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

**Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço
de cana-de-açúcar mediante hibridação**

Cristiane Silvello

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

**Piracicaba
2016**

Cristiane Silvello
Tecnóloga em Produção Sucroalcooleira
MBA em Gestão e Negócios

**Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-
de-açúcar mediante hibridação**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Sivello, Cristiane

Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mediante hibridação / Cristiane Sivello. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

111 p. : il.

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

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Etanol de segunda-geração 3. Evolução adaptativa
4. Hidrolisado lignocelulósico 5. Hibridação 6. Inibidores I. Título

CDD 589.23
S587o

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

DEDICO

Aos meus pais Cleidenice da Silva e Reginaldo Silvello pelo amor, carinho, incentivo e apoio incondicional para que eu chegasse até aqui e por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos. Agradeço também toda minha família.

Amo muito vocês!

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, por todo seu apoio, estímulo, disponibilidade e conhecimento transmitido indispensáveis à concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ser essencial em minha vida, em permitir que tudo isso acontecesse, pela saúde, força, coragem e perseverança não somente nessa caminhada, mas em todos os momentos da minha vida, Ele é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Basso, por todos os ensinamentos científicos, compreensão, incentivo e pela oportunidade de realização deste trabalho.

A banca examinadora pelas contribuições no trabalho.

Ao Prof. Luiz Humberto Gomes (Beto), pela ajuda e paciência em esclarecer minhas dúvidas.

Ao Técnico de laboratório, Luis Lucatti (Cometa), pela contagiante alegria e por estar sempre predisposto a ajudar.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), pelo auxílio financeiro no projeto e pelo fornecimento dos hidrolisados de bagaço de cana.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP.

À agência CNPq, pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado.

Aos amigos do laboratório, Camila, Renata, Elisângela, Osni, Thalita, Ricardo, Otávio, Reinaldo e Eliane e todos os outros colegas que já estiveram ou ainda estão presentes no laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, ESALQ/USP, pelos auxílios no que me foi necessário e pela convivência de todos os dias, com certeza levarei vocês em meu coração eternamente.

Muito obrigada.

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo.

A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios, sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Etanol de segunda geração	17
2.2 Composição química da biomassa lignocelulósica	18
2.2.1 Celulose	19
2.2.2 Hemicelulose	20
2.2.3 Lignina.....	20
2.3 Bagaço de cana-de-açúcar	20
2.3.1 Hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar e seus inibidores	21
2.4 Fermentação etanólica e o processo brasileiro	25
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.5.1 Hibridização e Genome Shuffling	32
2.5.2 Evolução Adaptativa.....	35
3 OBJETIVO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material biológico	39
4.1.1 Obtenção das linhagens	39
4.1.2 Armazenamento das linhagens	39
4.1.3 Reativação das linhagens.....	39
4.2 Meios de cultura	39
4.3 Avaliação do crescimento em microplacas	40
4.4 Dissecação das tétrades e obtenção dos haploides (n).....	40
4.5 Cruzamento direcionado.....	42
4.6 Cruzamento massal.....	42
4.7 Evolução adaptativa/enriquecimento.....	43
4.8 Pré-fermentação com reciclo de células	44
4.9 Propagação das linhagens	44
4.10 Avaliação final das linhagens mediante fermentação com reciclo de células	45
4.10.1 Determinação da biomassa úmida	46
4.10.2 Determinação do teor de etanol	47

4.10.3 Determinação da viabilidade celular	47
4.10.4 Determinação de glicerol e açúcares residuais	47
4.10.5 Velocidade de fermentação	47
4.10.6 Análises estatísticas.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Dissecção de tétrades e obtenção dos haploides	49
5.2 Cruzamento direcionado	56
5.3 Cruzamento massal	62
5.4 Evolução adaptativa/enriquecimento	63
5.5 Seleção prévia em fermentações com reciclo de células	67
5.6 Avaliação final das linhagens mediante fermentação com reciclo de células	69
5.6.1 Velocidade de fermentação	80
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	101

RESUMO

Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mediante hibridação

O desenvolvimento de alternativas aos combustíveis fósseis como fonte de energia é uma prioridade global. A biomassa celulósica representa uma alternativa para satisfazer a procura de bicomcombustíveis renováveis. O bagaço de cana-de-açúcar é um abundante subproduto proveniente da produção atual de etanol no Brasil. Tal subproduto pode ser hidrolisado a fim de se obter açúcares fermentáveis para a produção do etanol de segunda-geração. Porém, no processo de pré-tratamento são gerados diversos inibidores como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural que causam efeitos adversos para a levedura no processo de fermentação alcoólica. A adição de melaço ao hidrolisado é uma forma de diminuir os efeitos dos inibidores no metabolismo das leveduras e também permite uma fermentação com maior teor alcoólico contribuindo para um balanço energético favorável da destilação, contribui também com o fornecimento de nutrientes minerais e orgânicos necessários a levedura para um processo empregando reciclo de células. Assim, objetivou-se selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com melhores características de multitolerância ao hidrolisado a partir de cruzamento direcionado e cruzamento massal seguido de evolução adaptativa. Para tal, linhagens *S. cerevisiae* industriais CAT-1, BG-1, PE-2 e SA-1 foram esporuladas e mediante micromanipulação foram obtidos 604 haploides, que foram avaliados quanto ao crescimento (DO_{570nm}) em substrato constituído por hidrolisado e melaço. Os haploides selecionados (25) tiveram o “mating type” determinado permitindo a realização de 51 cruzamentos direcionados, gerando 398 zigotos, que foram igualmente avaliados para o crescimento no meio seletivo. Paralelamente, foram realizados cruzamentos massais, resultando em 7 diferentes populações, as quais foram submetidas à evolução adaptativa por 25 gerações, sendo que os isolados selecionados de cada cruzamento foram avaliados em fermentação com reciclo de células. Quatro linhagens se destacaram como superiores aos parentais, evidenciando que a estratégia utilizada permitiu a obtenção de linhagens de *S. cerevisiae* com maior tolerância aos estresses impostos por um substrato para produção do etanol de segunda geração.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Etanol de segunda-geração; Evolução adaptativa; Hidrolisado lignocelulósico; Hibridação; Inibidores

ABSTRACT

Obtaining of yeasts for tolerance to inhibitors of sugarcane bagasse hydrolyzate by hybridization

The development of alternatives to fossil fuels as a source of energy is a global priority. Cellulosic biomass is an alternative to meet the demand for renewable biofuels. The sugarcane bagasse, an abundant byproduct generated from ethanol production in Brazil, can be hydrolysed to obtain fermentable sugars to produce second-generation ethanol. However, inhibitors produced in the pre-treatment process such as acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural, cause adverse effects to the yeast in the fermentation process. Addition of molasses in the bagasse hydrolyzate is one way to reduce the effects of inhibitors in the metabolism of yeast and also could allow fermentation with higher alcohol content contributing to a favorable energy balance in the distillation, as well as providing minerals and organic nutrients for the yeast. The main goal of this study was to select strains of *Saccharomyces cerevisiae* with better features of multi-tolerance to the bagasse hydrolyzate by directed crossing and mass mating followed by adaptive evolution. For that *S. cerevisiae* lineages CAT-1, BG-1, PE-2 e SA-1 were sporulated and 604 haploid cultures were obtained by micromanipulation and evaluated for growth (OD 570nm) in the substrate consisting of hydrolyzate and molasses. Selected haploids (25) were identified regarding their "mating type" (a and α) and used in. 51 directed crossings generating 398 zygotes, which were rescued by micromanipulation and also evaluated for growth in the same selective medium. Mass mating were performed with 7 different haploid populations from the parental strains, followed by an adaptive evolution for 25 generations. The selected zygotes were then subjected to fermentation trails with cell recycling, resulting in 4 strains with superior traits when compared with the parentals, allowing to conclude that the used strategy was successful in obtaining hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* with increased profile of tolerance towards a substrate for second-generation ethanol production.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Second-generation ethanol; Adaptive evolution; Hybridization; Lignocellulosic hydrolysate; Inhibitors

1 INTRODUÇÃO

A utilização de combustíveis fósseis é um dos principais fatores que influenciam negativamente o equilíbrio do meio ambiente. Assim os biocombustíveis obtidos a partir de matéria-prima renovável podem ser possíveis substitutos para esses combustíveis fósseis (NWAFOR, 2004) apresentando vantagens como a redução da emissão de carbono para a atmosfera, o que reduz a emissão de gases do efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global além de serem biodegradáveis e não tóxicos (NUNES et al., 2013).

O etanol produzido a partir da fermentação alcoólica da sacarose constituída na cana-de-açúcar (matéria-prima utilizada Brasil), ou do amido de milho (Estados Unidos) é denominado etanol de primeira geração (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Já o etanol celulósico, também chamado de etanol de segunda geração, é obtido a partir de biomassa lignocelulósica (GRAY et al., 2006). Os exemplos mais comuns de materiais lignocelulósicos são os resíduos agrícolas, florestais, sólidos urbanos e de processamento industrial, tais como da indústria de papel e celulose (WYMAN, 1994; VAN MARIS et al., 2006).

Após o processo de extração do caldo da cana-de-açúcar, no qual são produzidos o açúcar e o etanol, o bagaço e a palha são normalmente queimados nas indústrias fornecendo toda a energia necessária no processo (CANILHA et al., 2012). Seu rendimento é aproximadamente 85 toneladas da cana por hectare, sendo que para cada tonelada processada são gerados 140 kg de bagaço em base seca (SANTOS et al., 2012). O bagaço pode ser utilizado para a produção do etanol de segunda geração, pois é constituído de materiais lignocelulósicos (PANDEY et al., 2000), que integram três polímeros principais: celulose, hemicelulose e lignina (VAN MARIS et al., 2006; SUN; CHENG, 2002). O processamento desses materiais consiste em quatro principais operações unitárias: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação/purificação (MOSIER et al., 2005).

Os açúcares contidos nas frações celulósicas e hemicelulósicas representam os substratos que serão convertidos em etanol por meio da fermentação (CANILHA et al., 2013).

Durante os processos de pré-tratamento e hidrólise são formados compostos inibidores que podem ser organizados em três grupos, furanos, ácidos e fenólicos. Esses compostos reduzem a produção de etanol e a produtividade, afetando o desempenho das leveduras durante a etapa de fermentação (ALMEIDA et al., 2007). Portanto, a produção de etanol 2G ainda é um desafio, devido a esses inibidores gerados no processo e também devido ao custo das enzimas que ainda permanecem altos (OGEDA; PETRI, 2010).

Linhagens *S. cerevisiae* são utilizadas amplamente no processo industrial, quando há glicose ou outra fonte de carbono fermentescível presente no meio, assim utilizando a fermentação para obtenção de energia, convertendo o açúcar em álcool, porém não apresenta, naturalmente, capacidade metabólica para converter as pentoses. No entanto, linhagens industriais atualmente disponíveis apresentam baixa tolerância aos inibidores formados no pré tratamento do material lignocelulósico presentes no mosto formulado de melaço e hidrolisado (GANCEDO, 1998; CARDONA et al., 2010).

A adição de melaço ao hidrolisado é uma forma de diminuir os efeitos dos inibidores no metabolismo das leveduras, uma vez o hidrolisado vai estar diluído no meio e também o melaço fornece os nutrientes que são necessários. Assim estratégias de melhoramento de linhagens de leveduras são utilizadas para melhorar a eficiência de tolerância a múltiplos estresses presentes no hidrolisado visando maior desempenho diante o processo fermentativo (ZHENG et al., 2011a).

Um dos métodos utilizados é a hibridização sexual que é considerada o primeiro método para a melhoria das estirpes de levedura diploides industriais (RAMÍREZ; PERÉZ; REGODO, 1998), que levam ao aumento da diversidade genética, sendo relevante pelo fato de que as novas espécies tendem a obter um desempenho superior aos parentais (STEENSELS et al., 2014). “Genome Shuffling”, é um tipo de hibridização utilizado para melhorar fenótipos em leveduras visando a obtenção de linhagens mais tolerantes no desempenho geral da fermentação (STEENSELS et al., 2014).

A evolução adaptativa também pode ser utilizada para a obtenção de linhagens mais tolerantes. É um conjunto de mutações que ocorre em resposta a um estresse específico imposto no meio seletivo e são vantajosas para as células sob estas condições (PÉREZ-TORRADO et al., 2015).

No presente trabalho, objetivou-se selecionar híbridos de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* com melhores características de multitolerância aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a partir de cruzamento direcionado e cruzamento massal com evolução adaptativa para a produção de etanol de segunda geração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol de segunda geração

A energia desempenha um papel importante no desenvolvimento econômico. A maior parte da energia consumida em todo mundo provém essencialmente de combustíveis fósseis, no entanto há uma preocupação em relação à sua possível exaustão no futuro (BERNDES et al., 2003).

A demanda por biocombustíveis alternativos renováveis vêm sendo motivada (GRAY et al., 2006), devido a insegurança energética e as alterações climáticas atribuídas ao aquecimento global decorrente da queima dos combustíveis fósseis (JARDINE et al., 2009; NYKO et al., 2010).

A produção de etanol no Brasil consolidou-se em 27,96 bilhões de litros na safra 2013/14 e em 28,66 bilhões de litros para safra 2014/15, um incremento de 703,2 milhões de litros, alta de 2,5%. A produção de etanol continua concentrada na Região Centro-Sul, com 92,5% do total produzido no país (CONAB, 2015).

A produção de biocombustíveis convencionais, se depara com sérias dificuldades para atingir níveis maiores de produção. Para tal acontecimento haveria a necessidade do aumento da área cultivada, o que não seria a solução ideal, assim é preciso o incentivo as pesquisas e adoção de novas tecnologias (ROSA; GARCIA, 2009).

Nesse contexto, os biocombustíveis de segunda geração (obtido de matéria-prima não convencional), têm se apresentado como uma solução capaz de mitigar esses problemas (JARDINE et al., 2009; NYKO et al., 2010).

A busca por novas fontes energéticas fez a biomassa ganhar espaço, sendo utilizada diretamente para co-geração de energia na forma de queima como também no uso destes resíduos como fonte energética para a produção de etanol de segunda geração derivado dos resíduos industriais, agrícolas e florestais (ALVES; MACRI, 2013; ROSA; GARCIA, 2009).

O etanol 2G pode também ser obtido a partir do bagaço ou palha da cana-de-açúcar, sorgo, milho, beterraba, entre outros, sendo o mais comum deles de bagaço de cana (NOGUEIRA, 2008).

No momento, a empresa Borregaard localizada na Noruega declara ser o maior produtor de etanol de segunda geração, com uma produção anual de 20.000 m³ (RODSRUD; SJODE, 2012).

No entanto, o processo encontra-se limitado pela técnica e por desafios econômicos como o custo da matéria-prima lignocelulósica, e o fornecimento eficiente de açúcar ou de amido (CHENG; TIMILSINA, 2011). A conversão de glicose em etanol é quimicamente idêntica ao de primeira geração, sendo que as mudanças ocorrem apenas no processo para obtenção dos açúcares contidos na fração celulósica do bagaço de cana (RAELE et al., 2014).

Outros desafios encontrados são o pré-tratamento severo da biomassa recalcitrante, que resulta na formação de compostos inibidores, o que provoca problemas durante a fermentação, a produção de enzimas eficazes para hidrolisar a celulose, a um custo competitivo e as concentrações elevadas de etanol têm de ser alcançado, a fim de reduzir o custo de destilação e tratamento de águas residuais (LENNARTSSON, et al., 2014)

Já no Brasil há um grande potencial para a produção do etanol 2G, devido à disponibilidade de matéria-prima e baixo custo da mesma, o que o torna competitivo em relação aos outros países (SANTOS et al., 2012; CARDONA et al., 2010).

2.2 Composição química da biomassa lignocelulósica

Atualmente, é crescente o interesse na utilização da biomassa lignocelulósica, para a produção de etanol, pois é considerada a fonte de carboidratos mais abundantes na natureza (CGEE, 2009).

