa (27°C, para reduzir a ação estressante do etanol) e empregando-se xarope de cana como substrato, para evitar a ação estressante do melaço de cana (EMPRESA..., 2010; SIMTEC, 2010). O emprego do xarope, assim como da refrigeração especial exigida, oneraram significativamente o custo do processo. Dessa forma, fermentações ao redor de 30°C e empregando-se o melaço de cana (de menor custo que o xarope) se configuram como condições econômicas desejadas pela indústria alcooleira já instalada no país. Para tal, novas linhagens são necessárias, com um perfil de tolerância superior ao da linhagem PE-2.

Os resultados obtidos no presente trabalho destacaram pelo menos 4 linhagens (228, 207, 210 e 419) com perfis de tolerância superiores ao da linhagem PE-2, permitindo concluir que linhagens capazes de conduzir fermentações com alto teor de etanol podem ser obtidas da biodiversidade encontrada no ambiente das destilarias. Tais linhagens se mostram mais apropriadas para a fermentação com alto teor alcoólico, tornando possível a introdução de novas tecnologias com possibilidades de redução dos custos de produção do etanol, ao mesmo tempo que permitam uma maior sustentabilidade do processo industrial.

6 CONCLUSÕES

Dentro das condições em que foram conduzidos os experimentos, pode-se concluir que:

A estratégia de seleção pela formação de biomassa ao final de 24 horas em meio contendo múltiplos estresses (meio R - 15% ART; 667 ppm ácido acético; 3000 ppm ácido láctico; 6,7% (v/v) etanol inicial; pH 3,5; 30°C) mostrou-se eficiente em selecionar cepas com potencial para fermentar com alto teor alcoólico.

A metodologia empregada neste trabalho resultou em linhagens com tolerâncias múltiplas (estresse osmótico, etanólico, ácido e mesmo térmico, considerando fermentações com 32°C). Pelo menos 4 linhagens (228, 207, 210 e 419) exibiram melhores atributos fermentativos que a linhagem tomada como referência. Tais cepas se destacaram por maior produção de biomassa, menor ou igual síntese de glicerol, maior viabilidade e maior acúmulo de reservas totais (trealose e glicogênio).

Os perfis superiores de tolerância destas linhagens em relação à referência parecem estar relacionados com a capacidade das mesmas em acumular maiores teores de reservas totais (trealose e glicogênio), possibilitando maior resistência frente aos estresses impostos ao longo das fermentações.

Dentro da biodiversidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* encontradas no ambiente das destilarias brasileiras, foi possível destacar fenótipos apropriados com perfil de tolerância que os qualificam a suportar os estresses da fermentação com alto teor alcoólico e reciclo celular.

Estas linhagens permitiriam um avanço tecnológico na produção de etanol no país, devido às vantagens econômicas e ambientais decorrentes da implantação de um processo de fermentação, mesmo de primeira geração, com alto teor alcoólico no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BANAT, B.M.A; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 4, p. 861-867, 2010.
- 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, 1997.
- ALDIGUIER, A.S; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; GUILLOUET, S.E.; MOLINA-JOUE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 26, p. 217-222, 2004.
- ALEXANDER, M.R.; TYERS, M.; PERRET, M.; CRAIG, B.M.; FANG, K.S.; GUSTIN, M.C. Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 12, n. 1, p. 53-62, 2001.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação dos ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- AN, M.Z.; TANG, Y.Q.; MITSUMASU, K.; LIU, Z.S.; SHIGERU, M.; KENJI, K. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, p. 1367-1374, 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, Campinas, n. 7, p. 1-16, 2006.
- ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2179-2187, 1997.
- ARANDA, J.S.; SALGADO, E.; TAILLANDIER, P. Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 17, p. 129-140, 2004.
- ATTFIELD, P.V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 259-263, 1987.

ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R., McHALE, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

BARNETT, J.A; ENTIAN, K.D. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. **Yeast**, Davis, v.22, n. 11, p. 835-894, 2005.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5, 1993, Águas de São Pedro. CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993. Águas de São Pedro: **Anais...** Águas de São Pedro: STAB, v. 1, p. 246-250.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. (Ed.). **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. cap. 4, p. 38-85.

BASSO, L.C.; CARTE, C.L.; SILVESTRINI, C.; PAULILLO, S.C.L.; LUCATTI, L.; COSTA, V.M. Estudo comparativo entre a levedura “turbo” e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba: ESALQ/USP, v. 23, p. 12-25, 2003.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, 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: DOS SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel production** - recent developments and prospects. Croatia: INTECH, 2011. cap. 5, p. 85-100.

BECKER, V.J. A method for glycogen determination in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 86, n. 1, p. 56-64, 1978.

BELLÍ, G.; GARÍ, E.; ALDEA, M.; HERRERO, E. Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 39, n. 4, p. 1022-1035, 2001.

BENAROUDJ, N.; LEE, D.H.; GOLDBERG, A.L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 26, p. 24261-24267, 2001.

BENEY, L.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Coupling effects of osmotic pressure and temperature on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 513-516, 2001.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 33, p. 145-212, 1992.

BLONDIN, B.; VÉZINHET, F. Identification de souches de levure oenologiques par leur caryotypes obtenus en electrophorese en champ pulse. **Revue Française d'Oenologie**, Paris, v. 28, p. 7-11, 1988.

BREUNIG, K.D.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; BIANCHI, M.M.; BOURGAREL, D.; FALCONE, C.; FERRERO, I.; FRONTALI, L.; GOFFRINI, P.; KRIJGER, J.J.; MAZZONI, C.; MILKOWSKI, C.; STEENSMA, H.Y.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M.; ZEEMAN, A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 9-10, 2000.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 639-646, 1984.

CÁSSIO, F.; LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Transporte of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 3, p. 509-513, 1987.

COOTE, P.J.; COLE, M.B.; JONES, M.V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 7, p. 1701-1708, 1991.

COSTENOBLE, R.; VALADI, H.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; FRANZÉN, C.J. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 16, p. 1483-1495, 2000.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, Washington, v. 223, n. 4637, p. 701-703, 1984.

DEVANTIER, R.; SCHEITHAUER, B.; VILLAS-BÔAS, S.G.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 90, n. 6, p. 703-714, 2005.

DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1286-1291, 1987.

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

DUFOUR, J.P.; GOFFEAU, A. Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 105, n. 1, p. 145-154, 1980.

ELEUTHERIO, E.C.A.; ARAUJO, P.S.; PANEK, A.D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1156, n. 3, p. 263-266, 1993.

EMPRESA aposta na redução da vinhaça. **Jornal de Piracicaba**, Piracicaba, 13 jul. 2010. Caderno B, p. 3.

ERASO, P.; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 224, n. 1, p. 187-192, 1987.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469-486, 2000.

FEREA, T.L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ROSENZWEIG, R.F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, n. 17, p. 9721-9726, 1999.

FERREIRA, L.V.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 29-32, 1999.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

GUTIERREZ, L.E. **Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum***. 1989. 160p. Tese (Livre-docência em Bioquímica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 48, p. 55-69, 1991.

GUTIERREZ, L.E.; DE MARTIN ORELLI, V.F. Efeito do nitrito sobre a fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 48, p. 41-54, 1991.

HERNÁNDEZ-CORTÉS, G.; CÓRDOVA-LÓPEZ, J.A.; HERRERA-LÓPEZ, E.J.; MORÁN-MARROQUÍN, G.A.; VALLE-RODRÍGUEZ, J.O.; DÍAZ-MONTAÑO, D.M. Effect of pH, aeration and feeding non-sterilized agave juice in a continuous agave juice fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 9, p. 1423-1428, 2010.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

HOHMANN, S.; KRANTZ, M.; NORDLANDER, B. Yeast osmoregulation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 428, p. 29-45, 2007.

HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 12, p. 5518-5522, 1987.

HUANG, H.; GUO, X.; LI, D.; LIU, M.; WU, J.; REN, H. Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 16, p. 7486-7493, 2011.

HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V.; LIMA, L.; MULDER, L.; GEURTS, W.; WALSH, M.; LONDESBOROUGH, J. Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 5, p. 1563-1573, 2010.

INGLEDEW, W.M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook**. 3rd ed. UK: Nottingham University Press, 1999. p. 49-87.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 125, n. 2, p. 670-678, 1976.

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

JIMÉNEZ, J.; BENÍTEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1196-1198, 1987.

JIMÉNEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 9, p. 1275-1284, 2003.

JOHN, G.S.M.; GAYATHIRI, M.; ROSE, C.; MANDAL, A.B. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 100-105, 2012.

JONES, R.C.; HOUGH, J.S. The effect of temperature on the metabolism of baker's yeast growing on continuous culture. **Journal of General Microbiology**, London, v. 60, n. 1, p. 107-116, 1970.

JONES, R.P. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 11, p. 130-153, 1989.

LEÃO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, p. 2601-2604, 1982.

LEÃO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 774, n. 1, p. 43-48, 1984.

LEITE, R.C.C., LEAL, M.R L.V., CORTEZ, L.A.B, GRIFFIN, W.M., SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?. **Energy**, New York, v. 34, n. 5, p. 655-661, 2009.