Em termos de composição os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). Geralmente contém 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina, essa composição varia de acordo com a biomassa. Também é constituída de pequenas quantidades de outros materiais, tais como, cinzas, proteínas e pectina (Figura 1) (SANTOS et al., 2012; BNDES, 2008; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Figura 1 – Estrutura da Lignocelulose (RUBIN, 2008)

2.2.1 Celulose

Devido as suas propriedades químicas e físicas (KLOCK et al., 2005), a celulose é um dos principais componentes estruturais da parede celular das plantas, o qual é responsável pela resistência mecânica e a estabilidade química (JARDINE et al., 2009; VAN MARIS et al., 2006).

É um polímero linear formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo beta 1-4 (VAN MARIS et al., 2006; JARDINE et al., 2009), as quais podem ser convertidas em monossacarídeos (SILVA, 2012). Pode ser hidrolisada, com ácidos ou processos enzimáticos (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004), assim a hidrólise da celulose por enzimas celulasas resulta na produção final de glicose, um açúcar de seis carbonos, que pode ser fermentado pela levedura (BNDES, 2008). Mediante outros processos de fermentação da glicose pode-se ainda obter butanol, isopropanol, 2,3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico (SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é constituída principalmente de xiloglucanas que são ligadas a microfibrilas de celulose, pectinas e lignina através de pontes de hidrogênio que estabilizam a parede celular, também contribuem com aproximadamente 20-25% dos constituintes da parede celular primária (PAIVA et al., 2009).

De acordo com Sanchez et al. (2010), é um polissacarídeo complexo, que inclui carboidratos poliméricos com cinco a seis átomos de carbono na estrutura das suas unidades de açúcar. Entre eles estão as glucoxilanas, arabinoglucoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas (MORAIS et al., 2005). Podem ser extraídos com diferentes concentrações de ácidos e outros produtos químicos (XU et al., 2012).

A hemicelulose é o segundo principal componente do material lignocelulósico que contém hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e Ácido D-galacturônico) (VAN MARIS et al., 2006). Quando a hemicelulose é degradada a recuperação de açúcares é cerca de 80-90% (OGEDA; PETRI, 2010).

2.2.3 Lignina

Outro polímero presente no material vegetal é a lignina (VAN MARIS et al., 2006; JARDINE et al., 2009). Está presente em quase todo o tipo de biomassa vegetal e atua como uma folha de proteção dos componentes dos materiais da biomassa (JARDINE et al., 2009).

Dois problemas envolvem o uso dessa matéria-prima, o primeiro consiste no fato de que a lignina não é utilizada no processo de fermentação, de modo que a celulose deve ser separada, e o segundo, é que a estrutura deste material é dura e resistente a processos químicos e biológicos (CARCIERI et al., 2010).

2.3 Bagaço de cana-de-açúcar

O processo produtivo de etanol passa por várias etapas de produção que geram resíduos, assim após o processamento e a moagem da cana-de-açúcar, a fibra é separada do caldo, e o bagaço é obtido da última moagem da cana (REZENDE et al., 2011). O bagaço é

produzido na proporção de 240 a 280 Kg (com 50% de umidade) por tonelada de cana (CGEE, 2009).

O bagaço é formado por um conjunto de partículas heterogêneo (grãos e fibras) com tamanhos variando de 1 a 25 mm, mas com um tamanho médio de aproximadamente 2 mm. O tamanho das partículas não depende da variedade da cana, mas sim no processamento utilizado na indústria (SANCHEZ et al., 2010).

A composição química é variável devido a diversos fatores entre eles: o tipo de solo utilizado no plantio, o tipo de cana, as técnicas de colheita e o manuseio da cana (PEREIRA et al., 2012). É constituído em sua composição físico-químicas de 46% de fibras, 50% de água e 4% de sólidos dissolvidos (PERES, 1999).

Já na composição média da fibra do bagaço de cana-de-açúcar temos celulose (32-48%), hemicelulose (19-24%), lignina (23-32%), extrativos e outros (PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

O bagaço produzido é utilizado na indústria sucroalcooleira como gerador de vapor para produzir energia elétrica e térmica para os processos, no entanto, o excedente ainda é bastante significativo (CARASCHI et al., 1996). Para cada tonelada de bagaço hidrolisado pode-se obter em torno de 186 litros de etanol, sendo 123 litros obtidos da fermentação das hexoses e 63 litros da fermentação das pentoses (ROSSEL, 2012).

Portanto, a utilização integral dos componentes do bagaço de cana é desejável tanto para âmbitos econômicos como para as razões ambientais, o que tornaria possível a produção de etanol celulósico, assim proporcionando um aumento significativo na produção de bioetanol em torno de 40 a 50%, para uma mesma área plantada de cana-de-açúcar (REVISTA FAPESP, 2004; GOLDENBERG, 2007).

2.3.1 Hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar e seus inibidores

Os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontamente disponíveis para bioconversão (MARTÍN et al., 2007). Portanto, o processo de produção de etanol a partir do bagaço demanda a transformação da estrutura da celulose e hemicelulose e subsequente à conversão dos mesmos pelo processo de fermentação onde pela ação de micro-organismos é obtido o etanol (MOSIER et al., 2005).

Para que seja alcançada essa produção é necessário realizar quatro operações principais, sendo eles: o pré-tratamento, hidrólise enzimática ou ácida (hidrolisa os

polissacarídeos em açúcares fermentescíveis) fermentação e destilação (BALAT et al., 2008; SANTOS et al., 2014; KUMAR et al., 2009).

O principal desafio na conversão desse material lignocelulósico em etanol é o pré-tratamento devido a sua estrutura, e conseqüentemente, as tecnologias envolvidas que são mais complexas e têm custos mais elevados em comparação com a produção do etanol a partir de cana-de-açúcar ou milho (SOCCOL et al., 2010; CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Cada tecnologia de pré-tratamento tem vantagens e desvantagens, e depende do material recalcitrante (SOCCOL et al., 2010; GÍRIO et al., 2010), assim a melhor opção são aqueles que combinam diferentes métodos sendo eles físicos e químicos (RAMOS, 2003; ALVIRA et al., 2010), que visam alterar ou remover a hemicelulose e/ou a lignina, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, aumentando a digestibilidade enzimática e o rendimento em açúcares fermentescíveis (CANILHA et al., 2010; MOSIER et al., 2005).

O pré-tratamento deve satisfazer os seguintes requisitos: melhorar a formação de açúcares, evitar a degradação ou perda de hidratos de carbono, evitar a formação de subprodutos inibidores ao processo de fermentação e ter um custo efetivo (KUMAR et al., 2009; SUN; CHENG, 2002).

Sendo assim, existem vários tipos de pré-tratamento que podem ser classificados como: químicos (alcalino, ácido diluído, agentes oxidantes e solventes orgânicos), físicos (moagem, aquecimento e trituração), físicos-químicos (explosão com vapor, explosão com amônia) e biológicos (fungos podridão branca) (SUN; CHENG, 2002; MOSIER et al., 2005; CARRASCO, 1992; KUMAR, et al., 2009; SOCCOL et al., 2010).

Um dos métodos mais empregados é a utilização de ácidos sob alta temperatura e pressão, com concentrações 0,5 a 1,5 (%) em torno de 160°C, sucedendo na quebra da estrutura da hemicelulose, resultando em uma parte líquida (oriunda da hemicelulose) e uma parte sólida (celulose e lignina) e formação de compostos inibidores (SUN; CHENG, 2002; MUSSATO; TEIXEIRA, 2010; CARCIERI et al., 2010; BUCKERIDGE et al., 2014).

Já no método de explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem a desestruturação e desagregação das fibras, além do rompimento das ligações químicas devido à alta pressão de vapor empregado. Este processo é iniciado a uma temperatura de 160 a 260°C, por segundos antes da exposição da biomassa a explosão de vapor, resultando na degradação da hemicelulose e lignina e potencializando o processo de hidrólise da celulose (SUN; CHENG, 2002).

Após o pré-tratamento, o material pode então passar pelo processo de hidrólise, (BNDES, 2008), que tem como objetivo a redução das macromoléculas de celulose e consequentemente a liberação de açúcares (JARDINE et al., 2009; KUMAR, et al., 2009). Os métodos químicos e enzimáticos são as técnicas mais comuns para a hidrólise (MUSSATO; TEIXEIRA, 2010).

A hidrólise ácida é uma técnica relativamente de baixo custo (MICHEL, 2007), porém os custos se elevam quando se trata dos equipamentos que precisam ser mais resistentes devido à abrasividade do ácido (ROSA; GARCIA, 2009).

A hidrólise enzimática vem como alternativa a hidrólise ácida, por ser um processo bastante específico, pode ser realizada sob condições de reação mais suaves (MUSSATO; TEIXEIRA, 2010). Tal processo é geralmente conduzido em condições de pH cerca de 5 e a temperatura entre 45° a 50 ° C (PHILIPPIDIS; SMITH, 1995; LYND et al., 2002), tem um menor consumo de energia e menor impacto ambiental (MUSSATO; TEIXEIRA, 2010). São utilizadas enzimas como catalisadores do material pré-tratado (OGEDA; PETRI, 2010), porém o custo dessas enzimas ainda é elevado (SILVA, 2012). Mesmo assim a hidrólise enzimática é promissora, pois visa um custo competitivo a longo prazo (JARDINE et al., 2009).

As principais vantagens dos processos enzimáticos são: seletividade, diminuição na formação de inibidores que é favorável para o subsequente uso do hidrolisado em processos de fermentação e economia no processo em relação a custo do equipamento, pois não apresenta problemas de corrosão (HINMAN et al., 1992; MUSSATO; TEIXEIRA, 2010). Também permite maiores rendimentos (75-85%), pois as enzimas catalisam apenas as reações de hidrólise, preservando o açúcar (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; JARDINE et al., 2009).

Portanto, nessa degradação da estrutura do material lignocelulosicos, são liberados açúcares contidos nas frações celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, glucose, manose e galactose) (CANILHA, et al., 2010).

Juntamente com os açúcares, inúmeros inibidores tóxicos produzidos durante as condições severas na etapa do pré-tratamento afetam o desempenho dos os micro-organismos fermentadores.

Três grandes categorias de compostos inibidores são derivadas do pré-tratamento físico-químico do material lignocelulósico são eles os ácidos fracos, derivados de furano, e

fenóis (Figura 2) (PALMQVIST et al., 1999; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; LARSSON et al., 1999).

Figura 2 – Inibidores libertados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (ALMEIDA et al., 2007)

Os ácidos orgânicos como ácido acético, ácido levulínico e ácido fórmico são formados pela hidrólise do grupo acetil presente na fração hemicelulósica (INGRAM et al., 1999). Os aldeídos, alcoóis aromáticos, como compostos fenólicos são formados principalmente pela degradação química parcial da lignina. Os furaldeídos, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) são formados pela degradação de pentoses e hexoses (glicose e xilose) os quais são bastante problemáticos para a etapa da fermentação. Outros componentes também estão presentes como os extrativos das matérias-primas (resinas ácidas), e íons de metais pesados (ferro, cromo, níquel e cobre) (CHANDEL et al., 2011; ALMEIDA et al., 2007; PEREIRA et al., 2011; RANATUNGA et al., 2000, MUSSATO; ROBERTO, 2004, PALMQVST; HAHN-HAGERDAL, 2000b, JONSSON et al., 2013).

Os inibidores gerados no processo de pré-tratamento são considerados potenciais inibidores para a fermentação, sendo um fator limitante na viabilidade de conversão do material lignocelulósico em etanol comprometendo sua rentabilidade final (HAHN-HAGERDAL et al., 2006; KLINKE, THOMSEN, AHRING, 2004; TENGBORD et al., 1998; MARTIN et al., 2003).

Os ácidos orgânicos como ácido acético, afetam a levedura através da membrana plasmática e diminui o pH intracelular (SCHNEIDERMAN et al., 2015). Os fenóis inibem a atividade enzimática da levedura, e consequentemente destroem a membrana afetando as suas propriedades como a barreira seletiva (HEIPIEPER et al., 1994; SCHNEIDERMAN et al.,

2015). Já os furanos, reduzem as atividades tanto enzimática como biológica, com a quebra do DNA e inibição da síntese de RNA e proteínas, reduzindo a produção de etanol (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; MODIG et al., 2002; VAN MARIS et al., 2006).

Quando vários desses inibidores estão presentes em um sistema de fermentação, os efeitos de inibição são maiores do que os efeitos dos compostos individualmente, sendo denominado efeito sinérgico, o que ocorre em hidrolisados lignocelulósicos que podem conter todos esses compostos em níveis inibitórios (SCHNEIDERMAN et al., 2015).

No provável mosto formulado para a fermentação do etanol 2G o melaço pode ser misturado com o hidrolisado, pois contribui com os nutrientes necessários para as leveduras como (K, Mg, S, Ca, P, Zn, Cu, Mn, Al), já que o hidrolisado é muito pobre nesse quesito, assim como o melaço ajuda a diluir os compostos tóxicos presentes no hidrolisado de bagaço (MORRISON, 1959).

Alguns micro-organismos podem ser utilizados para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, porém, a levedura *S. cerevisiae* se destacou e mostrou maior tolerância ao produto final e aos componentes presentes no hidrolisado (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996). No entanto, o desenvolvimento de novas cepas de leveduras com maior tolerância aos inibidores é altamente desejável (ALMEIDA et al., 2007), assim como uma melhor eficiência nos custos de produção e na rentabilidade do processo é necessário a conversão eficientes dos monossacarídeos presentes no hidrolisado de modo que o custo possa ser reduzido gradativamente para produção de etanol a nível industrial (GUPTA et al., 2009; FU et al., 2009).

2.4 Fermentação etanólica e o processo brasileiro

Os micro-organismos utilizados para a fermentação de etanol podem ser leveduras ou bactérias, porém a espécie de micro-organismo mais utilizada atualmente para a bioconversão em etanol é a levedura *S. cerevisiae* (CARCIERI et al., 2010; CARVALHO et al., 2006; DE CARVALHO; MONTEIRO, 2011).

A fermentação alcoólica por leveduras é um processo anaeróbico, que acontece no citoplasma da célula e sua principal rota metabólica é a glicólise onde ocorre a transformação de açúcares, sendo que uma molécula de glicose é metabolizada e são produzidas duas moléculas de piruvato. Na fase seguinte, o piruvato é descarboxilado formando acetaldeído que é reduzido e se obtém como produto final o etanol, e a liberação de duas moléculas de

dióxido de carbono (CO₂) (LEHNINGER et al., 1995; VOLPE, 1997; BAI et al., 2008). Outros compostos são produzidos, como, glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeído, acetoína e butilenoglicol (DE SOUSA; MONTEIRO, 2011; AMORIM, 1977), sendo que o glicerol é o mais importante componente do ponto de vista quantitativo (GUTIERREZ et al., 1991; OURA, 1977), é considerado um subproduto quando a glicose ou outros açúcares fermentáveis são facilmente convertidos em etanol (NEVOIGT; STAHL, 1997).

O glicerol (1,2,3 propanotriol ou glicerina) é sintetizado no citoplasma da levedura *S. cerevisiae*, e desempenha papéis fisiológicos importantes no metabolismo da levedura incluindo regulação osmótica e manutenção do equilíbrio redox intracelular sob condições anaeróbias (WANG et al, 2001; BLOMBERG; ADLER, 1992).

Na decorrência de estresses como a pressão osmótica (MAGER; SIDERIUS, 2002), o glicerol está claramente envolvido no controle da atividade de água intracelular em células osmoticamente estressadas (NEVOIGT; STAHL, 1997).

Já no processo fermentativo para a produção do bioetanol, a formação de glicerol é indesejável, pois ocasiona a redução na eficiência da fermentação (BRUMM; HEBEDA, 1988).

Os carboidratos substratos da fermentação podem tanto ser endógenos (esses constituintes da levedura como glicogênio e a trealose), tanto exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), que são fornecidos à levedura (LIMA et al., 2001).

A metabolização anaeróbia do açúcar pela levedura tem como objetivo principal gerar energia em forma de ATP (adenosina trifosfato), que será empregada em várias funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) para a manutenção da vida, crescimento e multiplicação, sendo que o etanol e CO₂ são produtos de excreção, que não tem utilidade metabólica para a célula nessas condições de anaerobiose. No entanto, em condições de aerobiose o etanol, assim como outros produtos de excreção como o glicerol, pode ser oxidado metabolicamente, gerando mais ATP e biomassa (LIMA et al., 2001).

As necessidades nutricionais de levedura durante o processo de fermentação alcoólica influenciam a multiplicação, crescimento celular e a transformação eficiente em álcool, assim o meio deve oferecer nutriente como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em pequenas quantidades (LIMA et al., 2001).

Esses nutrientes servem como cofatores para varias enzimas no metabolismo celular. O zinco, cobre e manganês também são importantes na atividade respiratória e no crescimento (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

Um dos substratos para a fabricação do etanol na indústria brasileira é o melaço, um subproduto da indústria açucareira, é resultante da cristalização final do açúcar, é utilizado, pois apresentam em sua composição água, carboidratos fermentescíveis (glicose, frutose e sacarose), aminoácidos, vitaminas, proteínas, cálcio, magnésio, sódio e potássio (RAMBLA et al., 1999).

O melaço é diluído com caldo de cana em proporções diferentes para atingir o brix pretendido (BASSO et al., 2008), contribui assim para o aumento da concentração de açúcar.

Porém, nesse meio também há altas concentrações de metais pesados, sulfito e HMF, que causam problemas como a inibição do crescimento da levedura, influencia no pH e inativação das enzimas relacionadas com a biossíntese do produto durante a fermentação (ROUKAS, 1998).

O processo que opera nas destilarias brasileiras (75% das destilarias) é chamado de Melle-Boinot, ou em modo contínuo, que ao final da fermentação, as células são colhidas por centrifugação e re-utilizado no próximo ciclo fermentativo, até 90-95% das células de levedura são reciclados, resultando em elevada densidade de células 10 a 14% (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Na fabricação do álcool (Figura 3), a fermentação alcoólica é conduzida em temperatura de 32 a 40°C por 6 a 10 horas, dependendo da concentração de açúcares no mosto entre 18 a 22% de ART (açúcares redutores totais = sacarose, glicose e frutose) com 10% de células, as fermentações trabalham com teores alcoólicos de aproximadamente 8 a 10%, e para cada litro de álcool produzido são gerados outros 12 litros de vinhaça (AMORIM; LOPES, 2013). No final da fermentação é realizada a centrifugação de separação do vinho bruto e a reutilização de leveduras, assim o vinho delevedurado segue para a destilação. Após a centrifugação, o levedo é tratado com ácido sulfúrico para conseguir o pH de 1,8-2,5, por 1 a 2 horas a fim de reduzir a contaminação bacteriana e a reutilização do fermento no próximo ciclo fermentativo (AMORIM; LOPES, 2013; BASSO et al., 2011). Esse tratamento pode afetar o metabolismo da levedura mediante o transporte de ácidos fracos não dissociados através da membrana celular resultando em queda no valor do pH intracelular, esses ácidos são formados por micro-organismo contaminante ou podem estar presentes no substrato utilizado (ALVES, 1994).

As altas densidades celulares e reciclagem de células também reduzem o crescimento das cepas, porém conduz a um alto rendimento na conversão de açúcares em etanol em torno de 90-92%. O reciclo de células tem um impacto positivo nas leveduras levando à evolução de linhagens multi-tolerantes, isto porque há maior pressão seletiva (evolução adaptativa) nas células, conduzindo para maior tolerância às condições estressantes da fermentação industrial (BASSO et al., 2008).

Figura 3 – Fluxograma do processo fermentativo tipo batelada alimentada com tratamento ácido e recirculação do fermento. O mosto é adicionado ao pé-de-cuba já contido na dorna, iniciando-se a fermentação que é finalizada após 6-10 horas. As células de levedura são coletadas por centrifugação, tratadas com ácido e reutilizadas na fermentação seguinte (BASSO et al., 2015, no prelo)

Entre os principais fatores que podem influenciar o desempenho do processo fermentativo industrial afetando a eficiência na conversão de açúcar em etanol destacam-se: os fatores físicos, como a temperatura e pressão osmótica, os fatores químicos, como o pH, nutrientes minerais e orgânicos, e microbiológicos, como a concentração de levedura e a contaminação bacteriana (LIMA et al., 2001; DE SOUSA; MONTEIRO, 2011). Contudo a contaminação bacteriana é uma das principais causas da redução do rendimento de etanol interferindo negativamente na qualidade da produção e da fermentação, pois além de consumir o substrato para a produção de etanol, as bactérias produzem metabólitos tóxicos

que causam floculação como à produção de ácidos orgânicos. Nesse contexto é preciso fazer um controle eficaz para minimizar a contaminação e obter uma fermentação com desempenho elevado (DE CARVALHO; MONTEIRO, 2011), sendo que, para cada 1×10^7 bactérias / mL de vinho há um prejuízo de 0,6% no rendimento da fermentação (AMORIM; LOPES, 2013).

O que também implica para o crescimento das leveduras é a elevada concentração de etanol que afeta os processos celulares desnaturando as células (DING et al., 2009; DE SOUSA; MONTEIRO, 2011).

Portanto, para um bom desempenho na indústria, a levedura deve possuir algumas características como: alta velocidade de fermentação, tolerância ao álcool, bom rendimento, resistência e estabilidade (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009).

2.5 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é um eucarioto muito conhecido, devido a sua importância histórica, sendo o agente responsável pela fabricação de pães, bebidas e na produção de etanol (STEENSELS et al., 2014; LIMA et al., 2001). O uso dessa levedura se dá pelo fato da sua facilidade em manipulação em laboratório e rápido crescimento, já que seu genoma foi totalmente seqüenciado (LALUCE et al., 2012; ZAKRAJŠEK et al., 2011; TORTORA et al., 2005).

As células são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura. É uma levedura diploide e sua forma de reprodução é assexuadamente por brotamento ou gemulação, e o núcleo se divide por constrição e uma parte dele entra no broto juntamente com outras organelas (CARVALHO et al., 2006).

Assim uma célula filha cresce a partir de gêmula da célula-mãe, resultando na divisão nuclear, formação da parede celular e, finalmente a separação das células, portanto, os tamanhos e características morfológicas podem variar entre estirpes e entre células haploides e diploides (EIRIZ, 2007).

Na composição química, apresentam cerca de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros (PELCZAR et al., 1997).

A parede celular é uma organela comum em leveduras e fungos filamentosos, é uma estrutura forte, responsável pela proteção física, estabilidade osmótica da célula e transporte de nutrientes (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

A trealose e o glicogênio são considerados substâncias de reserva energética para leveduras (ALCARDE; BASSO, 1997), porém, diversas linhas de evidência sugerem que a trealose possua função de proteção para as células de leveduras altamente eficazes para manter a integridade estrutural do citoplasma sob condições de estresse ambientais (WIEMKEN, 1990; SINGER; LINDQUISTINGER, 1998) como altas temperaturas, choque osmótico e efeitos tóxicos do etanol (ZHENG et al., 2011a).

É concebível que elevados níveis de trealose nas leveduras podem ser associados com aumento de tolerância ao estresse resultando em melhor capacidade de fermentação (D'AMORE et al., 1991). Assim, a queda da viabilidade da levedura está relacionada com a diminuição da reserva de carboidratos, as perdas significativas nos teores de trealose induzem deterioração no processo de polarização da membrana (LALUCE et al., 2012).

Em relação ao outro açúcar presente no hidrolisado, a linhagem de *S. cerevisiae*, é incapaz de fermentar pentoses como xilose (SANCHEZ; CARDONA, 2008). Por conseqüência, uma quantidade do material disponível no hidrolisado que é um provável substrato para a produção do etanol de segunda geração, não é convertida em etanol, reduzindo a produtividade e rendimento (CARCIERI et al., 2010).

As pesquisas para *S. cerevisiae* estão mais avançadas do que para qualquer outro eucarioto, no que diz respeito aos conhecimentos sobre a genética, fisiologia e a biologia molecular, isso se deve pelas suas vantagens intrínsecas podendo ser cultivadas em meio definido e com um ciclo de vida ideal que permite a construção de um mapa genético (GOFFEAU et al., 1996).

Os traços fenotípicos de leveduras *S. cerevisiae* como o crescimento rápido em meio rico de açúcares, produção em alta tolerância de álcool, e ao estresse por milhares de gerações tiveram fortes influências sobre seu genoma (PEREZ-ORTIN, 2002).

As células de levedura podem existir em um estado haploide e diploide. Em condições ótimas, ambas as células haploides e diploides podem proliferar-se assexuadamente por brotamento (STEENSELS et al., 2014).

O ciclo celular da levedura *S. cerevisiae* é caracterizado principalmente por uma base vegetativa diploide (COOPER; STRICH, 2002), quando exposta a certas condições pobres em nutrientes, as células modificam o seu crescimento, assim diploides podem ser submetidos à esporulação (meiose seguido por formação de esporos) (STEENSELS et al., 2014).

A meiose de uma célula diploide, resulta em uma estrutura (asco) contendo tétrades que são quatro esporos haploides (ascósporos) (BYERS, 1981). Ascósporos são esporos

produzidos no interior de uma única célula-mãe (NEIMAN, 2005), possuindo dois do tipo de acasalamento α e dois tipos de acasalamento a (STEENSELS et al., 2014, NEIMAN, 2005; KNOP, 2011). A conjugação na levedura ocorre entre células de tipo sexual diferente, designados alelos a e α (Figura 4) (COOPER; STRICH, 2002). Os esporos possuem uma série de elaborações estruturais únicas que conferem uma elevada resistência aos estresses ambientais (HERMAN; RINE, 1997).

Os esporos atuam como gametas, e podem fertilizar mutuamente por conjugação (acasalamento) para produzir zigotos. Assim, o híbrido é resultado da fusão de dois gametas diferindo na sua constituição genética (SIPICZKI, 2008).

Esta conversão entre estados de haploides e diploides é conseguida pelo equilíbrio entre esporulação e crescimento mitótico.

A capacidade de duas células haploides se conjugarem, fundirem e originarem uma célula diploide é denominada de mating ou reprodução sexuada. O tipo de mating de cada célula é determinado pelo locus MAT (mating type) (HABER, 1998; KNOP, 2011; RAMÍREZ; PERÉZ; REGODO, 1998). O “mating type” indica a formação de uma célula diploide assexuada a partir de duas células haploides sexuais de tipo de acasalamento oposto (MAT um e MAT α), que envolve a fusão de dois citoplasmas celular, e o processo é concluído com a fusão dos dois núcleos (cariogamia) (KNOP, 2011; HABER, 1998).

A dissecação é uma ferramenta útil para a seleção de novas linhagens (MORIN; MOORES; SACHER, 2009). A separação dos quatro ascósporos do indivíduo é feita por micromanipulação, essa mesma técnica também é utilizada para a separação dos zigotos. A recolocação e transferência em posições distintas na placa (colônias isoladas) de ascósporos ou zigotos são efetuadas em superfície de ágar com uma micro-agulha do microscópio micromanipulador (SHERMAN, 2002).

Figura 4 – Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae* (STEENSELS et al., 2014)

A esporulação em leveduras é um fator importante, pois acarreta a geração de novos híbridos e mantém a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente (GREIG et al., 2002).

Muitos esforços estão sendo realizados para aumentar a produtividade e desempenho do micro-organismo, o melhoramento de leveduras mediante cruzamentos é uma alternativa para lidar com os estresses causado no processamento industrial, no entanto, a criação de cepas resistentes ao estresse no laboratório muitas vezes não são transferíveis para aplicações industriais (CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

2.5.1 Hibridização e Genome Shuffling

As leveduras são capazes de se modificar a partir de cruzamentos entre haploides de diferentes "mating type", o estado diploide proporciona uma série de vantagens evolutivas que não são vistas em haploides, é importante para aumentar a flexibilidade genética e promover a mudança adaptativa o que aumenta a possibilidade de um híbrido ser superior (GONZÁLEZ

et al., 2006; THOMPSON; DESAI; MURRAY, 2006; STEENSELS et al., 2014; HABER, 1998).

A hibridação de estirpes heterotáticas é o primeiro método utilizado para a melhoria de levedura, sendo possível a geminação de culturas esporuladas (GIUDICI et al., 2005). A hibridação de estirpes de levedura é um dos mecanismos mais importantes que levam à geração de estirpes melhoradas e aumento da diversidade genética. Isso pode acontecer entre as diferentes estirpes da mesma espécie, diferentes espécies de um mesmo gênero ou mesmo entre cepas de diferentes gêneros. É relevante pelo fato de que as novas espécies tendem a exibir um híbrido com maior vigor, isto é, têm um desempenho superior de ambas as estirpes progenitoras (STEENSELS et al., 2014).

O mecanismo de recombinação resultante da hibridação, isto é, a intersecção entre diferentes tipos de portadores de mutações, promove a variabilidade adicional em populações, obtendo-se assim uma seleção natural os tipos mais aptos sobrevivem, em detrimento dos menos adaptados (AZEVEDO et al., 2000).

Embora as potencialidades de híbridos de leveduras industriais sejam bem documentados, um trabalho recente publicado na revista *Evolutionary Applications* (STELKENS et al., 2014), sugere que a hibridização pode também ter um impacto importante no aumento da capacidade de resposta evolutiva e que taxa com a capacidade de troca genes com parentes distantes podem ter vantagem em ambientes que mudam rapidamente.

A recombinação sexual é um mecanismo efetivo para combinação de características desejáveis melhorando a biodiversidade genética, permitindo o compartilhamento de informações genéticas dentro de uma população e elimina o risco do aparecimento de genes deletérios (ZHANG et al., 2002).

Em laboratório, as linhagens de leveduras diploides podem esporular em meio pobre de nutrientes formando os ascósporos, então é tratado com uma enzima Zimoliase, para o resgate dos ascósporos, onde é utilizado à técnica de micromanipulação e dissecação de tétrades utilizando uma micro-agulha em um microscópio micromanipulador para separar e realocar os quatro ascósporos e posteriormente são feitos os cruzamentos (MORIN; MOORES; SACHER, 2009; ROMANO et al, 1985; MARULLO et al., 2009).

Em trabalhos encontrados a obtenção de linhagens *S. cerevisiae* mais tolerantes ao etanol foi feita após a mutação das linhagens 2n e seleção em meio sólido com alta

concentração de etanol, utilizando a recombinação sexual como estratégias de melhoramento foram realizadas a esporulação, cruzamentos e seleção (HOU, 2010).

Devido às condições estressantes do meio de processos biotecnológicos as novas células de leveduras requerem como característica primordial uma resistência maior a esses estresses (RANDEZ-GIL et al., 1999), desse modo, a hibridização pode aumentar a capacidade de resposta evolutiva e podem sobreviver melhor a uma rápida mudança ambiental (STELKENS et al., 2014).

O cruzamento massal é um tipo de hibridização, é uma técnica de melhoramento de linhagens em que um grande número de células de levedura haploides, muitas vezes a partir de diferentes estirpes progenitoras são misturadas e acasaladas aleatoriamente. É usado para gerar estirpes industriais com características melhoradas (STEENSELS et al., 2014).

A obtenção de linhagens tolerantes a níveis mais elevados de estresse é uma estratégia para garantir a competitividade de um dado processo de fermentação (CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

O cruzamento massal foi utilizado para combinar diferentes propriedades de dois tipos de estirpes de padaria, uma com tolerância osmótica utilizadas em massas doces e outra com boa utilização de maltose utilizada na massa de pão sem açúcar (HIGGINS et al., 2001).