LI, F.; ZHAO, X.Q.; GE, X.M.; BAI, F.W. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, p. 1079-1086, 2009a.

LI, L.; YE, Y.; PAN, L.; ZHU, Y.; ZHENG, S.; LIN, Y. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 387, p. 778-783, 2009b.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 631-677, 1988.

LOPES, M.L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE-2) utilizada no processo industrial de produção de etanol**. 2000. 118p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2000.

MA, M.; LIU, Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 829-845, 2010.

MADEIRA, A.; LEITÃO, L.; SOVERAL, G.; DIAS, P.; PRISTA, C.; MOURA, T.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 252-258, 2010.

MAGER, W.H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, p. 103-121, 1983.

MANSURE, J.J.; SOUZA, R.C.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 19, n. 12, p. 1201-1203, 1997.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – **Culturas/Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> Acesso em: 06 fev. 2012.

MENSONIDES, F.I.C.; SCHUURMANS, J.M.; MATTOS, M.J.T.; HELLINGWERF, K.J.; BRUL, S. The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 29, p. 103-106, 2002.

MORRIS, G.J.; WINTERS, L.; COULSON, G.E.; CLARKE, K.J. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 2023-2034, 1983.

MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 145-150, 1997.

NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. **Applied Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 383-391, 1974.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 26, p. 171-177, 2001.

NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2239-2243, 2005.

NISSEN, T.L.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, New York, v. 2, n. 1, p. 69-77, 2000a.

NISSEN, T.L.; HAMANN, C.W.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 5, p. 463-474, 2000b.

NORDSTRÖM, K. Yeast growth and glycerol formation. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 20, p. 1016-1025, 1966.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 89p.

ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G.J. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1810, n. 10, p. 933-944, 2011.

ORTIZ-ZAMORA, O.; CORTÉS-GARCÍA, R.; RAMÍREZ-LEPE, M.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Isolation and selection of ethanol-resistant and osmotolerant yeasts from regional agricultural sources in Mexico. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 32, n. 5, p. 775-786, 2009.

- PAGLIARDINI, J.; HUBMANN, G.; BIDEAUX, C.; ALFENORE, S.; NEVOIGT, E.; GUILLOUET, S.E. Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process. **Microbial Cell Factories**, London, v. 9, n. 36, p. 1-13, 2010.
- PAMPULHA, M.E.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 31, n. 5/6, p. 547-550, 1989.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 2321-2334, 2007.
- PARMAR, J.H.; BHARTIYA, S.; VENKATESH, K.V. Characterization of the adaptative response and growth upon hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 7, p. 1138-1148, 2011.
- PARROU, J.L.; ENJALBERT, B.; PLOURDE, L.; BAUCHE, A.; GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 15, p. 191-203, 1999.
- PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCÍA, I.; ROMAY, C. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 32, n. 3, p. 374-378, 1988.
- PAULILLO, S.C.L. **Mobilização do glicogênio e trealose endógenos de leveduras industriais**. 2001. 86p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 11, p. 1655-1661, 2010.
- PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011.
- PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 34, p. 45-53, 2012.
- PIDDOCKE, M.P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H.P; NIELSEN, K. F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 453-464, 2009.
- PIPER, P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339-356, 1993.

PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 134, p. 121-127, 1995.

PIPER, P.; CALDERON, C.O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 10, p. 2635-2642, 2001.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; OBULAM, V.S.R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

ROCHA-LEÃO, M.H.M.; PANEK, A.D.; COSTA-CARVALHO, V.L.A. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*: catabolite repression effects. **IRCS Medical Science-Biochemistry**, Lancaster, v. 12, n. 5, p. 411-412, 1984.

ROSA, M.F.; SÁ-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, n. 1, p. 23-27, 1992.

ROTHMAN-DENES, L.B.; CABIB, E. Two forms of yeast glycogen synthetase and their role in glycogen accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 66, n. 3, p. 967-974, 1970.

SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 903-909, 1988.

SHEN, B.; HOHMANN, S.; JENSEN, R.G.; BOHNERT, H.J. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 121, n. 1, p. 45-52, 1999.

SHI, L.; SUTTER, B.M.; YE, X.; TU, B.P. Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 21, p. 1982-1990, 2010.

SILLJÉ, H.H.W.; PAALMAN, J.W.G.; SCHURE, E.G.; OLSTHOORN, S.Q.B.; VERKLEIJ, A.J.; BOONSTRA, J.; VERRIPS, C.T. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 2, p. 396-400, 1999.

SIMPÓSIO INTERNACIONAL E MOSTRA DE TECNOLOGIA E ENERGIA
CANAVIEIRA - SIMTEC. Painel Fermentec, Piracicaba, 2010.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 1, p. 639-648, 1998.

SLAUGHTER, J.C.; NOMURA, T. Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, p. 64-67, 1992.

STANLEY, D.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; ROGERS, P.; STANLEY, G.A. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 37, p. 139-149, 2010.

SWAN, T.M.; WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 191-197, 1998.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

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.

UNICA, União da Indústria de Cana-de-Açúcar - **Etanol brasileiro terá livre acesso aos EUA em 2012 depois de mais de 30 anos de protecionismo**. Publicado em 23/12/2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias>> Acesso em: 07 fev. 2012.

VANEGAS, J.M.; CONTRERAS, M.F.; FALLER, R.; LONGO, M.L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, New York, v. 102, n. 3, p. 507-516, 2012.

VARELA, J.C.S.; MAGER, W.H. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. **Microbiology**, New York, v. 142, n. 4, p. 721-731, 1996.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.M.; CASEY, W.M.; PARKS, L.W. *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2853-2857, 1990.

WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001.

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

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, p. 63-102, 2000.

YOU, K.M.; ROSENFELD, C.L.; KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1499-1503, 2003.

ZAGO, E.A.; SILVA, F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ, ESALQ, 1996. 194p.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 3 – Identificação das linhagens oriundas das amostras cariotipadas das cinco destilarias na safra 2010/2011 quanto à numeração dada para cada linhagem

Linhagem	Identificação	Linhagem	Identificação
1	perfis 1 e 15-Destilaria A	45	perfil 5 e 7-Dest.D(1)
2	perfis 12, 13 e 14-Destilaria A	46	perfil 6-Dest.D(1)
3	perfis 4 e 11-Destilaria A	47	perfil 8-Dest.D(1)
4	perfis 2, 3, 5, 6, 7 e 9-Dest.A	48	perfil 10-Dest.D(1)
5	perfis 1 a 15-Dest.A	49	perfil 11-Dest.D(1)
17	perfis 1 e 4-Dest.B	50	perfil 13-Dest.D(1)
18	perfil 2-Dest.B	51	perfil 1-Dest.D(2)
19	perfil 3-Dest.B	52	perfis 2, 3, 6, 7, 8, 10- Dest.D(2)
20	perfil 5-Dest.B	53	perfil 4 e 9-Dest.D(2)
21	perfil 6-Dest.B	54	perfil 5-Dest.D(2)
22	perfil 7-Dest.B	55	perfil 6-Dest.D(2)
23	perfil 8-Dest.B	56	perfil 11,12,13, 14,15-Dest.D(2)
24	perfil 9-Dest.B	510	perfis 2 e 3-Dest.D(3)
25	perfil 10-Dest.B	511	perfis 1, 5 e 8-Dest.D(3)
6	perfis 1 e 2-Dest.C	512	perfis 6 e 7-Dest.D(3)
7	perfis 3 e 5-Dest.C	513	perfil 4-Dest.D(3)
8	perfis 7 e 8-Dest.C	514	perfil 9-Dest.D(3)
9	perfis 9 e 11-Dest.C	515	perfil 10-Dest.D(3)
10	perfil 4-Dest.C	516	perfil 11-Dest.D(3)
11	perfil 6-Dest.C	517	perfil 12-Dest.D(3)
12	perfil 10-Dest.C	518	perfil 13-Dest.D(3)
13	perfil 12-Dest.C	519	perfil 14-Dest.D(3)
14	perfil 13-Dest.C	520	perfil 15-Dest.D(3)
15	perfil 14-Dest.C	521	perfil 7-Dest.E(1)
16	perfil 15-Dest.C	522	perfil 8-Dest.E(1)
41	perfil 1-Dest.D(1)	507	perfil 4-Dest.E(2)
42	perfis 2, 9, 12, 14, 15-Dest.D(1)	508	perfil 9-Dest.E(2)
43	perfil 3-Dest.D(1)	509	perfil 12-Dest.E(2)
44	perfil 4-Dest.D(1)		

ANEXO B

Tabela 4 – Parâmetros do crescimento das linhagens avaliadas em meio composto de mosto misto com 25% de ART. Medida da densidade óptica (D.O._{570nm}) ao final de 24 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu\text{máx}$ (h^{-1})). Cada valor corresponde à média de 3 repetições para cada linhagem. As comparações com os padrões foram feitas por lote

(continua)