Relacionado ao cruzamento massal o “Genome Shuffling”, é uma das técnicas para melhorar fenótipos em micro-organismos de um modo rápido e relativamente fácil (SHI, et al., 2009; GONG et al., 2009; STEENSELS et al., 2014).

A técnica de “Genome Shuffling” é relacionada com o cruzamento massal com ciclos repetidos, esporulação e seleção para a recombinação de linhagens (GONG et al., 2009), e tem a vantagem de explorar a diversidade genética completa em uma população e faz com que seja possível combinar mutações úteis de muitos indivíduos diferentes, ou seja, recombinação entre vários pais de cada geração (STEENSELS et al., 2014), assim as linhagens finais obtêm características genéticas melhoradas a partir de múltiplas linhagens iniciais, essa técnica é utilizada em muitos experimentos para aumentar a produção de metabólitos e melhorar a tolerância aos estresses (LEJA; MYSZKA; CZACZYK, 2011).

Em contraste com um programa de melhoramento tradicional, que só trata dois parentais por geração, a técnica de “Genome Shuffling” baseia-se em várias recombinações entre vários parentais resultando em fenótipos desejáveis (GIUDICI et al., 2005).

Os sucessos do “Genome Shuffling” dependem da seleção inicial de variantes, na eficiência do processo de recombinação genética, e do poder do método de seleção (GONG et al., 2009; HOU, 2010).

Linhagens de leveduras industriais tem se destacado até o momento na produção do etanol de primeira geração sendo elas BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 (AMORIM; LOPES, 2013). A manipulação do genoma dessas estirpes pode permitir a criação de uma nova geração de organismos multi-tolerantes aos estresses presente na fermentação (ARGUESO et al., 2009).

2.5.2 Evolução Adaptativa

Os inibidores gerados no pré-tratamento tem efeitos estressantes para a levedura, desse modo linhagens que sejam mais tolerantes são desejáveis para fermentação de etanol de segunda geração. A evolução adaptativa é utilizada como ferramenta para a modificação e otimização dos híbridos (MCBRYDE et al., 2006). O organismo é submetido ao cultivo durante muitas gerações onde ocorre um conjunto de mutações em resposta aos estresses do meio, essas mudanças são benéficas para células e os variantes mais aptos aumentam devido à seleção natural (PÉREZ-TORRADO et al., 2015).

A adaptação por evolução permite a obtenção de cepas com características vantajosas sobre as demais com maior tolerância aos inibidores presentes no meio seletivo como temperatura, etanol, estresse oxidativo e inibidores do hidrolisado de bagaço como furfural, ácido acético e HMF (ÇAKAR et al., 2005). A concentração crescente de inibidores como o etanol exerce uma pressão de seleção resultando na reprodução de células mais adaptadas (ÇAKAR et al., 2005).

Assim, a adaptação de um micro-organismo sobre essas condições estressantes, pode ser relacionada à síntese de novas enzimas ou co-fatores, que permitem que o metabolismo seja eficiente e que os efeitos inibidores presentes no meio sejam reduzidos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Portanto, a adaptação está intimamente relacionada com a reprodução de células que possuem melhores características diante as outras células quando é utilizada uma pressão de seleção (ÇAKAR et al., 2005, SAUER, 2001).

3 OBJETIVO

Objetivou-se selecionar linhagens *Saccharomyces cerevisiae* com melhores características de multitolerância aos inibidores presentes no mosto de melaço e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Objetivos específicos:

Seleção de leveduras mediante hibridação a partir de cruzamentos massais e direcionados seguido de evolução adaptativa/enriquecimento em meio seletivo para a produção de etanol de segunda geração.

Avaliação das linhagens híbridas quanto à tolerância aos ciclos fermentativos

4 MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 Material biológico

Foram utilizadas 4 linhagens de leveduras *S. cerevisiae* amplamente empregadas no processo industrial de produção de etanol de primeira geração, BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1.

4.1.1 Obtenção das linhagens

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

4.1.2 Armazenamento das linhagens

As culturas obtidas nesse trabalho foram transferidas para tubos tipo eppendorf, contendo 600µl de YEPD líquido e armazenados em glicerol 30% (p/v) em freezer a - 80°C.

4.1.3 Reativação das linhagens

Para a reativação das linhagens obtidas e as referências utilizadas na avaliação de crescimento, na pré fermentação e ensaios fermentativos, foram reativadas pela transferência de 100 µL da cultura estoque em 600µl de YEPD líquido estéril (2% de glicose; 1% de peptona; 1% de extrato de levedura) seguido de incubação a 30°C por 24 horas.

4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura e suas respectivas formulações estão descritos a seguir:

YEPD para crescimento das leveduras

1% de extrato de levedura

1% de peptona bacteriológica

2% de glicose.

Para compor o YEPD sólido acrescentou 2% de ágar

Meio para micromanipulação

Consiste no meio YEPD com redução dos componentes para melhorar a transparência

0,3% de extrato de levedura

0,3% de peptona bacteriológica

2% de glicose

2% de ágar

Meio de propagação da linhagens

Melaço diluído para resultar em 10% de ART (açúcares redutores totais: sacarose, glicose e frutose).

4.3 Avaliação do crescimento em microplacas

Os haploides e linhagens dos cruzamentos direcionados e massais obtidos foram avaliados e submetidas a testes de crescimento medido por absorbância (DO_{570nm}), as células foram inoculadas (10 μ l) em placas de 96 poços com (90 μ L) de meio seletivo por poço e incubadas em um Tecan GENios microplate reader com leituras a cada 2 horas e agitações prévias de 10 minutos antes das leituras a 30°C por 24 horas. Foi empregado substrato constituído por hidrolisado de bagaço acrescido de melaço resultando em teores de 9,53% de ART (sendo 5% deste valor oriundo do hidrolisado), 4,0 g/L de ácido acético, 1,0 g/L de furfural, 0,52 g/L de HMF e 4,0% (v/v) de etanol.

4.4 Dissecção das tétrades e obtenção dos haploides (n)

As leveduras selecionadas para a obtenção dos haploides foram BG-1 e SA-1, juntamente com haploides já obtidos previamente de CAT-1, PE-2 e SA-1.

As culturas de leveduras de BG-1 e SA-1 foram individualmente estriadas em meio de esporulação (1% rafinose, 2% acetato de potássio, 2% de ágar e pH 6,8) e incubadas a 30°C por 5 dias para a formação de esporos.

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, colocou-se uma solução para digestão dos ascos composta por 4 μ L da enzima zimolase, 4 μ L de beta-mercaptoetanol, 400 μ L de tampão de micromanipulação micromanipulação (1M sorbitol; 10mM TRIS pH 7,5; 10mM Na₂ PO₄;

10mM EDTA; completado para 100 mL) e incubada a temperatura ambiente até ocorrer a digestão dos ascos.

Após a digestão dos ascos, (observada ao microscópio óptico), o material foi estriado em placa de petri contendo meio de micromanipulação. A placa então foi levada para o microscópio micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO), para dissecação dos ascos e os ascósporos ordenados na placa (Figura 5) e os haploides resgatados foram encubados por 48 horas a 30°C. Os haploides obtidos foram identificados com um número (referente asco) e uma letra (referente ao ascósporo) e armazenados conforme o subitem 4.1.2 para futura utilização nos cruzamentos massais e direcionados (ZHANG et al., 2002).

Figura 5 – Crescimento e isolamento dos haploides na placa de Petri, cada asco foi identificado com um número e para cada ascósporo deste asco uma letra (A, B, C, D) (ALEXANDRINO, 2012)

Os haploides juntamente com as linhagens parentais (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1) e ITA (levedura de panificação), foram reativados conforme descrito no subitem 4.1.3 e avaliados quanto ao crescimento em microplaca segundo subitem 4.3, foram feitas duas repetições por haploide isolado.

Os haploides com crescimentos iguais ou superiores (DO_{570nm} após 24 horas) às linhagens parentais foram pré-selecionados e avaliados quanto à reação sexual (“mating type”).

4.5 Cruzamento direcionado

Para a realização do "mating type", as linhagens de haploides isoladas e selecionadas com melhor crescimento foram reativadas conforme o subitem 4.1.3. Após este período uma porção de células foi retirada com o auxílio de um palito, e transferidas para outra placa de Petri com YEPD sólido misturando com a linhagem testadora (a e α) em proporções iguais e incubados a 30°C. Após duas horas de mistura a amostra foi observada quanto à formação do zigoto ($2n$) em lâminas ao microscópio ótico. A reação sexual da linhagem haploide é sempre contrária a reação sexual da linhagem testadora onde foi observada a formação do zigoto (MORTIMER et al., 1969).

Em seguida da identificação do "mating type" os haploides foram reativadas conforme o subitem 4.1.3. Após este período uma porção de células foi retirada com o auxílio de um palito tipo português, e transferidas para outra placa de Petri com YEPD sólido misturando as linhagens haploides (n) com diferentes reações sexuais antes da realização dos cruzamentos, os quais consistiram na mistura de partes iguais de pequena quantidade de células frescas das leveduras sobre o meio YEPD sólido e incubados a 30°C. Após quatro horas de mistura foi observada em lâmina ao microscópio, a formação de zigotos e mediante o uso de microscópio micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO), os zigotos foram individualizados segundo o protocolo de Mortimer et al. (1994) e alocados em posições distintas na placa. Foram resgatados 30 zigotos por cruzamento. Os zigotos foram identificados pela letra Z e numerados em ordem crescente e então foram resgatados e armazenados conforme o subitem 4.1.2

Os diploides gerados, juntamente com as linhagens parentais (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1) e ITA levedura de panificação, foram reativados conforme descrito no subitem 4.1.3 e avaliados quanto ao crescimento em microplaca segundo subitem 4.3, foram feitas três repetições por diploide isolado. A seleção dos híbridos foi feita mediante o maior ou igual valor de absorbância após 24 horas em comparação com as parentais.

4.6 Cruzamento massal

Para a realização do cruzamento massal todas as linhagens de haploides obtidas foram reativadas conforme o subitem 4.1.3.

Os 604 haploides derivados de BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 foram empregados em cruzamentos massais, contemplando todas combinações envolvendo 2 linhagens diferentes e uma combinação envolvendo as 4 linhagens (Tabela 2). Para tal um volume de cerca de 20

mL de cada linhagem (com aproximadamente 10^8 células haplóides por mL) foram misturados, acrescidos de nutrientes (para resultar em 2% de glucose, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona) e incubados a 30°C durante 48 horas para favorecer a hibridação. Tal hibridação contemplaria cruzamentos intra- e inter linhagens.

4.7 Evolução adaptativa/enriquecimento

Os cruzamentos (A, B, C, D, E, F e G), foram submetidos a uma evolução adaptativa. Foram impostas condições estressantes as populações em cada transferência ocorrida com o objetivo de obterem-se linhagens mais tolerantes aos inibidores ao final das gerações. Utilizando o meio seletivo 14% de ART (sendo 12,15% deste valor oriundo do hidrolisado), 2,62 g/L de ácido acético, 0,64 g/L de HMF 1,74 g/L de furfural, 4,0% v/v de etanol e pH = 4,8.

Para tal, cada um dos sete cruzamentos foram submetidos a transferências sucessivas em erlenmeyer com o meio seletivo para evolução com doses crescentes de etanol a 30°C por 24h.

Tabela 1 - Evolução adaptativa

Etanol final (%)	Meio seletivo
5	10 mL de inóculo em 54 mL de meio
5	10 mL de inóculo em 54 mL de meio
6	10 mL de inóculo em 54 mL de meio
7	5 mL de inóculo em 59 mL de meio
8	1 mL de inóculo em 63 mL de meio
8	1 mL de inóculo em 63 mL de meio
8	1 mL de inóculo em 63 mL de meio

Ao fim do enriquecimento do meio foi resgatado o material genético mediante isolamento de células de cada um dos cruzamentos, foi utilizado 10 µL de inóculo estriado em placa de petri contendo meio de micromanipulação. A placa então foi levada para o microscópio micromanipulador, e as células foram individualizadas e alocadas em posições distintas na placa. Os isolados (supostamente diploides) foram resgatados e armazenados conforme subitem 4.1.2.

Os isolados gerados, juntamente com as referencias BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1, foram reativados conforme descrito no subitem 4.1.3 e avaliados quanto ao crescimento em microplaca segundo subitem 4.3, foram feitas três repetições por diploide isolado. A seleção dos isolados foi feita mediante o maior ou igual valor de absorbância apos 24 horas em comparação com as parentais (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1).

4.8 Pré-fermentação com reciclo de células

A partir da triagem anterior os híbridos selecionados do cruzamento direcionado e linhagens selecionadas do cruzamento massal e as referencias PE-2 e SA-1, foram sujeitos a uma pré-seleção mediante fermentação utilizando o meio seletivo 14% de ART (sendo 12,15% deste valor oriundo do hidrolisado), 2,62 g/L de acido acético, 0,64 g/L de HMF 1,74 g/L de furfural, 4,0% (v/v de etanol e pH = 4,8). Devido a quantidade de linhagens foram divididos em 2 lotes. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em triplicata, em tubos de centrífuga com capacidade de 15 mL previamente identificados e tarados.

As linhagens, juntamente com as referencias PE-2 e SA-1, foram reativados conforme descrito no subitem 4.1.3. A propagação conteve, 100 µl de inóculo em 7mL de YEPD líquido, em seguida os tubos foram incubados por 24 horas a 30°C, esse processo foi realizado mais duas vezes para a obtenção maior de biomassa. Os tubos foram centrifugados e adicionados 7mL do meio seletivo. Após 8 horas de fermentação, as amostras foram retiradas da estufa e armazenadas em temperatura ambiente até o final do ciclo. Ao final da fermentação as suspensões foram homogeneizadas com o auxílio de bastão de vidro e retirados 0,2 mL para análise de viabilidade celular. A última seleção baseou-se a sua viabilidade celular em comparação com as estirpes parentais (PE-2 e SA-1). Ao final do terceiro ciclo, foram selecionadas 5 linhagens provenientes do cruzamento direcionado e 6 linhagens provenientes do cruzamento massal. As linhagens selecionadas foram armazenadas conforme subitem 4.1.2.

4.9 Propagação das linhagens

As linhagens previamente selecionadas foram divididas em dois lotes devido a quantidade de linhagens, totalizando 6 linhagens no Lote 1 juntamente com as referências PE-2 e SA-1, em triplicata, e 5 linhagens no Lote 2 juntamente com as referências PE-2 e SA-1 em triplicata.

As linhagens foram reativadas conforme subitem 4.1.3 e as propagações foram conduzidas em meio de melaço com 10% de ART acrescido de 0,25% de extrato de levedura (esterilizados a 121°C por 20 minutos) e incubados a 30°C com agitação (110 rpm) até o consumo total do açúcar. O volume de meio utilizado foi variável dependendo da quantidade de biomassa desejada. Normalmente cerca de 2-3g de biomassa úmida (com 25% de matéria seca) era obtida (coletada mediante centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos) a partir de 100mL de meio e melaço 10%.

4.10 Avaliação final das linhagens mediante fermentação com reciclo de células

Os ensaios fermentativos foram divididos em lotes, e foram realizados 5 ciclos fermentativos e as fermentações foram conduzidas utilizando substrato constituído de hidrolisado acrescido de melaço.

O Lote 1 conteve os híbridos dos cruzamentos direcionados entre SA94a x SA86a (isolado 233), BG71a x SA86a (isolado 244) e SA22a x PE2a (isolado 398), e linhagens dos cruzamentos massais entre PE2a PExSA (isolado D10), CATxPE (isolado F4) e CATxPExBGxSA (isolado G4) e as referências PE-2 e SA-1 o substrato conteve 15,2% de ART (sendo 20% deste valor oriundo do hidrolisado), pH 4,9 e acréscimo de inibidores (Tabela 1).