Lote 1/ Linhagem	$\mu\text{máx}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)	Lote 2/ Linhagem	$\mu\text{máx}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)	Lote 3/ Linhagem	$\mu\text{máx}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)
CAT-1	0,292	1,1671	CAT-1	0,228	1,104	CAT-1	0,225	1,090
PE-2	0,311	1,1945	PE-2	0,224	1,105	PE-2	0,207	1,111
1	0,209	0,793	29	0,205	0,738	57	0,214	1,039
2	0,218	0,782	30	0,210	0,668	58	0,112	0,314
3	0,171	0,769	31	0,051	0,203	59	0,214	1,081
4	0,219	0,818	32	0,197	0,742	60	0,246	0,989
5	0,185	0,780	33	0,194	0,770	61	0,181	0,936
6	0,177	0,767	34	0,172	0,784	62	0,134	0,285
7	0,214	0,747	35	0,182	0,747	63	0,127	0,533
8	0,226	0,795	36	0,164	0,727	64	0,187	1,088
9	0,160	0,644	37	0,214	0,768	65	0,175	1,031
10	0,207	0,844	38	0,191	0,769	66	0,182	1,103
11	0,202	0,754	39	0,184	0,822	67	0,162	0,933
12	0,150	0,563	40	0,148	0,583	68	0,194	0,866
13	0,205	0,942	41	0,171	0,876	69	0,197	0,919
14	0,208	0,789	42	0,178	0,886	70	0,130	0,728
15	0,231	0,731	43	0,195	0,843	71	0,213	1,155
16	0,241	0,808	44	0,176	0,838	72	0,179	0,929
17	0,191	0,736	45	0,170	0,862	73	0,200	0,890
18	0,176	0,752	46	0,176	0,903	74	0,147	0,891
19	0,228	0,820	47	0,199	0,822	75	0,19	0,974
20	0,222	0,728	48	0,188	0,563	76	0,192	0,650
21	0,202	0,778	49	0,187	0,800	77	0,163	0,791
22	0,213	0,832	50	0,184	0,856	78	0,110	0,431
23	0,200	0,986	51	0,199	0,856	79	0,174	0,895
24	0,191	0,798	52	0,179	0,937	80	0,172	0,903
25	0,235	0,816	53	0,225	0,840	81	0,161	0,707
26	0,175	0,805	54	0,186	0,854	82	0,192	0,967
27	0,193	0,744	55	0,202	0,907	83	0,153	0,908
28	0,222	0,926	56	0,256	0,998			

ANEXO B

Tabela 4 – Parâmetros do crescimento das linhagens avaliadas em meio composto de mosto misto com 25% de ART. Medida da densidade óptica ($D.O_{570nm}$) ao final de 24 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$ (h^{-1})). Cada valor corresponde à média de 3 repetições para cada linhagem. As comparações com os padrões foram feitas por lote

(continuação)

Lote 4/ Linhagem	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)	Lote 5/ Linhagem	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)	Lote 6/ Linhagem	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)
CAT-1	0,255	1,038	CAT-1	0,273	1,159	CAT-1	0,240	1,168
PE-2	0,213	1,052	PE-2	0,278	1,168	PE-2	0,247	1,189
84	0,196	0,911	109	-	0,643	137	0,210	1,117
85	0,214	1,035	110	0,266	1,072	138	-	0,810
86	0,190	0,904	111	-	0,076	139	0,274	1,064
87	0,244	0,923	112	0,253	1,088	140	0,266	1,158
88	0,166	0,836	113	0,272	1,073	141	-	0,720
89	0,147	0,737	114	0,246	1,106	142	-	0,696
90	0,221	1,016	115	0,254	1,113	143	-	0,590
91	0,179	0,879	116	-	0,895	144	-	0,726
92	-	0,494	117	0,209	0,963	145	-	0,828
93	0,125	0,680	118	-	0,745	146	-	0,917
94	0,217	1,074	119	0,27	1,162	147	0,218	1,038
95	0,219	0,782	120	-	0,926	148	0,258	0,997
96	0,220	1,116	121	0,252	0,983	149	0,216	1,105
97	0,160	0,752	122	-	0,918	150	0,254	1,150
98	0,195	1,053	123	-	0,766	151	-	0,826
99	0,191	0,977	124	-	0,908	152	0,247	0,946
100	0,107	0,672	125	0,200	0,931	153	0,264	0,994
101	0,195	1,035	126	-	0,733	154	0,295	1,130
102	0,148	0,883	127	-	0,918	155	0,248	1,026
103	0,184	1,014	128	0,298	1,105	156	-	0,812
104	0,179	0,802	129	-	0,123	157	-	0,780
105	0,254	1,102	130	0,220	1,087	158	0,260	1,088
106	-	0,425	131	0,266	1,076	159	-	0,857
107	0,208	0,765	132	0,275	1,007	160	0,217	1,090
108	-	0,459	133	0,203	0,979	161	0,265	1,021
			134	-	0,881	162	-	0,917
			135	-	0,785	163	-	0,907
			136	0,294	1,030	164	-	0,745

ANEXO B

Tabela 4 – Parâmetros do crescimento das linhagens avaliadas em meio composto de mosto misto com 25% de ART. Medida da densidade óptica ($D.O._{570nm}$) ao final de 24 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$ (h^{-1})). Cada valor corresponde à média de 3 repetições para cada linhagem. As comparações com os padrões foram feitas por lote

(continuação)

Lote 7/ Linhagem	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)	Lote 8/ Linhagem	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)	Lote 9/ Linhagem	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. (24 h)
CAT-1	0,211	1,144	CAT-1	0,263	1,084	CAT-1	0,282	1,086
PE-2	0,221	1,208	PE-2	0,297	1,154	PE-2	0,287	1,103
165	0,197	1,132	193	-	0,635	Panific.	0,228	0,961
166	0,192	0,984	194	-	0,779	221	-	0,559
167	0,188	1,010	195	-	0,697	222	0,188	1,093
168	0,167	1,005	196	0,23	0,935	223	-	0,502
169	0,205	1,006	197	0,196	0,921	224	0,22	1,078
170	-	0,137	198	-	0,814	225	0,204	0,936
171	-	0,904	199	-	0,084	226	-	0,866
172	0,209	1,076	200	0,239	0,947	227	0,229	1,073
173	-	0,887	201	-	0,616	228	0,235	1,037
174	0,158	1,023	202	0,17	0,961	229	-	0,809
175	-	0,868	203	0,195	0,970	230	0,141	0,974
176	0,2	1,096	204	-	0,684	231	-	0,604
177	-	0,856	205	0,25	0,957	232	0,225	1,030
178	0,221	1,135	206	-	0,858	233	0,222	1,022
179	0,278	1,365	207	0,264	1,049	234	0,215	1,088
180	0,145	0,958	208	-	0,687	235	0,229	1,071
181	0,262	0,993	209	-	0,862	236	0,221	0,925
182	0,203	0,984	210	0,278	1,070	237	-	0,920
183	0,165	0,978	211	0,222	0,975	238	0,221	1,040
184	-	0,761	212	-	0,756	239	0,201	0,969
185	0,25	1,048	213	-	0,711	240	0,205	0,955
186	0,223	0,996	214	-	0,831	241	0,239	1,003
187	0,174	1,009	215	-	0,617	242	-	0,838
188	0,22	0,955	216	-	0,250	243	0,244	1,084
189	-	0,873	217	-	0,822	244	0,197	0,922
190	0,213	1,124	218	-	0,847	245	-	0,760
191	0,206	1,166	219	-	0,844	246	-	0,815
192	0,225	0,955	220	0,268	1,046	247	-	0,310
						248	0,255	1,030

ANEXO B

Tabela 4 – Parâmetros do crescimento das linhagens avaliadas em meio composto de mosto misto com 25% de ART. Medida da densidade óptica (D.O.) ao final de 24 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})). Cada valor corresponde à média de 3 repetições para cada linhagem. As comparações com os padrões foram feitas por lote

Lote 10/ Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	(conclusão) D.O.
		(24 h)
CAT-1	0,258	1,048
PE-2	0,261	1,124
Panific.	0,220	0,847
249	0,204	0,994
250	0,252	0,965
251	0,218	0,945
252	0,268	0,846
253	-	0,834
254	-	0,638
255	0,232	0,957
256	0,340	1,059
257	0,286	1,041
258	-	0,782
259	0,232	0,973
260	-	0,774
261	0,227	0,848
262	0,160	0,884
263	0,222	0,968
264	0,234	0,967
265	-	0,314
266	-	0,597
267	-	0,613
268	-	0,724
269	0,187	0,849
270	-	0,480
271	0,202	0,961
272	0,240	1,056
273	0,261	1,084
274	-	0,610
275	0,232	0,914
276	0,192	0,877

ANEXO C

Tabela 5 – Estudo comparativo sobre o teor de biomassa úmida centrifugada (g) e glicerol (% m/v) ao final dos 7 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

LINHAGEM	BIOMASSA (g)							GLICEROL (%)						
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
PE-2	4,47	4,61	3,68	3,84	3,90	4,30	4,60	0,486	0,658	0,645	0,880	0,910	0,943	0,764
	4,51	4,66	3,70	3,90	3,94	4,31	4,60	0,504	0,624	0,624	0,871	0,898	0,909	0,875
	4,58	4,67	3,78	3,92	3,95	4,37	4,54	0,481	0,671	0,623	0,841	0,862	0,907	0,868
Média	4,52	4,65	3,72	3,89	3,93	4,33	4,58	0,490	0,651	0,631	0,864	0,890	0,920	0,836
Desvio Padrão	0,06	0,03	0,05	0,04	0,03	0,04	0,03	0,012	0,024	0,012	0,020	0,025	0,020	0,062
292	4,67	4,71	3,53	3,64	3,91	4,46	4,88	0,564	0,592	0,644	0,930	0,959	0,980	0,930
	4,70	4,73	3,50	3,69	3,94	4,53	4,93	0,526	0,596	0,635	0,821	0,969	0,973	0,916
	4,81	4,80	3,64	3,80	3,95	4,47	4,83	0,543	0,642	0,650	0,818	0,933	0,886	0,845
Média	4,73	4,75	3,56	3,71	3,93	4,49	4,88	0,544	0,610	0,643	0,856	0,954	0,946	0,897
Desvio Padrão	0,07	0,05	0,07	0,08	0,02	0,04	0,05	0,019	0,028	0,008	0,064	0,019	0,052	0,046
228	4,76	5,08	4,73	4,46	3,89	4,19	4,78	0,647	0,560	0,603	0,687	0,722	0,747	0,753
	4,70	5,02	4,68	4,42	3,89	4,18	4,74	0,636	0,542	0,597	0,690	0,730	0,744	0,776
	4,70	5,02	4,64	4,43	3,94	4,24	4,83	0,640	0,514	0,589	0,703	0,715	0,766	0,796
Média	4,72	5,04	4,68	4,44	3,91	4,20	4,78	0,641	0,539	0,596	0,693	0,722	0,752	0,775
Desvio Padrão	0,03	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03	0,05	0,006	0,023	0,007	0,009	0,008	0,012	0,022
150	4,59	4,71	4,14	3,77	3,68	4,13	4,32	0,683	0,678	0,728	0,778	0,958	1,036	0,947
	4,70	4,72	4,02	3,79	3,70	4,22	4,29	0,668	0,710	0,740	0,822	0,947	1,007	0,977
	4,67	4,70	4,06	3,84	3,74	4,20	4,34	0,688	0,701	0,767	0,810	0,944	0,999	0,999
Média	4,65	4,71	4,07	3,80	3,71	4,18	4,32	0,680	0,696	0,745	0,803	0,950	1,014	0,974
Desvio Padrão	0,06	0,01	0,06	0,04	0,03	0,05	0,03	0,010	0,017	0,020	0,023	0,007	0,019	0,026
207	4,80	5,30	5,11	4,87	4,24	4,48	4,82	0,670	0,630	0,601	0,605	0,693	0,705	0,764
	4,83	5,37	5,20	5,00	4,40	4,54	4,90	0,677	0,651	0,629	0,620	0,651	0,664	0,737
	4,85	5,37	5,18	4,99	4,39	4,62	4,98	0,674	0,661	0,606	0,603	0,643	0,676	0,750
Média	4,83	5,35	5,16	4,95	4,34	4,55	4,90	0,674	0,647	0,612	0,609	0,662	0,682	0,750
Desvio Padrão	0,03	0,04	0,05	0,07	0,09	0,07	0,08	0,004	0,016	0,015	0,009	0,027	0,021	0,014

ANEXO D

Tabela 6 – Estudo comparativo sobre a viabilidade celular (%), teores celulares de trealose, glicogênio e reservas totais (trealose + glicogênio) (% na matéria seca) para as diferentes linhagens ao final dos ciclos fermentativos

LINHAGEM	VIABILIDADE (%)							TREALOSE (%)			GLICOGÊNIO (%)	RESERVA TOTAL (%)
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	Inicial	Ciclo 4	Ciclo 7	Ciclo 7	Ciclo 7
PE-2	99,50	99,20	61,40	52,70	64,50	48,80	48,50	4,23	4,92	1,36	7,65	9,01
	100,00	98,40	57,60	58,90	65,70	44,10	45,20	4,23	4,82	1,50	9,06	10,56
	99,20	97,30	60,20	60,60	59,70	49,00	46,00	4,23	4,88	1,50	8,37	9,87
Média	99,57	98,30	59,73	57,40	63,30	47,30	46,57	4,23	4,87	1,45	8,36	9,81
Desvio Padrão	0,40	0,95	1,94	4,16	3,17	2,77	1,72	0,00	0,05	0,08	0,71	0,78
292	99,60	97,80	38,80	39,30	39,90	39,40	44,10	2,56	3,55	2,05	5,04	7,09
	100,00	97,10	33,70	41,40	43,80	40,40	43,00	2,56	3,30	1,74	-	-
	100,00	97,20	40,40	37,90	43,30	39,20	38,70	2,56	3,43	1,78	6,42	8,20
Média	99,87	97,37	37,63	39,53	42,33	39,67	41,93	2,56	3,43	1,86	5,73	7,65
Desvio Padrão	0,23	0,38	3,50	1,76	2,12	0,64	2,85	0,00	0,13	0,17	0,98	0,78
228	99,50	97,00	85,60	72,80	56,30	46,30	42,40	5,85	6,42	3,21	9,35	12,56
	98,10	97,60	85,50	70,10	62,50	45,20	47,70	5,85	6,50	3,36	10,90	14,26
	98,90	97,50	82,30	69,70	62,70	48,00	42,70	5,85	6,09	3,58	8,28	11,86
Média	98,83	97,37	84,47	70,87	60,50	46,50	44,27	5,85	6,34	3,38	9,51	12,89
Desvio Padrão	0,70	0,32	1,88	1,69	3,64	1,41	2,98	0,00	0,22	0,19	1,32	1,23
150	98,30	98,30	75,60	58,60	58,20	50,30	47,40	4,63	5,78	1,58	5,92	7,50
	99,60	98,30	68,10	56,30	60,20	50,80	55,30	4,63	5,91	1,24	6,19	7,43
	98,80	96,80	75,40	58,60	54,90	50,30	46,70	4,63	5,82	1,64	6,62	8,26
Média	98,90	97,80	73,03	57,83	57,77	50,47	49,80	4,63	5,84	1,49	6,24	7,73
Desvio Padrão	0,66	0,87	4,27	1,33	2,68	0,29	4,78	0,00	0,07	0,22	0,35	0,46
207	99,10	97,90	95,10	82,50	71,40	57,30	51,20	5,32	6,31	3,08	10,59	13,67
	99,30	98,80	89,75	91,70	74,30	55,30	46,60	5,32	6,67	3,47	-	-
	99,50	99,00	97,20	86,50	71,90	54,20	48,30	5,32	6,68	3,19	10,05	13,24
Média	99,30	98,57	94,02	86,90	72,53	55,60	48,70	5,32	6,55	3,25	10,32	13,46
Desvio Padrão	0,20	0,59	3,84	4,61	1,55	1,57	2,33	0,00	0,21	0,20	0,38	0,30

ANEXO E

Tabela 7 – Estudo comparativo sobre o teor de etanol (% v/v) e açúcares residuais (% g/100mL vinho) nos vinhos ao final dos 7 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

LINHAGEM	ETANOL (%)							ART residual (%)						
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	ART 1	ART 2	ART 3	ART 4	ART 5	ART 6	ART 7
PE-2	11,20	13,24	14,42	13,88	14,20	13,24	13,22	0,045	0,158	0,092	0,116	0,086	0,105	0,143
	11,25	13,18	14,42	13,86	14,04	13,38	13,06	0,061	0,081	0,128	0,089	0,077	0,083	0,075
	11,25	13,20	14,48	13,84	13,98	13,46	13,06	0,069	0,117	0,124	0,135	0,082	0,102	0,104
Média	11,23	13,21	14,44	13,86	14,07	13,36	13,11	0,058	0,119	0,115	0,113	0,081	0,097	0,107
Desvio Padrão	0,03	0,03	0,03	0,02	0,11	0,11	0,09	0,012	0,039	0,020	0,023	0,005	0,012	0,034
292	11,25	13,22	14,16	12,22	13,64	13,22	13,20	0,051	0,058	0,095	2,554	0,159	0,163	0,090
	11,20	13,24	14,00	12,00	13,48	13,18	13,14	0,031	0,041	0,116	2,521	0,246	0,174	0,113
	10,95	13,28	14,12	12,52	13,52	13,18	13,14	0,112	0,047	0,065	1,715	0,228	0,271	0,084
Média	11,13	13,25	14,09	12,25	13,55	13,19	13,16	0,064	0,049	0,092	2,263	0,211	0,203	0,096
Desvio Padrão	0,16	0,03	0,08	0,26	0,08	0,02	0,03	0,043	0,009	0,026	0,475	0,046	0,060	0,015
228	11,35	13,22	14,40	14,06	13,70	13,10	13,28	0,113	0,065	0,090	0,181	0,233	0,526	0,094
	11,00	13,12	14,22	14,04	13,78	13,10	13,16	0,080	0,073	0,036	0,195	0,200	0,520	0,146
	11,45	13,22	14,31	13,98	13,82	12,98	13,16	0,069	0,061	0,086	0,145	0,193	0,578	0,090
Média	11,27	13,19	14,31	14,03	13,77	13,06	13,20	0,087	0,066	0,070	0,174	0,209	0,541	0,110
Desvio Padrão	0,24	0,06	0,09	0,04	0,06	0,07	0,07	0,023	0,006	0,030	0,026	0,021	0,032	0,031
150	11,30	12,90	14,18	14,02	13,96	13,36	13,06	0,037	0,069	0,112	0,149	0,074	0,062	0,094
	11,10	13,22	14,32	13,86	13,80	13,36	13,04	0,046	0,069	0,087	0,153	0,065	0,058	0,093
	11,15	13,10	14,20	13,94	13,84	13,20	13,04	0,056	0,078	0,102	0,175	0,073	0,043	0,108
Média	11,18	13,07	14,23	13,94	13,87	13,31	13,05	0,046	0,072	0,100	0,159	0,070	0,055	0,098
Desvio Padrão	0,10	0,16	0,08	0,08	0,08	0,09	0,01	0,010	0,005	0,012	0,014	0,005	0,010	0,008
207	11,35	13,00	14,34	14,18	13,98	13,58	13,40	0,134	0,063	0,099	0,177	0,149	0,062	0,051
	11,25	12,98	14,26	14,20	13,92	13,56	13,28	0,114	0,057	0,088	0,141	0,089	0,098	0,060
	11,30	12,90	14,32	14,14	13,92	13,68	13,32	0,117	0,053	0,106	0,148	0,072	0,089	0,080
Média	11,30	12,96	14,31	14,17	13,94	13,61	13,33	0,122	0,058	0,098	0,155	0,103	0,083	0,064
Desvio Padrão	0,05	0,05	0,04	0,03	0,03	0,06	0,06	0,011	0,005	0,009	0,019	0,040	0,019	0,015