No Lote 2 conteve os híbridos dos cruzamentos direcionados entre SA84axBG71a (isolado 200) e SA84axBG33a (isolado 208) e linhagens dos cruzamentos massais entre CATxPE (isolado F23) e CATxPExBGxSA (isolados G2 e G8) e as referências PE-2 e SA-1 o substrato conteve 15,18% de ART (sendo 20% deste valor oriundo do hidrolisado), pH 4,9 e acréscimo de inibidores (Tabela 1).

Tabela 2 - Concentração de inibidores em cada ciclo fermentativo

	Inibidores	1° Ciclo	2° Ciclo	3° Ciclo	4° Ciclo	5° Ciclo
Lote 1	Furfural	2,01 g/L	2,01 g/L	1,08 g/L	1,98 g/L	3,56 g/L
	Ácido acético	3,07 g/L	3,07 g/L	3,07 g/L	3,96 g/L	5,51 g/L
	HMF	0,14 g/L	0,14 g/L	0,14 g/L	0,14 g/L	0,14 g/L
Lote 2	Furfural	2,01 g/L	2,01 g/L	2,01 g/L	2,01 g/L	2,01 g/L
	Ácido acético	3,07 g/L	3,07 g/L	4,12 g/L	4,12 g/L	4,12 g/L
	HMF	0,14 g/L	0,14 g/L	0,14 g/L	0,14 g/L	0,14 g/L

Foram conduzidos em triplicata com reciclo, em tubos de centrífuga com capacidade de 50 mL previamente identificados e tarados. O pé-de-cuba (inóculo) conteve 10 mL de uma suspensão da levedura (aproximadamente 3,5 g, para o primeiro ciclo fermentativo) simulando assim uma situação industrial de concentração na centrífuga de 70% de levedura. As alimentações se iniciaram pela adição de 28 mL de mosto constituído de melaço e hidrolisado previamente esterilizado. Essa alimentação foi gradativa sendo dividida em 3 partes onde cada parte foi adicionada a cada 2 horas. A alimentação é gradativa durante 4 a 6 horas e a fermentação finaliza com 6 a 10 horas. Isso é devido a uma breve simulação do processo industrial. Em seguida os tubos foram pesados e incubados em uma estufa a temperatura de 30°C. O desprendimento de CO₂ foi avaliado mediante as pesagens dos tubos a cada duas horas, para verificar a perda de peso pela eliminação do CO₂ produzido. Após 8 horas de fermentação, as amostras foram retiradas da estufa e armazenadas em temperatura ambiente até o final do ciclo. Os mostos foram preparados com ART de 15,18 – 15,2% resultando em teores de etanol entre 7-8% (v/v) no final dos ciclos das fermentações.

Ao final da fermentação que foram monitoradas por pesagens a cada 2 horas as suspensões foram homogeneizadas e retirados 0,2 mL para análise de viabilidade celular. Feito isso, a levedura foi separada do vinho mediante centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos, pesada, para obtenção da biomassa celular em g.L⁻¹ e ressuspensa novamente fazendo o pé-de-cuba.

O tratamento ácido foi realizado para os dois lotes. Esse tratamento consiste na diminuição do pH do pé-de-cuba pela adição de ácido sulfúrico para que este fique em torno de 2 a 3, e assim mantido por 1 hora.

Nos vinhos deleiturados de cada ciclo fermentativo foram determinados os teores de etanol, densidade, enquanto que nas leveduras os teores de biomassa e as viabilidades celulares. Entretanto, ao final do 3º ciclo foram dosados os valores de glicerol e açúcares residuais.

4.10.1 Determinação da biomassa úmida

Para realizar a determinação da quantidade de biomassa realizou-se a tara dos tubos antes de serem iniciadas as fermentações. Ao final de cada fermentação, o vinho foi separado do fermento mediante centrifugação (800 x g, por 20 minutos), e os tubos com a biomassa precipitada foram pesados. Dessa forma, por diferença foi estimado o teor de biomassa ao final de cada ciclo fermentativo.

4.10.2 Determinação do teor de etanol

Após centrifugação ao final de cada ciclo, os vinhos foram reservados e analisados a concentração de etanol e densidade, onde para etanol, 25 mL foram submetidos a um microdestilador Kjeldahl e destilados por arraste em vapor, recolhendo 50 mL em balão volumétrico. As amostras destiladas foram transferidas para um densímetro digital, marca ANTON PAAR, modelo DMA 48. Os valores da concentração obtida no aparelho foram multiplicadas por 2 para compensar a diluição realizada.

4.10.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular das linhagens de levedura foi determinada através de microscopia óptica, em objetiva de 40X, considerando a contagem de células viáveis, não viáveis e brotos viáveis presentes em retículos da câmara de Neubauer espelhada. Tal análise foi mediante coloração diferencial das células pela solução de eritrosina em tampão fosfato, onde células com alta atividade fisiológica não se coram, enquanto células mortas apresentam-se na coloração rósea (ALVES, 1994; BONNEU, 1991).

Após o final da fermentação, uma alíquota de 0,2mL foi retirada do vinho bruto e diluída com água esterilizada (1,8mL). Da amostra diluída utilizou-se 1 mL, juntamente com 1mL do corante (diluição final 20x), homogeneizou, e dessa mistura uma alíquota foi submetida à contagem.

4.10.4 Determinação de glicerol e açúcares residuais

A quantificação de glicerol e as concentrações de açúcares residuais (sacarose, glicose e frutose) foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando cromatógrafo de troca iônica (DIONEX – DX 300, Sunnyvale, CA, USA), equipado com coluna CarboPack 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⁻¹ (BASSO, et al, 2008).

4.10.5 Velocidade de fermentação

Para estimativa da velocidade da fermentação foram realizada pesagem dos tubos em intervalos de duas em duas horas durante todas as fermentações. As velocidades de fermentação referiram-se a massa de CO₂ liberado ao longo das horas.

4.10.6 Análises estatísticas

A fim de verificar diferenças significativas entre as linhagens selecionadas quanto à viabilidade (%), formação de biomassa (g) e produção de etanol (g L^{-1}), foram realizadas análises de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias de Tukey no software PAST, utilizando as médias referentes às triplicatas de cada linhagem. As médias foram consideradas diferentes ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (HAMMER et al., 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dissecação de tétrades e obtenção dos haploides

Buscou-se explorar o material genético de 4 linhagens *S. cerevisiae* (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1), selecionadas de ambiente industrial. Essas linhagens são resistentes e tolerantes aos vários estresses impostos durante a fermentação alcoólica industrial.

Quando células diploides de *S. cerevisiae* são colocadas em um meio pobre de nutriente, o seu crescimento vegetativo termina e as células formam esporos (BYERS, 1981), gerando assim os haploides com diferenças fenotípicas, aumentando a variabilidade genética o que permitiria a obtenção de variantes com características desejáveis.

Assim, as linhagens foram esporuladas visando a obtenção de variantes mais tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.

As linhagens BG-1 e SA-1 foram esporuladas pelo método de micromanipulação de tétrade e identificados, e juntamente com haploides previamente adquiridos de CAT-1, PE-2 e SA-1, totalizando 604 culturas haploides sendo 111 oriundas da BG-1, 89 da CAT-1, 92 da PE-2 e 312 da SA-1 (Figura 6).

Figura 6 – Crescimento e isolamento dos haploides na placa de Petri após dissecação e segregação das tétrades. Estria da cultura esporulada e colônias dos 4 esporos (a,b,c,d), isolados de um mesmo asco

A partir da obtenção dos haploides as 604 culturas foram avaliadas e submetidas a testes de avaliação de crescimento conforme descrito no subitem 4.3. A seleção dos haploides foi feita mediante o maior ou igual valor de absorbância após 24 horas em comparação com as parentais (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. Foram selecionados os haploides que obtiveram maior crescimento em comparação com os parentais (Figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12).

Figura 7 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens haploides derivadas da BG-1, tendo como referências (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 8 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens haploides derivadas de CAT-1 como referências (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 9 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens haploides derivadas de PE-2, tendo como referências (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 10 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens haploides derivadas da SA-1, tendo como referências (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 11 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens haploides derivadas da SA-1, tendo como referências (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 12 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens haploides derivadas da SA-1, tendo como referências (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

5.2 Cruzamento direcionado

Os haplóides selecionados a partir do resultado de crescimento em microplacas tiveram o “mating type” (MAT) determinado mediante cruzamento com cultura haploide de tipo sexual previamente conhecido (MAT a ou MAT α) (RAMÍREZ; PERÉZ; REGODO, 1998) e assim obteve-se diploides heterozigotos (FOWELL, 1996).

Todos os haplóides que apresentaram crescimentos superiores aos parentais (8 provenientes da linhagem SA-1, 4 provenientes da linhagem BG-1, 10 provenientes da linhagem PE-2 e 3 oriundos da linhagem CAT-1) foram empregados em 51 diferentes cruzamentos direcionados. Mediante micromanipulação isolou-se 30 zigotos de cada cruzamentos. Muitos zigotos não apresentaram crescimento, mas mesmo assim foram obtidos 398 culturas híbridas (Tabela 3).

A hibridização é destacada como uma técnica muito utilizada para gerar leveduras de vinho com características melhores de tolerância as condições adversas como estresse osmótico e etanólico. Mediante cruzamentos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*, os híbridos obtidos após esporulação, dissecação de tétrades e cruzamentos parecem ser melhores adaptados às situações típicas de fermentações em função da aquisição de determinadas propriedades fisiológicas de ambas as linhagens parentais (PEREZ-TRAVES et al., 2012).

A hibridação por conjugação de esporos igualmente foi empregada para se obter linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mais tolerantes à fermentação do vinho e com os atributos de floculação e ausência de formação de H₂S (sulfeto de hidrogênio), linhagens estas mais adequadas à produção de vinho espumante (ROMANO et al., 1985).

Os 398 híbridos foram avaliados e submetidos a avaliação de crescimento conforme citado no subitem 4.3, sendo selecionados aqueles com valores maiores ou iguais em relação aos parentais (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e levedura ITA de panificação, permitindo o resgate de 112 híbridos (Figuras 13, 14 e 15).

Tabela 3 – Relação e identificação dos híbridos obtidos mediante 51 cruzamentos direcionados (intra- e inter- linhagens parentais)

*linhagem testadora

Cruzamentos	Haploides com “mating type” definidos	Híbridos
1°	SA-1 20b (a) x SA-1 20a (α)*	1 a 11
2°	PE-2 6a (a) x PE-2 1a (α)	12 a 15
3°	PE-2 6a (a) x PE-2 1c (α)	16 a 27
4°	PE-2 6a (a) x PE-2 2a (α)	28 a 38
5°	PE-2 6a (a) x PE-2 2d (α)	39 a 48
6°	PE-2 6a (a) x PE-2 3a (α)	49 a 58
7°	PE-2 6a (a) x PE-2 6b (α)	59 a 70
8°	PE-2 6a (a) x PE-2 7c (α)	71 a 81
9°	PE-2 6a (a) x PE-2 7a (α)	82 a 93
10°	PE-2 6a (a) x PE-2 3c (α)	94 a 102
11°	BG-1 33a (a) x SA-1 48b (α)	103 a 104
12°	SA-1 94a (a) x SA-1 74a (α)	105 a 114
13°	SA-1 67a (a) x SA-1 48b (α)	115 a 123
14°	BG-1 71 a (a) x SA-1 48b (α)	124 a 132
15°	SA-1 94a (a) x SA-1 48b (α)	133 a 138
16°	SA-1 20b (a) x SA-1 48b (α)	139 a 148
17°	SA-1 20b (a) x SA-1 84a (α)	149 a 158
18°	SA-1 94a (a) x BG-1 18a (α)	159 a 170
19°	BG-1 71 a (a) x BG-1 18a (α)	171 a 181
20°	SA-1 94a (a) x SA-1 84a (α)	182 a 193
21°	BG-1 71 a (a) x SA-1 84a (α)	194 a 203
22°	BG-1 33 a (a) x SA-1 84a (α)	204 a 214
23°	SA-1 94a (a) x BG-1 23a (α)	215 a 224
24°	SA-1 94a (a) x SA-1 86a (α)	225 a 235
25°	BG-1 71 a (a) x SA-1 86a (α)	236 a 246
26°	BG-1 33 a (a) x BG-1 23a (α)	247 a 255
27°	BG-1 71a (a) x BG-1 23a (α)	256 a 264
28°	BG-1 33 a (a) x BG-1 18a (α)	265 a 274
29°	SA-1 20b (a) x CAT-1 11b (α)	275 a 279

Tabela 3 – Relação e identificação dos híbridos obtidos mediante 51 cruzamentos direcionados (intra- e inter- linhagens parentais) (continuação)

*linhagem testadora

Cruzamentos	Haploides com “mating type” definidos	Híbridos
30°	CAT-1 1a (a) x CAT-1 11b (α)	280 a 284
31°	CAT-1 7a (a) x CAT-1 11b (α)	285 a 290
32°	SA-1 20b (a) x PE-2 1c (α)	291 a 296
33°	SA-1 22a (a) x PE-2 1c (α)	297 a 301
34°	SA-1 22a (a) x CAT-1 11b (α)	302 a 307
35°	PE-2 6a (a) x CAT-1 11b (α)	308 a 313
36°	CAT-1 7a (a) x PE-2 1c (α)	314 a 317
37°	CAT-1 1a (a) x PE-2 1c (α)	318 a 323
38°	SA-1 22a (a) x PE-2 2d (α)	324 a 329
39°	CAT-1 1a (a) x PE-2 2d (α)	330 a 334
40°	SA-1 22a (a) x PE-2 3a (α)	335 a 340
41°	SA-1 20b (a) x PE-2 2d (α)	341 a 346
42°	CAT-1 7a (a) x PE-2 2d (α)	347 a 352
43°	SA-1 20b (a) x PE-2 2a (α)	353 a 357
44°	CAT-1 7a (a) x PE-2 3c (α)	358 a 362
45°	SA-1 22a (a) x PE-2 1a (α)	363 a 367
46°	SA-1 20b (a) x PE-2 1a (α)	368 a 373
47°	CAT-1 1a (a) x PE-2 1a (α)	374 a 378
48°	SA-1 20b (a) x PE-2 3c (α)	379 a 383
49°	SA-1 22a (a) x PE-2 3c (α)	384 a 388
50°	CAT-1 7a (a) x PE-2 3a (α)	389 a 393
51°	SA-1 22a (a) x PE-2 2a (α)	394 a 398

Figura 13 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens diploides tendo como referências os parentais (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 14 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica a 570nm (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens tendo como referências os parentais (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 15 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas das linhagens diploides tendo como referências os parentais (BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1) e ITA levedura de panificação. As linhagens em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

5.3 Cruzamento massal

A recombinação dentro de uma população selecionada amplia a diversidade genética da população mediante as novas combinações de linhagens, e pode, assim, melhorar o desempenho dos indivíduos dentro da população (ZHANG et al., 2002).

Assim, os 604 haploides derivados de BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 foram submetidos a cruzamentos massais envolvendo 2 linhagens diferentes e uma combinação envolvendo as 4 linhagens (Tabela 4), resultaram em cruzamentos intra- e inter linhagens.

Tabela 4 – Relação dos cruzamentos massais obtidos

Háploides	Cruzamentos
BGxSA	A
CATxBG	B
CATxSA	C
PExSA	D
PExBG	E
CATxPE	F
CATxPExBGxSA	G

A maioria dos estudos que aplicam “Genome Shuffling”, têm-se proposto uma maior tolerância a um fator de estresse industrialmente relevante no desempenho da fermentação, deste modo, linhagens de laboratório e linhagens industriais de *S. cerevisiae* foram melhorados para fenótipos, tais como tolerância ao etanol, termotolerância, tolerância ao ácido acético e melhor desempenho fermentativo, assim essas abordagens são promissoras para otimizar cepas para produção de bioetanol de segunda geração (ZHENG et al., 2011a, b).