ANEXO F

Tabela 8 – Estudo comparativo sobre o fator de conversão de substrato em etanol (expresso em g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado) e rendimento fermentativo (%), fração do açúcar fornecido que se converteu em etanol) ao final dos 7 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

LINHAGEM	Yp/s (g/g)							Rendimento (%)						
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
PE-2	0,448	0,445	0,452	0,430	0,442	0,422	0,432	87,49	86,54	88,07	83,67	86,14	82,14	84,02
	0,451	0,443	0,455	0,429	0,436	0,427	0,424	87,97	86,33	88,54	83,70	84,95	83,31	82,67
	0,451	0,444	0,456	0,430	0,434	0,431	0,425	87,99	86,46	88,67	83,66	84,70	83,98	82,71
Média	0,450	0,444	0,454	0,430	0,437	0,427	0,427	87,82	86,44	88,43	83,68	85,26	83,14	83,13
Desvio Padrão	0,002	0,001	0,002	0,000	0,004	0,005	0,005	0,28	0,11	0,32	0,02	0,77	0,93	0,77
292	0,449	0,444	0,445	0,420	0,433	0,424	0,429	87,57	86,60	86,68	73,15	84,18	82,43	83,61
	0,446	0,445	0,439	0,411	0,430	0,424	0,427	87,11	87,01	85,51	71,65	83,29	82,41	83,20
	0,437	0,448	0,442	0,415	0,429	0,426	0,428	85,05	87,43	86,31	75,23	83,17	82,45	83,39
Média	0,444	0,446	0,442	0,415	0,431	0,425	0,428	86,58	87,01	86,17	73,34	83,55	82,43	83,40
Desvio Padrão	0,006	0,002	0,003	0,005	0,002	0,001	0,001	1,34	0,42	0,60	1,80	0,55	0,02	0,20
228	0,455	0,444	0,449	0,439	0,432	0,428	0,433	88,48	86,54	87,55	85,28	83,71	81,76	84,42
	0,440	0,441	0,442	0,439	0,434	0,428	0,429	85,72	86,00	86,35	85,25	84,20	81,73	83,43
	0,459	0,443	0,447	0,437	0,434	0,425	0,429	89,49	86,50	87,09	84,92	84,23	80,95	83,58
Média	0,451	0,443	0,446	0,438	0,433	0,427	0,430	87,90	86,35	87,00	85,15	84,05	81,48	83,81
Desvio Padrão	0,010	0,001	0,004	0,002	0,001	0,002	0,002	1,95	0,30	0,61	0,20	0,29	0,46	0,53
150	0,450	0,432	0,442	0,438	0,436	0,424	0,424	87,92	84,27	86,12	85,21	85,02	82,84	82,67
	0,443	0,445	0,447	0,432	0,429	0,426	0,424	86,47	86,80	87,07	83,90	83,70	83,17	82,62
	0,445	0,441	0,445	0,436	0,431	0,420	0,426	86,89	85,90	86,66	84,72	83,99	81,96	82,88
Média	0,446	0,439	0,445	0,435	0,432	0,423	0,425	87,09	85,66	86,62	84,61	84,24	82,66	82,72
Desvio Padrão	0,004	0,007	0,002	0,003	0,004	0,003	0,001	0,75	1,29	0,47	0,67	0,69	0,62	0,14
207	0,456	0,434	0,448	0,442	0,451	0,434	0,435	88,62	84,74	87,25	85,74	87,73	84,68	84,86
	0,451	0,434	0,444	0,443	0,436	0,434	0,430	87,81	84,72	86,61	86,22	84,93	84,58	84,00
	0,454	0,430	0,448	0,442	0,442	0,445	0,431	88,30	83,94	87,32	85,84	86,21	86,82	84,06
Média	0,454	0,433	0,447	0,442	0,443	0,438	0,432	88,24	84,47	87,06	85,94	86,29	85,36	84,31
Desvio Padrão	0,002	0,002	0,002	0,001	0,008	0,007	0,002	0,41	0,46	0,39	0,25	1,40	1,27	0,48

ANEXO G

Tabela 9 – Velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g CO₂ liberado) para as diferentes linhagens no transcorrer dos 7 ciclos fermentativos. Cada dado representa a média de 3 repetições

LINHAGEM	Desprendimento de CO ₂ (g)					
	CICLO	2h	4h	6h	8h	21-23h
PE-2	1	0,90	1,87	2,62	-	3,12
	2	1,15	2,08	2,93	3,51	3,78
	3	1,08	1,97	2,81	3,47	4,16
	4	0,48	1,08	1,65	2,24	3,84
	5	0,53	1,16	1,80	2,41	3,69
	6	0,45	1,02	1,66	2,28	3,89
	7	0,53	1,05	1,86	2,42	3,80
292	1	0,94	1,92	2,75	-	3,15
	2	1,14	2,07	2,95	3,55	3,82
	3	0,92	1,74	2,52	3,19	4,11
	4	0,20	0,53	0,86	1,29	3,30
	5	0,35	0,80	1,31	1,84	3,36
	6	0,31	0,76	1,30	1,87	3,75
	7	0,45	0,94	1,77	2,32	3,78
228	1	0,75	1,60	2,27	-	3,15
	2	0,96	1,77	2,53	3,13	3,76
	3	0,89	1,68	2,43	3,02	4,26
	4	0,47	1,11	1,71	2,33	3,93
	5	0,36	0,88	1,43	2,02	3,41
	6	0,25	0,64	1,09	1,62	3,67
	7	0,40	0,86	1,64	2,18	3,79
150	1	0,97	1,98	2,76	-	3,16
	2	1,15	2,09	2,99	3,56	3,80
	3	1,13	2,03	2,90	3,52	4,31
	4	0,59	1,24	1,81	2,39	3,92
	5	0,45	0,99	1,52	2,09	3,53
	6	0,49	1,10	1,73	2,36	3,91
	7	0,52	1,05	1,83	2,36	3,80
207	1	0,83	1,68	2,32	-	3,17
	2	1,02	1,80	2,57	3,14	3,76
	3	0,97	1,75	2,47	3,03	4,31
	4	0,54	1,19	1,78	2,39	4,01
	5	0,41	0,95	1,50	2,09	3,45
	6	0,41	0,97	1,56	2,16	3,91
	7	0,44	0,96	1,78	2,33	3,84

ANEXO H

Tabela 10 – Estudo comparativo sobre o teor de biomassa úmida centrifugada (g) e glicerol no vinho (% , m/v) ao final dos 8 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens (continua)