Neste trabalho descrito na literatura foi utilizada a técnica de “Genome shuffling” combinada com evolução adaptativa, portanto, aproveitando o ciclo meiótico da levedura que permite o cruzamento entre um grande número de linhagens para geração de linhagens com diversas origens genéticas, os recombinantes foram isolados e posteriormente demonstraram um desempenho significativamente melhor do que o controle diploide em meio contendo HMF e combinação de HMF, ácido acético, e furfural. A tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado da biomassa lignocelulósica é de suma importância para a produção de biocombustíveis a partir desta matéria-prima renovável (CHENG; ALMARIO; KAO, 2015).

5.4 Evolução adaptativa/enriquecimento

Os produtos dos 7 diferentes cruzamentos massais foram submetidos à uma adaptação evolutiva ou enriquecimento em meio seletivo (constituído de hidrolisado e melaço adicionado de inibidores como ácido acético, etanol e furfural), no transcorrer de 6 transferências sucessivas (com adições de inóculo oriundo do crescimento anterior em meio novo) compreendendo cerca de 25 gerações. Nesta fase, embora não se descarte uma evolução (a despeito de um pequeno número de gerações) se esperava um enriquecimento da linhagem mais tolerante aos inibidores empregados. Assim o etanol crescente no meio potencializa os efeitos dos inibidores presentes no meio de hidrolisado, tentando simular as condições de reutilização de células (no processo com reciclos), buscando assim um fenótipo com múltipla tolerância.

Ao fim do último ciclo, foi realizado em microscópio micromanipulador o isolamento e resgate de 27 isolados de cada cruzamento, totalizando 189 isolados para posterior avaliação (Tabela 5).

Tabela 5 – Identificação das linhagens obtidas mediante cruzamento massal

Cruzamentos	Identificação dos isolados
A	A1 a A27
B	B1 a B27
C	C1 a C27
D	D1 a D27
E	E1 a E27
F	F1 a F27
G	G1 a G27

A evolução é um processo contínuo de variação genética e seleção fenotípica (ZHANG et al., 2002), tais procedimentos de evolução adaptativa são explorados com êxito para aumentar a resistência aos estresses gerados na fermentação alcoólica onde as leveduras são expostas a pressão osmótica, temperatura, pH, etanol, contaminação bacteriana entre outras (BAUER; PRETORIUS, 2000; ÇAKAR et al., 2005; QUEROL et al., 2003). Nesse caso pretendeu-se impor uma condição ainda mais estressante para a obtenção de linhagens com tolerância aos inibidores do hidrolisado de bagaço para a produção do etanol 2G quer por

evolução adaptativa (pouco provável) ou pelo enriquecimento de um híbrido com atributos de maior tolerância aos inibidores empregados.

Em um trabalho de Sipiczki (2011) cita que os resultados experimentais demonstram que as propriedades fisiológicas e genéticas de população de *S. cerevisiae* são relativamente instáveis, e permiti que as alterações genéticas e uma rápida adaptação ocorram freqüentemente durante o processo de fermentação.

Na evolução adaptativa em laboratório é realizada uma pressão seletiva (por exemplo, presença de hidrolisados lignocelulósicos) para selecionar linhagens com maior aptidão relativa, sendo esta uma técnica poderosa para geração de novas linhagens com fenótipos complexos (CHENG; ALMARIO; KAO, 2015; ALMARIO et al., 2013).

Existem relatos de que a adaptação evolutiva de *S. cerevisiae* para melhor tolerância ao 5-hidroximetilfurfural e ao furfural também foi realizada mediante a transferência seriada de culturas para um meio seletivo contendo os inibidores em concentrações crescentes, as linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes apresentaram melhores resultados em relação à tolerância (ÇAKAR et al., 2012).

A uma pressão seletiva apropriada (SAUER, 2001), as linhagens evoluídas se mostraram mais tolerantes aos inibidores presente no meio seletivo do que as linhagens controle (LIU; SLININGER; GORSICH, 2005).

Após a adaptação em condições adversas, as melhores linhagens predominantes têm maior probabilidade de ser dominante no processo devido à aquisição das características desejadas (QUEROL et al., 2003).

Assim, os 189 isolados gerados foram avaliados e submetidos a avaliação de crescimento conforme citado no subitem 4.3. A seleção dos isolados foi feita mediante o maior ou igual valor de absorbância após 24 horas em comparação com as parentais (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1).

Foram selecionados 6 linhagens de cada um dos 7 cruzamentos que obtiveram maior crescimento comparados com os parentais, totalizando 42 linhagens, que corresponderam as colunas de tonalidade mais escuras (Figuras 16 e 17).

Figura 16 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas dos isolados do cruzamento massal tendo como referência (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1). Cruzamentos A (BGxSA), B (CATxBG), C (CATxSA) e D (PExSA). Linhagens isoladas em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima etapa de seleção

Figura 17 – Crescimentos avaliados pela densidade óptica (DO_{570nm}) em 24 horas dos isolados do cruzamento massal tendo como referência (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1). Cruzamentos E (PExBG), F (CATxPE) e G (CATxPExBGxSA). Linhagens isoladas em destaque (barras mais escuras) foram escolhidas para a próxima seleção

5.5 Seleção prévia em fermentações com reciclo de células

A partir da triagem anterior as 112 linhagens selecionadas do cruzamento direcionado (Lote 1) e as 42 linhagens selecionadas do cruzamento massal (Lote 2), foram sujeitas a fermentações com reuso de células, durante 3 ciclos fermentativos empregando-se mosto com 14% de ART em meio seletivo de melaço e hidrolisado. Diante desta abordagem, foi possível selecionar, mediante viabilidade celular ao final do terceiro ciclo, linhagens com maior tolerância em relação aos inibidores, quando comparadas com as referências.

Sendo assim, foram destacadas 5 linhagens do cruzamento direcionado BG71a x SA84a (isolado 200), BG33a x SA84a (isolado 208), SA94a x SA86a (isolado 233), BG71a x SA86a (isolado 244) e SA22a x PE2a (isolado 398) que apresentaram viabilidade superior com 96,3%, 93,8%, 92,3%, 93,7 e 94,0% respectivamente em comparação com as referências SA-1 e PE-2 que obtiveram 78,0% e 67,0% respectivamente (Figuras 18 e 19). Simultaneamente foram selecionadas 6 linhagens do cruzamento massal PExSA (isolado D10), CATxPE (isolados F4 e F23), CATxPExBGxSA (isolados G2, G4 e G8), que apresentaram viabilidade superior com 88,57%, 89,20%, 94,44%, 88,89%, 95,77% e 92,36% respectivamente em comparação com as referências SA-1 e PE-2 que obtiveram 80,0% e 68,0% respectivamente (Figuras 20 e 21).

A presença de compostos inibidores como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), respectivos produtos da desidratação de pentoses e hexoses no meio seletivo é significativamente inibitórios sobre a levedura, e tem efeitos em seu metabolismo reduzindo assim a viabilidade celular (MODIG et al., 2002; SANCHEZ, 1988). A toxicidade dos inibidores depende da concentração, tipo de organismo fermentativo, e as condições de cultivo (pH, inóculo, temperatura) (CHANDEL et al., 2011). No presente trabalho as concentrações de inibidores nesse caso, a concentração imposta no meio seletivo já foram suficientes para a redução da viabilidade celular das linhagens parentais PE-2 e SA-1, enquanto as linhagens selecionados provenientes dos cruzamentos apresentaram tolerância notável.

As linhagens obtidas dos cruzamentos demonstraram superioridade no parâmetro da viabilidade celular, o que demonstra a eficiência da técnica de cruzamentos direcionado e massal. Em outro estudo também foi utilizado o método de cruzamento massal seguido de evolução adaptativa em laboratório, e os isolados demonstraram resistências aos inibidores do hidrolisado como ácido acético, furfural e HMF (ALMARIO et al., 2013).

A tolerância das leveduras no processo de reciclo fermentativo é altamente importante para uma linhagem industrial (BASSO et al., 2011), assim nesse trabalho a viabilidade final da levedura ao longo dos reciclos foi o principal parâmetro a destacar a superioridade das linhagens selecionadas.

Lote 1

Figura 18 – Valores percentuais de viabilidade celular (%) das linhagens do cruzamento direcionado ao final do 3º ciclo, em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1)

Figura 19 – Valores percentuais de viabilidade celular (%) das linhagens do cruzamento direcionado ao final do 3º ciclo. As leveduras selecionadas foram entre BG71a x SA84a (isolado 200), BG33a x SA84a (isolado 208), SA94a x SA86a (isolado 233), BG71a x SA86a (isolado 244) e SA22a x PE2a (isolado 398), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1)

Lote 2

Figura 20 – Valores percentuais de viabilidade celular (%) das linhagens do cruzamento massal ao final do 3º ciclo. As leveduras selecionadas dos cruzamentos massais foi entre PExSA (isolado D10) em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1)

Figura 21 – Valores percentuais de viabilidade celular (%) das linhagens do cruzamento massal ao final do 3º ciclo. As leveduras selecionadas dos cruzamentos massais foram entre CATxPE (isolados F4 e F23), CATxPExBGxSA (isolados G2, G4 e G8), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1)

5.6 Avaliação final das linhagens mediante fermentação com reciclo de células

As linhagens que apresentaram maior viabilidade celular quando comparados às linhagens parentais foram selecionadas e submetidas a um ensaio fermentativo com reciclo de células em triplicata, simulando tanto quanto possível o processo industrial, na busca de linhagens com maior tolerância ao mosto constituído por melaço e hidrolisado acrescido de furfural, ácido acético e etanol com o intuito de destacar linhagens com maior tolerância.

O total de linhagens selecionadas foram 11 e devido às limitações da metodologia essas linhagens foram divididas em dois lotes, com 6 linhagens no Lote 1 (isolados D10, F4, G4, 233, 244 e 398) e 5 linhagens no Lote 2 (isolados 200, 208, F23, G2 e G8). Estas linhagens foram avaliadas em relação às parentais no transcorrer de 5 ciclos fermentativos.

Como descrito no subitem 4.9 as linhagens iniciaram a primeira fermentação com aproximadamente a mesma quantidade de fermento 3,5 g. Os dados apresentados no Lote 1, (Figura 22) demonstram que a linhagem D10 apresentou maior produção de biomassa em todos os ciclos seguida das linhagens 244 e 233. Nos dois primeiros ciclos a linhagem D10 apresentou diferença significativa perante as outras linhagens demonstrando um maior acúmulo de biomassa 4,22g. A partir do 3º ciclo houve um decréscimo na produção de biomassa de todas as linhagens, o que tem relação com a viabilidade celular que também diminuiu proporcionalmente, assim no último ciclo a linhagem D10 obteve acúmulo de 3,82g de biomassa seguida das linhagens 244 e 233 que obtiveram acúmulo de 3,70g e 3,67g respectivamente, as mesmas não demonstraram diferenças significativas entre si, porém a linhagem D10 e 244 apresentaram diferença significativa em relação às referências PE-2 e SA-1, já a linhagem 233 apresentou diferença significativa apenas com a referência da PE-2.

Em relação ao Lote 2, (Figura 23), no primeiro ciclo as linhagens não apresentaram diferenças significativas. A partir do 4º ciclo houve um decréscimo de produção de biomassa, assim no último ciclo a linhagem 200 obteve acúmulo de 3,44g de biomassa seguida das linhagens G2, 208 e PE-2, com 3,37g, 3,35g e 3,23g respectivamente, as mesmas não demonstraram diferenças significativas entre si. Porém, no último ciclo, apenas a linhagem 200 apresentou diferença significativa com 3,44g de biomassa em comparação com a referência da SA-1 com 3,16g.

Devido aos fatores impostos no meio seletivo e pelo reciclo celular a produção de biomassa de todas as linhagens diminuiu, porém as linhagens parentais foram relativamente inferiores as linhagens selecionadas. As altas densidades celulares e reciclagem de células contribuem para a redução do crescimento das leveduras (BASSO et al., 2008). A reutilização celular reduz a necessidade de propagação intensa da levedura e assim menos açúcar é desviado para a formação de biomassa. Estima-se que o aumento de biomassa é em torno de 5 a 10% (em relação à biomassa inicial) durante um ciclo fermentativo, o que é suficiente para substituir as células perdidas durante a etapa de centrifugação (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

De acordo com alguns trabalhos, ácido acético e o furfural afetam negativamente o crescimento da levedura e na presença de ambos os compostos a diminuição foi superior à provocada pelos compostos individualmente (MYERS; MONTGOMERY, 1991). O furfural e o 5-hidroximetilfurfural afetaram o crescimento e o metabolismo das leveduras sendo o furfural mais inibitório na fermentação por *S. cerevisiae* (PALMQVIST et al., 1996).

Além disso, o tratamento ácido realizado nos ciclos, intensificou a ação tóxica do ácido acético, o que pode ter contribuído para uma queda na viabilidade. O efeito sinérgico entre diferentes inibidores demonstram um aumento no impacto negativo na taxa de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (LIU et al., 2004), o que retrata que linhagens provenientes dos cruzamentos são superiores as parentais, pois a produção de biomassa foi a mínima necessária para sobrevivência, não gerando redução significativa, resultando em linhagens superiores em relação ao parâmetro de viabilidade.

Em relação à produção de etanol, ao observar os dados do Lote 1, (Figura 24), é possível verificar que não houve diferenças significativas entre as linhagens quanto à produção de etanol nos diferentes ciclos fermentativos.

As análises estatísticas também não revelaram diferenças relevantes entre as linhagens neste parâmetro. No último ciclo a produção de etanol caiu provavelmente pela diminuição da viabilidade celular que foi afetada ainda mais no último ciclo pelos inibidores presentes no meio seletivo como furfural e ácido acético, com a morte das células a produção de etanol diminuiu assim como a produção de biomassa, nesse caso todas as linhagens reduziram a produção e os teores de etanol ficaram entre 8-8,2% (v/v).

Ao observar os dados do Lote 2, (Figura 25), é possível verificar no primeiro ciclo, que a linhagem 208 teve maior produção de etanol seguida das linhagens 200 e F23 não se diferenciando estatisticamente das linhagens parentais PE-2 e SA-1, já perante as demais linhagens as mesmas obtiveram diferenças significativas.

Nos outros ciclos fermentativos é possível verificar que não houve diferenças significativas entre as linhagens quanto à produção de etanol.

As análises estatísticas também não revelaram diferenças relevantes entre as linhagens neste parâmetro. No último ciclo a produção de etanol caiu provavelmente pela diminuição da viabilidade celular que foi afetada ainda mais no último ciclo pelos inibidores presentes no meio seletivo como furfural e ácido acético, com a morte das células a produção de etanol baixou assim como a produção de biomassa, nesse caso todas as linhagens diminuíram a produção e os teores de etanol ficaram entre 8-8,3% (v/v).

Durante o processo da fermentação alcoólica origina-se uma série de compostos como o seu produto etanol que é o metabólito produzido em maior quantidade, podendo ser tóxico em uma determinada concentração e é considerado o principal responsável pela redução da viabilidade celular das leveduras provocando alterações na camada lipídica da membrana celular, reduzindo também as atividades metabólicas agindo sinergicamente intoxicando a célula ocorrendo à morte (MULLER et al., 2007). Esse fato pode também ter sido relevante na diminuição da viabilidade celular no ensaio fermentativo durante os ciclos e assim faz com que as linhagens D10, 200, F23 e 208 sejam superiores diante desse parâmetro, pois a viabilidade celular foi maior.

Segundo Palmqvist et al. (1999), o efeito da interação dos compostos gerados no hidrolisado de cana contribuem para o elevado grau de inibição sobre a fermentação etanólica, o ácido acético e o furfural interage negativamente no crescimento da levedura e na produção de etanol (PALMQVIST et al., 1996).

Ao observar os dados do Lote 1, (Figura 26), as linhagens provenientes do cruzamento massal PExSA (isolado D10) e CATxPExBGxSA (isolado G4), obtiveram maior viabilidade celular em todos os ciclos em relação aos padrões, a linhagem D10 demonstra-se diferente de todas as outras linhagens e das referências. No último ciclo ela manteve-se com viabilidade de 86,0% enquanto as linhagens parentais SA-1 e PE-2 mantiveram-se com 68,9% e 66,7% respectivamente. Já a linhagem G4 manteve-se com 73,1% e a linhagem 233 manteve-se com 70,8% não diferindo estatisticamente da referência SA-1. Já a linhagem G4 diferiu significativamente da referência PE-2. A linhagem D10 conseguiu produzir consideravelmente o etanol igual as demais linhagens, e a produção de biomassa também foram maiores do que as demais linhagens, mas manteve a sua viabilidade celular alta demonstrando superioridade aos parentais.

Ao observar os dados do Lote 2, (Figura 27), as linhagens provenientes do cruzamento direcionado SA84axBG71a (isolado 200), seguido a do cruzamento massal entre CATxPE (isolado F23) e a do cruzamento direcionado entre SA84axBG33a (isolado 208), obtiveram maior viabilidade celular a partir do ciclo 2 em relação aos padrões.

No último ciclo as linhagens 200 e F23 são estatisticamente diferentes das referências PE-2 e SA-1, a linhagem 200 manteve-se com viabilidade de 75,2% e a linhagem F23 manteve-se com 75,0% enquanto a linhagem parental SA-1 manteve-se com 67,4% e PE-2 manteve-se com 65,5%. Já a linhagem 208 manteve-se com 73,8% não diferindo estatisticamente da linhagem parental SA-1. As linhagens 200 e F23 conseguiram produzir

consideravelmente o etanol igual as demais linhagens, a produção de glicerol também foi baixa, a produção de biomassa foi maior na linhagem 200 que obteve acúmulo de 3,44g, já na linhagem F23 a produção foi menor com 3,12g, o que indica um comportamento diferente da linhagem 200 apesar dos outros parâmetros estarem iguais. Tem sido relatado que o composto inibitório como o furfural reduz a viabilidade da levedura e a taxa de crescimento específico (BOYER, et al., 1992), diante desse segundo parâmetro a linhagem F23 sofreu mais com os estresses impostos no meio do que a linhagem 200, porém as duas linhagens mantiveram a sua viabilidade celular alta demonstrando superioridade aos parentais.

O principal indicador de estresse demonstrado pela levedura neste trabalho é a viabilidade celular, cujos os valores encontrados indicam que os compostos contidos no hidrolisado prejudicaram a viabilidade durante os ciclos fermentativos. No entanto, linhagens selecionadas provenientes dos cruzamentos direcionados e cruzamentos massal seguido de evolução adaptativa demonstraram superioridade em relação às linhagens padrões, o que demonstra a resistência maior aos inibidores.

Devido à presença de inibidores que afetam os micro-organismos como ácido acético, furfural e HMF, a atividade biológica e enzimática é menor, inibindo o crescimento e multiplicação das linhagens produtoras de etanol pelo efeito negativo na membrana celular (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; MODIG et al., 2002; KLINKE, THOMSEN, AHRING, 2004). Em outros trabalhos também relatam que o ácido acético inibe principalmente o crescimento e metabolismo permitindo a maior permeabilidade da membrana celular (CHANDEL et al., 2011).

A presença de ácidos orgânicos no meio resulta em um aumento no consumo de ATP pela levedura, nesse caso, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou desviado para manutenção de seu pH interno (NARENDRANATH et al., 2001).

Já os compostos fenólicos podem inibir a bioconversão de açúcares a etanol, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva (HEIPIEPER et al., 1994). Inibe também a replicação das células o que ocasiona menor taxa de crescimento (CHANDEL et al., 2011).

Furanos (furfurais e 5-HMF) em conjunto com ácido acético foram relatados altamente nocivos para o crescimento de micro-organismos (CHANDEL et al., 2011).

A reciclagem celular também impõe uma condição estressante para as linhagens, as células de levedura devem manter alta viabilidade no final de cada ciclo de fermentação a fim de ser capaz de lidar com o ciclo seguinte (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011), portanto as

linhagens obtidas também podem ser mais resistentes quando esses fatores de reciclagem e inibidores se juntam.

Em trabalhos vistos na literatura relatam que quanto maior a viabilidade das estirpes maior sua resistência no meio seletivo com inibidores como furfural (HEER; SAUER, 2008). Assim, afirma-se que as condições estressantes impostas afetam o metabolismo celular da levedura levando à perda de viabilidade celular e a capacidade de fermentação (BENJAPHOKEE et al., 2012). Mediante aos cruzamentos realizados e a obtenção de novas linhagens pode-se propor que as mesmas são multi-tolerantes aos estresses da fermentação do mosto de melaço e hidrolisado, sendo superiores as referências utilizadas.

Portanto, a viabilidade celular da levedura no controle da fermentação alcoólica é um dos aspectos mais importantes, pois a eficiência do processo fermentativo é dada em função direta da manutenção das células ativas dispersas no mosto quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo (PAVLAK et al., 2011; PASCHOALINI; ALCARDE, 2009).

A análise de produção de glicerol foi realizada no 3º ciclo. Ao observar os dados apresentados no Lote 1 (Figura 28), e Lote 2 (Figura 29), é possível verificar nesse parâmetro analisado que não houve diferenças significativas entre as linhagens quanto à produção de glicerol, apenas a linhagem proveniente do cruzamento direcionado 244 apresentou diferença significativa em relação a linhagem F4 com menor produção de glicerol.

Para sintetizar o glicerol, durante a produção anaeróbica de etanol, a levedura *S. cerevisiae* iria variar de 5% a 8% do açúcar fornecido no processo (NISSEN et al., 2000; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). A formação de glicerol representa uma perda indesejada de fonte de carbono, já que o objetivo é a produção de quantidades máximas de etanol (GUO et al., 2011). A levedura quando reduz o crescimento e a produção de glicerol passa a produzir maior quantidade de etanol (GUTIERREZ, 1989).

Portanto, é desejável que as linhagens produzam pouca quantidade de glicerol, assim o desvio de açúcar é mínimo e a produção de etanol maior.

A análise de açúcares residuais foi realizada no 3º ciclo para os 2 lotes. No mosto utilizado de melaço e hidrolisado continham açúcares como sacarose, glicose, frutose, e xilose. As leveduras avaliadas não consumiriam a xilose, que pela metodologia cromatográfica empregada não se distingui da glicose (estimadas como a soma dos dois açúcares). A glicose é preferencialmente utilizada pela *Saccharomyces cerevisiae* em comparação com a frutose, e portanto como o residual de frutose era menor que 0,03%, assume-se que os teores residuais de glicose sejam inferiores a este valor. Por outro lado os

teores de sacarose estavam abaixo de 0,02%, sugerindo que praticamente todo o açúcar foi metabolizados pelas leveduras, em coerência com os teores de etanol.

Ao final dos experimentos, foram obtidos 4 linhagens que demonstraram tolerância significativa em meio seletivo utilizado, sendo as linhagens D10 (PExSA) e F23 (CATxPE) provenientes do cruzamento massal seguido de evolução adaptativa e as linhagens 200 (SA84axBG71a) e 208 (SA84axBG33a) provenientes do cruzamento direcionado, as linhagens D10, 200 e 208 demonstraram diferença significativa em comparação com as linhagens parentais SA-1 e PE-2, já a linhagem F23 demonstrou diferença significativa apenas com a linhagem parental PE-2. Essas diferenças foram positivas demonstrando superioridade das linhagens selecionadas perante as linhagens parentais.

No trabalho de Miranda (2016), foram alcançados resultados satisfatório ao realizar cruzamentos direcionados e massais a partir de linhagens isoladas de destilarias, as linhagens selecionadas demonstraram melhor viabilidade celular sendo mais adaptadas ao processo fermentativo com reuso de células empregando hidrolisado e melaço como substrato quando comparadas a referência SA-1.

A característica principal apresentada pelos híbridos resultantes obtidos mediante hibridização foi o melhor desempenho em relação a viabilidade celular o que sugerem que estas linhagens estão mais adaptadas ao substrato proposto para geração de etanol de segunda geração (hidrolisado e melaço).

Lote 1

Figura 22 – Produção de Biomassa úmida (g) das linhagens dos cruzamentos massais entre PExSA (isolado D10) e CATxPE (isolado F4), CATxPExBGxSA (isolado G4), e dos cruzamentos direcionados entre SA86a x SA94a (isolado 233), SA86a x BG71a (isolado 244), PE2a x SA22a (isolado 398), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Lote 2

Figura 23 – Produção de Biomassa úmida (g) das linhagens dos cruzamentos direcionados entre SA84axBG71a (isolado 200) e SA84axBG33a (isolado 208) e dos cruzamentos massais entre CATxPE (isolado F23) e CATxPExBGxSA (isolados G2 e G8), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Lote 1

Figura 24 – Concentração de etanol (%v/v) dos vinhos delevedurados das linhagens dos cruzamentos massais entre PExSA (isolado D10) e CATxPE (isolado F4), CATxPExBGxSA (isolado G4), e dos cruzamentos direcionados entre SA86a x SA94a (isolado 233), SA86a x BG71a (isolado 244), PE2a x SA22a (isolado 398), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Lote 2

Figura 25 – Concentração de etanol (%v/v) dos vinhos delevedurados das linhagens dos cruzamentos direcionados entre SA84axBG71a (isolado 200) e SA84axBG33a (isolado 208) e dos cruzamentos massais entre CATxPE (isolado F23) e CATxPExBGxSA (isolados G2 e G8), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Lote 1

Figura 26 – Valores percentuais de viabilidade celular (%) das linhagens dos cruzamentos massais entre PExSA (isolado D10) e CATxPE (isolado F4), CATxPExBGxSA (isolado G4), e cruzamentos direcionados entre SA86a x SA94a (isolado 233), SA86a x BG71a (isolado 244), PE2a x SA22a (isolado 398), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Lote 2

Figura 27 – Valores percentuais de viabilidade celular (%) das linhagens dos cruzamentos direcionados entre SA84axBG71a (isolado 200) e SA84axBG33a (isolado 208) e dos cruzamentos massais entre CATxPE (isolado F23) e CATxPExBGxSA (isolados G2 e G8), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Figura 28 – Produção de glicerol (% = g/100 mL de vinho) das linhagens dos cruzamentos massais entre PExSA (isolado D10) e CATxPE (isolado F4), CATxPExBGxSA (isolado G4), e dos cruzamentos direcionados entre SA86a x SA94a (isolado 233), SA86a x BG71a (isolado 244), PE2a x SA22a (isolado 398), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

Figura 29 – Produção de glicerol (% = g/100 mL de vinho) das linhagens dos cruzamentos direcionados entre SA84axBG71a (isolado 200) e SA84axBG33a (isolado 208) e dos cruzamentos massais entre CATxPE (isolado F23) e CATxPExBGxSA (isolados G2 e G8), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

5.6.1 Velocidade de fermentação

A análise de velocidade de fermentação foi realizada em todos os ciclos, a partir de pesagens em intervalos de duas horas calculando-se o desprendimento de CO₂ ao longo de cada fermentação.

No Lote 1, (Figura 30), em todos os ciclos os dados não revelaram diferenças expressivas entre as linhagens quanto ao tempo de fermentação, apenas a linhagem do cruzamento direcionado entre PE 2a x SA 22a (isolado 398) obteve uma diferença mínima tendo uma menor velocidade de fermentação. Já nos ciclos 3, 4 e 5 a linhagem do cruzamento massal entre CATxPE (isolado F4) obteve também uma diferença mínima tendo uma menor velocidade de fermentação, já a linhagem do cruzamento massal entre PExSA (isolado D10) não reduziu a sua velocidade de fermentação. No Lote 2, (Figura 31), os dados não revelaram diferenças expressivas entre as linhagens quanto ao tempo de fermentação em todos os ciclos fermentativos.

Dados na literatura relatam que uma elevada velocidade de fermentação é de grande importância para a indústria, pois aumenta a eficiência na transformação de açúcar em etanol, gerando uma otimização no processo, reduzindo o tempo de fermentação e contaminação (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009). No presente experimento os valores de velocidade de fermentação (estimada pela evolução de CO₂) é coerente com os teores de etanol ao final das fermentação, confirmando que praticamente todas as linhagens fermentam bem os açúcares, sem diferenças significativas entre as mesmas.

Lote 1

Figura 30 – Velocidade de fermentação pelo desprendimento de CO₂ ao longo das 24 horas de cada ciclo. Linhagens dos cruzamentos massais entre PExSA (isolado D10) e CATxPE (isolado F4), CATxPExBGxSA (isolado G4), e linhagens dos cruzamentos direcionados entre SA86a x SA94a (isolado 233), SA86a x BG71a (isolado 244), PE2a x SA22a (isolado 398), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1)

Lote 2

Figura 31 – Velocidade de fermentação pelo desprendimento de CO₂ ao longo das 24 horas de cada ciclo. Linhagens dos cruzamentos direcionados entre SA84axBG71a (isolado 200) e SA84axBG33a (isolado 208) e linhagens dos cruzamentos massais entre CATxPE (isolado F23) e CATxPExBGxSA (isolados G2 e G8), em comparação com as linhagens parentais (PE-2 e SA-1)

6 CONCLUSÕES

A hibridização tanto mediante cruzamento direcionado como massal seguido de evolução adaptativa entre as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, é apropriado para a geração de grande variabilidade fenotípica.

As linhagens selecionadas apresentaram maior tolerância ao substrato formulado com melaço e hidrolisado de bagaço, contendo inibidores oriundos do melaço e do hidrolisado. O parâmetro que melhor diferenciou as linhagens foi a viabilidade celular, parâmetro este de crucial importância para uma fermentação com reciclo de células.

Os melhores híbridos selecionados, D10 (PExSA) e F23 (CATxPE), 200 (SA84axBG71a) e 208 (SA84axBG33a), devido às suas características de multi-tolerância, são bons candidatos para a fermentação das hexoses presentes no substrato empregado.

Tais linhagens híbridas igualmente se constituem em excelente material biológico para a inserção de atributos metabólicos que as permitam a fermentação da xilose, levando assim a um aproveitamento total dos açúcares presentes no substrato lignocelulósico.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de levedura para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa**. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 28 Maio 2014.
- ALMARIO, M.P.; REYES, L.H, KAO, K.C. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 110, p. 2616–2623, 2013.
- ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester Sussex, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- 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.
- ALVES, J.M.B.; MACRI, R.C.V. Second generation of ethanol: study of applications lignocellulosic materials lignin. **Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2013.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Piracicaba: IAA – Planalsucar, 1977. 95p.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol, In: SIMPÓSIO MICRORGANISMO EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS, 2013. Brasília: **Anais...** EMBRAPA, 2013. p. 42-59.
- ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; McCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, New York, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

AZEVEDO, J.L. de.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, C.M.L. Transgênicos e evolução dirigida. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 451-464, 2000.

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

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Amsterdam, v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008.

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

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.

BNDES. **Bioetanol de cana de açúcar Energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDS, 2008. 316p.

BAUER, F.F.; PRETORIUS, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, South Africa, v. 21, p. 27-51, 2000.

BERNDES, G.; HOOGWIK, M.; VAN DEN BROEK, R. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 25, p. 1-28, 2003.

BENJAPHOKEE, S.; HASEGAWA, D.; YOKOTA, D.; ASVARAK, T.; AUESUKAREE, C.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 379-386, 2012.

BOYER, L.J.; VEGA, J.L.; KLASSON, K.T.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in bath culture. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v.3, n. 1, p. 41-48, 1992.

BRUMM, P.J.; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. **Biotechnology Letters**, Surrey, v.10, p. 677-682, 1988.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, W.D.; SOUZA, A.P. Routes for cellulosic ethanol in brazil. **Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**, São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2014. 1990. p. 365-380.