LINHAGEM	BIOMASSA (g)								GLICEROL (%)							
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
PE-2	4,78	5,00	5,08	5,05	4,83	4,61	4,47	4,30	0,633	0,732	0,702	0,668	0,641	0,553	0,637	0,731
	4,82	5,06	5,15	5,11	4,78	4,56	4,44	4,31	0,71	0,641	0,662	0,683	0,619	0,574	0,718	0,64
	4,87	5,09	5,19	5,15	4,83	4,59	4,49	4,33	0,704	0,762	0,728	0,61	0,614	0,601	0,766	0,789
Média	4,82	5,05	5,14	5,10	4,81	4,59	4,47	4,31	0,682	0,712	0,697	0,654	0,625	0,576	0,707	0,720
Desvio Padrão	0,05	0,05	0,06	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,043	0,063	0,033	0,039	0,014	0,024	0,065	0,075
291	4,45	4,69	4,63	4,52	4,37	4,21	4,12	3,94	0,826	0,795	0,862	0,768	0,838	0,727	0,982	1,035
	4,52	4,70	4,63	4,52	4,36	4,25	4,15	3,99	0,72	0,781	0,821	0,861	0,814	0,724	0,871	0,925
	4,49	4,81	4,83	4,72	4,64	4,49	4,41	4,23	0,768	0,78	0,83	0,901	0,845	0,72	0,953	1,038
Média	4,49	4,73	4,70	4,59	4,46	4,32	4,23	4,05	0,771	0,785	0,838	0,843	0,832	0,724	0,935	0,999
Desvio Padrão	0,04	0,07	0,12	0,12	0,16	0,15	0,16	0,16	0,053	0,008	0,022	0,068	0,016	0,004	0,058	0,064
210	4,92	5,27	5,40	5,38	5,34	5,24	5,14	4,84	0,691	0,75	0,759	0,619	0,733	0,661	0,669	0,707
	4,82	5,20	5,30	5,32	5,23	5,12	5,03	4,70	0,648	0,77	0,703	0,62	0,711	0,607	0,675	0,722
	4,83	5,14	5,26	5,22	5,10	4,99	4,86	4,51	0,686	0,822	0,703	0,69	0,752	0,661	0,616	0,728
Média	4,86	5,20	5,32	5,31	5,22	5,12	5,01	4,68	0,675	0,781	0,722	0,643	0,732	0,643	0,653	0,719
Desvio Padrão	0,06	0,07	0,07	0,08	0,12	0,13	0,14	0,17	0,024	0,037	0,032	0,041	0,021	0,031	0,032	0,011
361	4,66	4,91	4,95	4,94	4,79	4,60	4,55	4,33	0,566	0,729	0,662	0,659	0,665	0,61	0,742	0,863
	4,60	4,84	4,82	4,69	4,57	4,41	4,42	4,20	0,57	0,651	0,615	0,619	0,731	0,614	0,765	0,913
	4,62	4,90	4,95	4,90	4,77	4,58	4,55	4,33	0,502	0,732	0,71	0,644	0,754	0,611	0,738	0,879
Média	4,63	4,88	4,91	4,84	4,71	4,53	4,51	4,29	0,546	0,704	0,662	0,641	0,717	0,612	0,748	0,885
Desvio Padrão	0,03	0,04	0,08	0,13	0,12	0,10	0,08	0,08	0,038	0,046	0,048	0,020	0,046	0,002	0,015	0,026
438	4,69	4,81	4,55	4,23	4,01	3,97	4,00	3,98	0,61	0,681	0,655	0,635	0,793	0,785	0,786	0,86
	4,61	4,71	4,40	4,09	3,96	3,96	4,01	3,97	0,623	0,668	0,723	0,682	0,774	0,786	0,81	0,993
	4,61	4,74	4,49	4,17	3,94	3,88	3,93	3,86	0,526	0,611	0,664	0,69	0,775	0,783	0,844	0,963
Média	4,64	4,75	4,48	4,16	3,97	3,94	3,98	3,94	0,586	0,653	0,681	0,669	0,781	0,785	0,813	0,939
Desvio Padrão	0,05	0,05	0,08	0,07	0,04	0,05	0,04	0,07	0,053	0,037	0,037	0,030	0,011	0,002	0,029	0,070

ANEXO H

Tabela 10 – Estudo comparativo sobre o teor de biomassa úmida centrifugada (g) e glicerol no vinho (% , m/v) ao final dos 8 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens (conclusão)

LINHAGEM	BIOMASSA (g)								GLICEROL (%)							
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
419	4,86	5,20	5,34	5,31	5,23	5,03	4,92	4,66	0,616	0,722	0,625	0,59	0,649	0,724	0,672	0,797
	4,71	5,08	5,15	5,11	5,01	4,78	4,68	4,37	0,58	0,621	0,54	0,608	0,636	0,605	0,664	0,793
	4,88	5,28	5,42	5,41	5,28	5,06	4,97	4,71	0,609	0,695	0,631	0,699	0,604	0,676	0,698	0,794
Média	4,82	5,19	5,30	5,28	5,17	4,96	4,86	4,58	0,602	0,679	0,599	0,632	0,630	0,668	0,678	0,795
Desvio Padrão	0,09	0,10	0,14	0,15	0,14	0,15	0,16	0,18	0,019	0,052	0,051	0,058	0,023	0,060	0,018	0,002
390	4,57	4,80	4,69	4,64	4,47	4,14	4,09	3,86	0,547	0,681	0,649	0,579	0,629	0,736	0,639	0,778
	4,58	4,85	4,76	4,74	4,55	4,25	4,23	4,02	0,566	0,672	0,689	0,539	0,617	0,668	0,649	0,693
	4,58	4,84	4,75	4,72	4,51	4,19	4,17	3,92	0,486	0,608	0,665	0,59	0,584	0,652	0,722	0,754
Média	4,58	4,83	4,73	4,70	4,51	4,19	4,16	3,93	0,533	0,654	0,668	0,569	0,610	0,685	0,670	0,742
Desvio Padrão	0,01	0,03	0,04	0,05	0,04	0,06	0,07	0,08	0,042	0,040	0,020	0,027	0,023	0,045	0,045	0,044

ANEXO I

Tabela 11 – Estudo comparativo sobre a viabilidade celular (%), teores celulares de trealose, glicogênio e reservas totais (trealose + glicogênio) (% na matéria seca) para as diferentes linhagens ao final dos ciclos fermentativos

LINHAGEM	VIABILIDADE (%)								TREALOSE (%)		GLICOGÊNIO (%)	RESERVA TOTAL (%)
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	Inicial	Ciclo 8	Ciclo 8	Ciclo 8
PE-2	99,70	99,40	99,10	97,90	91,20	86,70	84,10	75,70	2,81	4,60	3,45	8,05
	99,30	99,00	97,70	95,40	89,90	85,40	79,80	73,30	2,81	3,91	3,59	7,50
	99,40	99,70	99,10	97,70	89,90	84,90	82,30	72,90	2,81	4,59	3,52	8,11
Média	99,47	99,37	98,63	97,00	90,33	85,67	82,07	73,97	2,81	4,37	3,52	7,89
Desvio Padrão	0,21	0,35	0,81	1,39	0,75	0,93	2,16	1,51	0,00	0,40	0,07	0,34
291	99,70	98,60	96,10	98,50	86,90	82,60	79,90	61,80	1,97	2,60	4,17	6,77
	99,50	98,30	95,30	90,70	88,50	83,90	73,60	65,80	1,97	2,53	3,42	5,95
	98,60	99,20	95,10	91,50	90,40	84,90	77,50	67,80	1,97	2,12	3,77	5,89
Média	99,27	98,70	95,50	93,57	88,60	83,80	77,00	65,13	1,97	2,42	3,79	6,20
Desvio Padrão	0,59	0,46	0,53	4,29	1,75	1,15	3,18	3,06	0,00	0,26	0,38	0,49
210	97,00	96,30	97,80	96,60	94,40	93,80	90,10	82,90	3,87	2,71	9,69	12,40
	98,50	99,20	97,70	96,70	94,60	90,90	88,00	82,70	3,87	2,19	10,06	12,25
	97,70	97,80	95,50	97,10	94,00	89,40	85,90	78,00	3,87	2,71	9,76	12,47
Média	97,73	97,77	97,00	96,80	94,33	91,37	88,00	81,20	3,87	2,54	9,84	12,37
Desvio Padrão	0,75	1,45	1,30	0,26	0,31	2,24	2,10	2,77	0,00	0,30	0,20	0,11
361	97,70	97,50	97,70	91,60	88,10	85,20	80,40	65,90	1,29	7,41	3,18	10,59
	99,30	97,40	93,10	87,70	86,80	85,00	78,70	70,00	1,29	6,75	2,78	9,53
	98,70	98,10	96,10	85,20	90,70	85,00	82,80	67,50	1,29	6,64	2,98	9,62
Média	98,57	97,67	95,63	88,17	88,53	85,07	80,63	67,80	1,29	6,93	2,98	9,91
Desvio Padrão	0,81	0,38	2,34	3,23	1,99	0,12	2,06	2,07	0,00	0,42	0,20	0,59
438	99,30	93,60	90,70	84,70	68,20	64,80	61,30	53,60	1,87	6,06	3,24	9,30
	99,10	96,70	87,30	84,60	65,30	67,20	59,30	54,30	1,87	6,11	3,08	9,19
	98,80	96,00	93,00	84,60	71,70	71,60	68,40	52,10	1,87	5,79	2,47	8,26
Média	99,07	95,43	90,33	84,63	68,40	67,87	63,00	53,33	1,87	5,99	2,93	8,92
Desvio Padrão	0,25	1,63	2,87	0,06	3,20	3,45	4,78	1,12	0,00	0,17	0,41	0,57

ANEXO I

Tabela 11 – Estudo comparativo sobre a viabilidade celular (%), teores celulares de trealose, glicogênio e reservas totais (trealose + glicogênio) (% na matéria seca) para as diferentes linhagens ao final dos ciclos fermentativos

LINHAGEM	VIABILIDADE (%)								TREALOSE (%)		GLICOGÊNIO (%)	(conclusão) RESERVA TOTAL (%)
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	Inicial	Ciclo 8	Ciclo 8	Ciclo 8
419	99,40	98,70	98,00	97,60	91,80	92,60	87,40	79,40	5,08	2,41	10,60	13,01
	99,70	98,40	97,70	98,50	95,20	86,40	80,90	75,30	5,08	2,78	10,36	13,14
	99,70	98,20	98,80	98,40	94,20	91,90	85,30	75,60	5,08	1,90	9,62	11,52
Média	99,60	98,43	98,17	98,17	93,73	90,30	84,53	76,77	5,08	2,36	10,19	12,56
Desvio Padrão	0,17	0,25	0,57	0,49	1,75	3,40	3,32	2,29	0,00	0,44	0,51	0,90
390	98,30	94,10	94,20	97,30	88,60	80,40	75,10	69,90	0,76	7,29	3,99	11,28
	99,10	91,70	96,10	96,90	91,40	86,40	74,20	65,70	0,76	7,36	3,73	11,09
	99,50	94,30	95,60	98,00	90,60	81,70	73,80	60,40	0,76	6,49	3,88	10,37
Média	98,97	93,37	95,30	97,40	90,20	82,83	74,37	65,33	0,76	7,05	3,87	10,91
Desvio Padrão	0,61	1,45	0,98	0,56	1,44	3,16	0,67	4,76	0,00	0,48	0,13	0,48

ANEXO J

Tabela 12 – Estudo comparativo sobre o teor de etanol (% , v/v) e açúcares residuais (% , g/100mL vinho) nos vinhos ao final dos 8 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

(continua)

LINHAGEM	ETANOL (%)								ART residual (%)							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	ART 1	ART 2	ART 3	ART 4	ART 5	ART 6	ART 7	ART 8
PE-2	11,10	13,35	14,40	14,90	14,70	15,15	15,30	15,25	0,055	0,078	0,089	0,103	0,106	0,101	0,143	0,186
	11,06	13,36	14,35	14,85	14,80	14,95	15,20	15,20	0,060	0,092	0,099	0,080	0,151	0,100	0,250	0,337
	11,04	13,26	14,30	14,85	14,70	15,10	15,20	15,25	0,062	0,079	0,118	0,074	0,111	0,091	0,203	0,321
Média	11,07	13,32	14,35	14,87	14,73	15,07	15,23	15,23	0,059	0,083	0,102	0,086	0,123	0,097	0,199	0,281
Desvio Padrão	0,03	0,06	0,05	0,03	0,06	0,10	0,06	0,03	0,004	0,008	0,015	0,016	0,025	0,006	0,053	0,083
291	11,18	13,28	14,40	14,80	14,60	14,95	15,10	14,90	0,064	0,074	0,107	0,133	0,146	0,179	0,216	0,527
	11,14	13,28	14,30	14,75	14,55	14,95	15,05	14,95	0,079	0,116	0,131	0,125	0,134	0,111	0,153	0,421
	11,10	13,14	14,25	14,70	14,45	14,90	15,10	14,95	0,080	0,058	0,111	0,080	0,108	0,120	0,184	0,395
Média	11,14	13,23	14,32	14,75	14,53	14,93	15,08	14,93	0,074	0,083	0,116	0,112	0,129	0,137	0,184	0,448
Desvio Padrão	0,04	0,08	0,08	0,05	0,08	0,03	0,03	0,03	0,009	0,030	0,013	0,029	0,019	0,037	0,031	0,070
210	11,02	13,24	14,25	14,75	14,60	15,10	15,20	15,35	0,142	0,112	0,049	0,100	0,142	0,182	0,194	0,540
	11,04	13,28	14,35	14,85	14,75	15,10	15,15	15,15	0,154	0,068	0,107	0,090	0,071	0,226	0,526	0,722
	11,04	13,34	14,35	14,85	14,75	15,10	15,10	14,90	0,045	0,064	0,078	0,101	0,093	0,206	0,531	1,063
Média	11,03	13,29	14,32	14,82	14,70	15,10	15,15	15,13	0,114	0,081	0,078	0,097	0,102	0,205	0,417	0,775
Desvio Padrão	0,01	0,05	0,06	0,06	0,09	0,00	0,05	0,23	0,060	0,027	0,029	0,006	0,036	0,022	0,193	0,266
361	11,20	13,46	14,45	14,95	14,70	15,10	15,40	15,40	0,068	0,076	0,084	0,089	0,086	0,072	0,133	0,099
	11,16	13,40	14,40	14,85	14,70	15,15	15,35	15,40	0,114	0,118	0,109	0,103	0,084	0,064	0,092	0,086
	11,30	13,36	14,45	14,85	14,70	15,10	15,35	15,40	0,132	0,060	0,102	0,116	0,078	0,111	0,111	0,091
Média	11,22	13,41	14,43	14,88	14,70	15,12	15,37	15,40	0,105	0,084	0,098	0,103	0,083	0,082	0,112	0,092
Desvio Padrão	0,07	0,05	0,03	0,06	0,00	0,03	0,03	0,00	0,033	0,030	0,013	0,014	0,004	0,025	0,021	0,007
438	11,16	13,40	14,60	14,95	14,75	14,65	14,85	14,95	0,078	0,068	0,083	0,131	0,140	0,812	0,715	0,830
	11,06	13,40	14,50	14,85	14,55	14,75	14,95	15,05	0,132	0,095	0,102	0,122	0,083	0,352	0,500	0,628
	11,10	13,40	14,55	14,85	14,70	14,80	14,85	14,85	0,076	0,126	0,080	0,101	0,083	0,443	0,602	0,784
Média	11,11	13,40	14,55	14,88	14,67	14,73	14,88	14,95	0,095	0,096	0,088	0,118	0,102	0,536	0,606	0,747
Desvio Padrão	0,05	0,00	0,05	0,06	0,10	0,08	0,06	0,10	0,032	0,029	0,012	0,015	0,033	0,243	0,108	0,106

ANEXO J

Tabela 12 – Estudo comparativo sobre o teor de etanol (% v/v) e açúcares residuais (% g/100mL vinho) nos vinhos ao final dos 8 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

LINHAGEM	ETANOL (%)								ART residual (%)							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	ART 1	ART 2	ART 3	ART 4	ART 5	ART 6	ART 7	ART 8
419	11,06	13,30	14,40	14,85	14,80	14,95	15,15	15,10	0,130	0,124	0,055	0,107	0,099	0,457	0,569	0,895
	11,08	13,26	14,40	14,85	14,75	15,00	15,05	14,85	0,086	0,175	0,148	0,145	0,155	0,469	0,962	1,224
	11,02	13,20	14,30	14,80	14,80	15,10	15,10	15,05	0,122	0,124	0,088	0,063	0,074	0,390	0,524	0,877
Média	11,05	13,25	14,37	14,83	14,78	15,02	15,10	15,00	0,113	0,141	0,097	0,105	0,109	0,439	0,685	0,999
Desvio Padrão	0,03	0,05	0,06	0,03	0,03	0,08	0,05	0,13	0,023	0,029	0,047	0,041	0,041	0,042	0,241	0,196
390	11,28	13,46	14,45	14,80	14,85	15,20	15,20	15,00	0,120	0,070	0,139	0,121	0,102	0,140	0,543	0,681
	11,18	13,36	14,35	14,80	14,75	15,10	15,20	15,15	0,088	0,051	0,114	0,080	0,108	0,122	0,198	0,506
	11,24	13,38	14,40	14,85	14,80	15,15	15,20	15,00	0,113	0,056	0,116	0,177	0,116	0,126	0,532	0,816
Média	11,23	13,40	14,40	14,82	14,80	15,15	15,20	15,05	0,107	0,059	0,123	0,126	0,109	0,129	0,424	0,667
Desvio Padrão	0,05	0,05	0,05	0,03	0,05	0,05	0,00	0,09	0,017	0,010	0,014	0,049	0,007	0,009	0,196	0,155

ANEXO K

Tabela 13 – Estudo comparativo sobre o fator de conversão de substrato em etanol (expresso em g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado) e rendimento fermentativo (%; fração do açúcar fornecido que se converteu em etanol) ao final dos 8 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

(continua)

LINHAGEM	Yp/s (g/g)								RENDIMENTO (%)							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
PE-2	0,428	0,465	0,456	0,460	0,458	0,458	0,461	0,452	83,58	90,72	88,96	89,60	89,26	89,34	89,74	87,83
	0,423	0,458	0,455	0,458	0,464	0,453	0,461	0,455	82,54	89,32	88,69	89,35	90,13	88,22	89,23	87,74
	0,422	0,453	0,454	0,458	0,458	0,458	0,459	0,455	82,40	88,28	88,40	89,38	89,14	89,33	89,06	87,93
Média	0,425	0,459	0,455	0,459	0,460	0,456	0,460	0,454	82,84	89,44	88,68	89,44	89,51	88,96	89,34	87,83
Desvio Padrão	0,003	0,006	0,001	0,001	0,003	0,003	0,001	0,002	0,65	1,22	0,28	0,14	0,54	0,64	0,35	0,10
291	0,428	0,452	0,457	0,458	0,452	0,455	0,457	0,447	83,58	88,07	89,11	89,05	87,98	88,30	88,55	85,55
	0,428	0,455	0,455	0,456	0,454	0,453	0,453	0,447	83,49	88,62	88,44	88,72	88,35	88,24	88,10	85,94
	0,426	0,447	0,454	0,454	0,450	0,451	0,456	0,447	82,94	87,19	88,34	88,49	87,64	87,81	88,49	86,14
Média	0,427	0,451	0,455	0,456	0,452	0,453	0,455	0,447	83,34	87,96	88,63	88,75	87,99	88,12	88,38	85,87
Desvio Padrão	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,34	0,72	0,42	0,29	0,35	0,26	0,24	0,30
210	0,423	0,453	0,451	0,455	0,454	0,459	0,458	0,464	82,14	88,15	88,06	88,66	88,28	89,13	88,96	88,82
	0,424	0,453	0,456	0,459	0,458	0,458	0,464	0,460	82,27	88,28	88,80	89,39	89,31	88,86	88,84	87,40
	0,422	0,456	0,455	0,460	0,460	0,460	0,462	0,461	82,41	88,96	88,68	89,59	89,66	89,18	88,32	86,29
Média	0,423	0,454	0,454	0,458	0,457	0,459	0,461	0,462	82,27	88,46	88,51	89,21	89,08	89,05	88,71	87,50
Desvio Padrão	0,001	0,002	0,003	0,002	0,003	0,001	0,003	0,002	0,14	0,43	0,40	0,49	0,72	0,18	0,34	1,26
361	0,430	0,459	0,458	0,460	0,456	0,458	0,464	0,454	83,80	89,52	89,22	89,70	88,90	89,27	90,37	88,55
	0,429	0,457	0,456	0,459	0,457	0,457	0,461	0,456	83,47	88,94	88,87	89,45	89,11	89,25	89,91	89,00
	0,435	0,455	0,460	0,459	0,458	0,457	0,462	0,454	84,48	88,73	89,55	89,36	89,23	89,07	89,91	88,46
Média	0,431	0,457	0,458	0,459	0,457	0,457	0,462	0,455	83,92	89,06	89,21	89,50	89,08	89,20	90,06	88,67
Desvio Padrão	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	0,52	0,41	0,34	0,17	0,17	0,11	0,27	0,29
438	0,428	0,457	0,465	0,461	0,461	0,456	0,460	0,457	83,51	89,22	90,75	89,73	89,61	86,25	87,26	86,34
	0,425	0,459	0,461	0,459	0,452	0,452	0,458	0,455	82,67	89,39	89,89	89,34	88,08	87,17	87,79	86,74
	0,426	0,459	0,462	0,459	0,459	0,454	0,457	0,451	83,10	89,25	90,05	89,38	89,42	87,28	87,18	85,53
Média	0,427	0,458	0,463	0,460	0,457	0,454	0,458	0,454	83,09	89,29	90,23	89,48	89,03	86,90	87,41	86,20
Desvio Padrão	0,002	0,001	0,002	0,001	0,005	0,002	0,001	0,003	0,42	0,09	0,46	0,22	0,83	0,56	0,33	0,62

ANEXO K

Tabela 13 – Estudo comparativo sobre o fator de conversão de substrato em etanol (expresso em g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado) e rendimento fermentativo (%; fração do açúcar fornecido que se converteu em etanol) ao final dos 8 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

(conclusão)

LINHAGEM	Yp/s (g/g)								RENDIMENTO (%)							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
419	0,424	0,455	0,457	0,458	0,461	0,459	0,464	0,462	82,51	88,61	89,22	89,30	89,78	88,16	88,73	87,03
	0,424	0,454	0,458	0,460	0,460	0,461	0,473	0,462	82,68	88,07	89,08	89,46	89,49	88,37	88,78	85,75
	0,422	0,452	0,454	0,456	0,460	0,462	0,462	0,459	82,17	87,85	88,49	88,93	89,68	89,01	88,46	86,65
Média	0,424	0,454	0,456	0,458	0,460	0,461	0,466	0,461	82,45	88,18	88,93	89,23	89,65	88,51	88,66	86,48
Desvio Padrão	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,006	0,001	0,26	0,39	0,39	0,27	0,15	0,44	0,17	0,66
390	0,435	0,459	0,459	0,456	0,462	0,462	0,465	0,455	84,53	89,57	89,37	88,75	90,11	89,89	88,98	86,47
	0,429	0,456	0,456	0,456	0,458	0,459	0,459	0,453	83,62	88,98	88,76	88,96	89,26	89,42	89,04	86,81
	0,433	0,457	0,458	0,461	0,462	0,459	0,466	0,456	84,21	89,12	89,16	89,54	89,90	89,39	89,15	86,34
Média	0,432	0,457	0,458	0,458	0,461	0,460	0,463	0,455	84,12	89,22	89,10	89,08	89,75	89,57	89,06	86,54
Desvio Padrão	0,003	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,004	0,002	0,46	0,31	0,31	0,41	0,44	0,28	0,09	0,24

ANEXO L

Tabela 14 – Velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g CO₂ liberado) para as diferentes linhagens no transcorrer dos 8 ciclos fermentativos. Cada dado representa a média de 3 repetições (continua)

LINHAGEM	Desprendimento de CO ₂ (g)					
	CICLO	2h	4h	6h	8h	21-23h
PE-2	1	0,96	1,87	2,81	3,06	3,17
	2	1,18	2,12	3,54	3,59	3,69
	3	1,23	2,15	2,98	3,60	4,05
	4	1,24	1,98	2,83	3,55	4,15
	5	1,02	1,93	2,68	3,30	4,08
	6	1,04	1,70	2,46	3,08	4,22
	7	0,84	1,51	2,20	2,80	4,21
	8	0,72	1,46	2,09	2,63	4,20
291	1	0,96	1,92	2,89	3,08	3,18
	2	1,18	2,34	3,73	3,77	3,85
	3	1,23	2,20	3,09	3,72	4,06
	4	1,18	1,97	2,85	3,56	4,14
	5	0,91	1,84	2,62	3,28	4,07
	6	1,00	1,69	2,48	3,17	4,22
	7	0,77	1,46	2,17	2,82	4,22
	8	0,63	1,35	1,98	2,56	4,11
210	1	0,94	1,77	2,67	3,05	3,18
	2	1,12	2,19	3,66	3,77	3,88
	3	1,07	1,97	2,74	3,35	4,04
	4	1,05	1,77	2,57	3,24	4,12
	5	0,84	1,69	2,48	3,07	4,10
	6	0,94	1,61	2,38	3,01	4,26
	7	0,77	1,47	2,16	2,76	4,22
	8	0,66	1,37	1,99	2,53	4,11
361	1	0,95	1,85	2,84	3,10	3,23
	2	1,16	2,29	3,76	3,81	3,91
	3	1,12	2,13	2,93	3,61	4,06
	4	1,06	1,87	2,67	3,39	4,15
	5	0,84	1,72	2,58	3,21	4,14
	6	0,94	1,65	2,43	3,11	4,26
	7	0,76	1,52	2,20	2,85	4,32
	8	0,69	1,42	2,05	2,64	4,28
438	1	0,95	1,84	2,81	3,07	3,18
	2	1,18	2,32	3,75	3,81	3,90
	3	1,12	2,19	2,97	3,65	4,13
	4	0,99	1,80	2,54	3,29	4,13
	5	0,66	1,43	2,22	2,81	4,00
	6	0,74	1,38	2,06	2,66	4,05
	7	0,62	1,29	1,90	2,47	4,05
	8	0,60	1,26	1,82	2,34	4,02

ANEXO L

Tabela 14 – Velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g CO₂ liberado) para as diferentes linhagens no transcorrer dos 8 ciclos fermentativos. Cada dado representa a média de 3 repetições (conclusão)

LINHAGEM	Desprendimento de CO ₂ (g)					
	CICLO	2h	4h	6h	8h	21-23h
419	1	0,93	1,68	2,55	3,01	3,15
	2	1,10	2,13	3,68	3,77	3,88
	3	0,99	1,98	2,71	3,32	4,08
	4	0,99	1,84	2,61	3,23	4,13
	5	0,78	1,64	2,52	3,07	4,09
	6	0,87	1,62	2,36	2,98	4,20
	7	0,73	1,51	2,16	2,75	4,18
	8	0,66	1,36	1,96	2,49	4,03
390	1	0,95	1,77	2,71	3,07	3,19
	2	1,18	2,23	3,70	3,78	3,87
	3	1,04	2,08	2,79	3,42	4,05
	4	1,00	1,90	2,70	3,39	4,12
	5	0,81	1,68	2,63	3,26	4,14
	6	0,87	1,62	2,36	3,02	4,23
	7	0,68	1,42	2,05	2,65	4,17
	8	0,62	1,27	1,83	2,36	4,07