BYERS, B. Cytology of the yeast life cycle. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R.(Ed.) **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***: life cycle and inheritance. Washington: **Cold Springer Harbor**; Cold Springer Harbor Laboratory, 1981. p.59-96.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, New York, v. 33, p. 146-212, 1992.

ÇAKAR, Z.P.; SEKER, U.O.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, n.5, p. 569-578, 2005.

ÇAKAR, Z.P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; YILMAZ, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 12, n.2, p. 171-182, 2012.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M, FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 44, p. 48-91, 2010.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W. L.C.; FELIPE, M.G.A, SILVIO, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2012, 15p. 2012.

CANILHA, L.; LACERDA, R.C.; RODRIGUES, B.; ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; FELIPE, A.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass Into Sustainable Products. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, Croatia, 2013. p.15-45.

CARCIERI, S.; CLARDY, E.; ZAHID, N.S. Analyzing the Ability of Modified Yeast to Ferment Xylose to Ethanol. An attempt to increase the ethanol yield from the fermentation of pentoses for the purposes of fuel use. **Worcester Polytechnic Institute**, Worcester, p. 1-50, 2010.

CARDONA, C.A.; SÁNCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process desing trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit. **Wood Science and Technology**, Berlin v. 26, p. 413-428, 1992.

CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro 1º parte – as leveduras. Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena (EEL), Departamento de Biotecnologia. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 25, 7p. 2006.

CAVALHEIRO, A.A.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 665-671, 2013.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol combustível**: uma oportunidade para o Brasil. Publicado em 2009. Disponível em: <http://www.cogen.com.br/paper/2010/Livro_Bioetanol_Cana_Acucar_2009.pdf> Acesso em: 23 jul. 2015.

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: Advancing the generation of ‘Biofuel’. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 1289-1303, 2011.

CHENG, C.; ALMARIO, M.P.; KAO, K.C. Genome shuffling to generate recombinant yeasts for tolerance to inhibitors present in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 37, p. 2193–2200, 2015.

CHENG, J.J.; TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 36, p. 3541–3549, 2011.

COOPER, K.F.; STRICH, R. *Saccharomyces cerevisiae* C-Type ciclina Ume3p/Srb11p is required for efficient induction and execution of meiotic development. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 1, p. 66-74, 2002.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 1 – Safra 2014/15, n.4 – Quarto Levantamento, Brasília, 2015. p. 1-29.

CARASCHI, J.C.; CAMPANA FILHO, S.P.; CURVELO, A.A.S. Preparação e Caracterização de Polpas para Dissolução Obtidas a Partir de Bagaço de Cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v.6, n.3, p. 24-29, 1996.

D’AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndsmills, v. 7, p. 191-196, 1991.

DE CARVALHO, G.G.; MONTEIRO, R.A.B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n.8, p. 47-54, 2011.

DE SOUSA, J.L.U.; MONTEIRO, R.A.B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 100-107, 2011.

DING, J.; HUANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, N.; YANG, D.; ZHANG, K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 253-63, 2009.

EIRIZ, M.F.S. **Caracterização molecular de estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae***. 2007.119p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, Berlin, v. 23, n. 11, p. 601-602, 1989.

FERREIRA-LEITAO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MOLINARI, H.B.C.; BONET, E.P.S. Biomass Residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valorization**, Berlin, v. 1, p. 65-76, 2010.

FOWELL, R.R. Life cycles in yeast. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The Yeasts**. New York: Academic Press 1996. p. 461–471.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on 72 glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 45, p. 210-217, 2009.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.

GIUDICI, P.; SOLIERI, L.; PULVIRENTI, A.M.; CASSANELLI, S. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 66, p. 622-628, 2005.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, New York, v. 101 p. 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science Direct**, Amsterdam, v. 315, p. 808-810, 2007.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DA VIS, R.W.; DUJON, B. FELDMANN, H.; GAUBERT, F.; HOHEISEL, H.D.; JACQ, C.; JONSTON, M.; LOUIS, E.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OUVÉ, S.G. Life with 6000 genes. **Science Direct**, Amsterdam, v. 274, n. 546, p. 563-567, 1996.

GONZÁLEZ, S.S.; BARRIO, E.; GAFNER, F.; QUEROL, A. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, p. 221–1234, 2006.

GONG, J.; ZHENG, H.; WU, Z.; CHEN, T.; ZHAO, X. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p. 996 – 1005, 2009.

- GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.
- GREIG, D.; LOUIS, E.J.; BORTS, R.H.; TRAVISANO, M. Hybrid speciation in experimental populations of yeast. **Science Direct**, Amsterdam, v. 298, n. 5599, p. 1773-1775, 2002.
- GUTIERREZ, L.E.; ANNICHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; STIPP, J.M.S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 34, n.2, p. 235-242, 1991.
- GUTIERREZ, L.E. **Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum***. 1989. 160p. (Livre Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, , 1989.
- GUO, Z. P.; ZHANG, L.; DING, Z. Y.; SHI, G. Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, Orlando, v. 13, n. 1, p. 49-59, 2011.
- GUPTA, R.; SHARMA, K.; KUHAD, C.; Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, p. 1214-1220, 2009.
- HAMMER, Ø; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Essex, v.4, p. 1-9, 2001.
- HABER, J.E. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 32, p. 561-599, 1998.
- HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUNG.; M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam ,v. 24, p.549-556, 2006.
- HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; BONT, J.A.M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, p. 409–415, 1994.
- HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. **Microbial Biotechnology**, Braunschweig, v. 1, n. 6, p. 497-506, 2008.
- HERMAN, P.K.; RINE, J. Yeast spore germination: a requirement for Ras protein activity during re-entry into the cell cycle. **The EMBO Journal**, Oxford, v.16, n. 20, p.6171–6181, 1997.

HINMAN, N.D.; SCHELL, D.J.; RILEY, C.J.; BERGERON, P.W.; WALTER, P.J. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 34/35, p. 639–649, 1992.

HIGGINS, V.J.; BELL, P.J.; DAWES, I.W.; ATTFIELD, P.V. Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4346 – 4348, 2001.

HOU, L. Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, p. 1084-1093, 2010.

NOGUEIRA, H.L.A. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 137p.

INGRAM, L.O.; ALDRICH, H.C.; CAUSEY, T.B.; MARTINEZ, A.; MORALES, F.; SALEH, A, UNDERWOOD, S.S.; YOMANO, L.P.; YORK, S.W.; ZALDIVAR, J.; ZHOU, S. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, p. 855–866, 1999.

JARDINE, J.G.; DISPATO, I.; PERES, M.R. **Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da Árvore de Conhecimento Agroenergia**. Campinas, SP: Embrapa Informática Agropecuária , 2009. 28p.

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

KLOCK, U.; MUNIZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE, A.S. **Química da madeira**. Curitiba:Editora, 2005. 86p.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 10-26, 2004.

KUMAR, P.; BARRET, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial Engineering Chemical Resource**, Washington, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

KNOP, M. Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 334, p. 599-606, 2011.

LALUCE, C.; LONGO, E.; SPONCHIADO, S.R.P.; CILLI, E.M.; GALLARDO, J.C.M.; MASIERO, M.O.C. A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais. **Bioenergia**: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. 1072p.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N-O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, p. 151-159, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principio de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 1995. 839p.

LENNARTSSON, P.R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, J.M. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, New York, v. 165, p. 3-8, 2014.

LEJA, K.; MYSZKA, K.; CZACZYK, K. Genome shuffling: a method to improve biotechnological processes. **BioTechnologia Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, Poznań, v. 92, n. 4, p. 345-351, 2011.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIN, H.V. Produção de etanol. In: BORZANI, W.; SCHIMEDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Ed.). **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v.3, p.1-43.

LIU, Z.L.; SLININGER, P.J.; GORSICH, S.W. Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanologenic Yeast Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121, n. 1, p. 451-460, 2005.

LIU, Z.L.; SLININGER, P.J.; DIEN, B.S.; BERHOW, M.A.; KURTZMAN, C.P.; GORSICH, S.W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 8, p. 345 – 352, 2004.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MARTIN, C.; JONSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 386-395, 2003.

MARTÍN, C.; KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 426-432, 2007.

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.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 631-650, jul./set. 2008.

MARULLO, P.; MANSOUR, C.; DUFOUR, M.; ALBERTIN, W.; SICARD, D.; BELY, M.; DUBOURDIEU, D. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, p. 1148 – 1160, 2009.

MCBRYDE, C.; GARDNER, J.M.; LOPES, M.B.; JIRANEK, V. Generation of Novel Wine Yeast Strains by Adaptive Evolution. **American Journal of Enology and Viticulture**, Califórnia, v. 57, p. 423-430, 2006.

MICHEL, A.C.S. **Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja**. 2007. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

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

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Análise da madeira de pinus oocarpa parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MODIG, T.; LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v. 363, p. 769-776, 2002.

MORTIMER, R.K.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, M. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. **Yeast**, Chichester, n. 10, v.12, p.1543-1552, 1994.

MORTIMER, R.K.; HAWTHORNE, D.C. Yeast genetics. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeast**, New York, v. 1, p. 386-460, 1969.

MORIN, A.; MOORES, A.W.; SACHER, M. Dissection of *Saccharomyces Cerevisiae* Asc. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 29, n. 27, p. 1-3, 2009.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, p. 673–686, 2005.

MYERS, G.L.; MONTGOMERY, S. A Comparison of Weights of Debris Extruded Apically by Conventional Filing and Canal Master Techniques. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 17, n. 6, p. 275-279, 1991.

MORRISON, F.B. **Feeds and feeding**. New York, 1959. 770p.

MUSSATO, S. L.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, New York, n. 93, p. 1-10, 2004.

MUSSATO, S. L.; TEIXEIRA, J.A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Badajoz, n. 2, p.1-11, 2010.

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 and Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p. 71-177, 2001.

NEIMAN, A.M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 69, p. 565-584, 2005.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.21, p. 231-241, 1997.

NUNES, R.M.; GUARDA, E.A.; SERRA, J.C.V.; MARTINS, A.A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

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**, Orlando, v. 2, p. 69–77, 2000.

NWAFOR, O.M.I. Emission characteristics of Diesel engine operating on rapeseed methyl ester. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 29, p. 119-129, 2004.

NYKO, D.; GARCIA, J.L.F.; MILANEZ, A.Y.; DUNHAM, F.B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 5-48, 2010.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

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

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 12, p. 19-35, 1977.

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

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N.Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and para-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v. 63, p.46–55, 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, p. 470-476, 1996.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V.E. A Study on the Fermentation Process in a Sugarcane Mill and an Optimization Proposal. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.

PAIVA, E.P.; LIMA, M.S.; PAIXÃO, J.A. Pectina: Propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Leioa, Bizkaia, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

PAVLAK, M.C.M.; ABREU-LIMA, T.L.; CARREIRO, S.C.; PAULILL, S.C.L. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 82-86, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, New York, v. 74, n. 69, p. 69-80, 2000.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2 ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. 524p.

PEREIRA, M.L.C.P da S.; CIOFFI, M.O.H.; YOORWALD, H.C.J.; PEREIRA, P.H.F. Preparação e Caracterização de Materiais Híbridos Celulose/ NbOPO₄.nH₂O a partir de Celulose Branqueada de Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 22, n. 1, p. 88-95, 2012.

PEREZ-TRAVES, L.; LOPES, C.A.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 102 – 111, 2012.

PEREIRA, F.C.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; CRUZ, P.B.S.; ROSA, C.A.; AYUB, M..A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, p. 4218-4225, 2011.

PERES, S. Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural. In SNPTEE Seminário nacional de produção e transmissão de energia elétrica. **Anais...** Foz do Iguaçu, 1999. 5p.

PEREZ-ORTÍN, J.E.; QUEROL, A.; PUIG,S.; BARRIO, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. **Genome Research**, New York, v.12, p. 1533-1539, 2002.

PÉREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J.M. Genetic improvement of nonGMO wine yeasts: Strategies, advantages and safety. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 45, p. 1-11, 2015.

PHILIPPIDIS, G.P.; SMITH, T.K. Limiting factors in the Simultaneous saccharification and Fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 51/52, p. 117-124, 1995.

MULLER, J.L.; PROTTI, K.L.; MACHADO, M.S.; LACERDA, L.L.V.; BRESOLIN, T. M.B.; PODLECH, P.S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lifte shaker. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 688-693, 2007.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; OLMO, M.L.D.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 3-10, 2003.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 863-871, 2003.

RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.; PRIETO, J.A. Engineering baker's yeast: room for improvement. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 237-244, 1999.

RAMBLA, M.A.O.; PRADA, A R.; COOPAT, T.S.; CARRACEDO, G.B. Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. **Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-açúcar**, Brasília, cap. 2.4, 1999. p. 49-55.

RAMÍREZ, M.; PERÉZ, F.; REGODO, J.A. A Simple and Reliable Method for Hybridization of Homothallic Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 5039–5041, 1998.

RANATUNGA, T.D.; JERVIS, J.; HELM, R.F.; McMILLAN, J.D.; WOOLEY, R. J. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 3/5, p. 240-247, 2000.

RAELE, R.; BOAVENTURA, J.M.G.; FISCHMANN, A.A.; SARTURI, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, Amsterdam 87, p. 205-223, 2014.

REVISTA FAPESP. **Álcool a partir do bagaço da cana**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br>. Acesso em: Maio 2014.

REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, New York, v. 4, n. 54, p. 1-18, 2011.

RODSRUD, G.; SJODE. M.L.A. History and future of world's most advanced biorefinery in **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 46, p. 46-59, 2012.

ROMANO, P.; SOLI, M.G.; SUZZI, G.; GRAZIA, L.; ZAMBONELLI, C. Improvement of a wine *Saccharomyces cerevisiae* strain by a breeding program. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1064-1087, 1985.

ROSSEL, C.E.V. Steam Explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, Campinas, p. 274-279, 2012.

ROSA, S.E.S.; GARCIA, J.L.F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 117-156, 2009.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, London, v. 33, p. 805-810, 1998.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v. 454, n. 14, p. 841-845, 2008.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TOMISIELLO, S.M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

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

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 13, p. 5270-95, 2008.

SANCHEZ, C.G.; LEAL, C.V.; CAVANI, C.S, SANCHEZ, E.M.S. Compósito de Resina de Poliéster Insaturado com Bagaço de Cana de Açúcar: Influência do Tratamento das Fibras nas Propriedades. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 3, p. 194-200, 2010.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, n. 5, p. 315-318, 1988.

SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.Q.; COLODETTE, J.L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CALDAS, C.S.; SOARES, F.E.F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H. DE; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHNEIDERMAN, S.J.; JOHNSON, R.W.; MENKHAUS, T.J; GILCREASE, P.C. Quantifying second generation ethanol inhibition: Design of Experiments approach and kinetic model development. **Bioresource Technology**, New York, v. 179, p. 219-226, 2015.

STELKENS, R.B.; BROCKHURST, M.A.; HURST, G.D.D.; GREIG, D. Hybridization facilitates evolutionary rescue. **Evolutionary Applications**, Québec, v. 7, n. 10, p. 1209-1217, 2014.

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E.; NICOLINO, M.P.; VOODERCKERS, K.; VERSTREPEN, K.J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 38, p. 947-995, 2014.

SCHUCHARDT, U.L.F.; RIBEIRO, M. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p.247-251, 2001.

SHERMAN, F. Getting Started with Yeast. **Methods in Enzymology**, New York, v. 350, p. 3-41, 2002.

SHI, D.; WANG, C.; WANG, K. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 36, p. 139-147, 2009.

SINGER, M.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 460-468, 1998.

SILVA, F.V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p. 1-134, 2012.

SIPIKZKI, M. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 996-1007, 2008.

_____. Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome - a review. **Annals of Microbiology**, London, v. 61, p. 85-93, 2011.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.; MEDEIROS, A.B.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.; FERRARA, M.A.; DE MORAES, L.M.; ARAÚJO, J.; TORRES, F.A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 13, p.4820-4825, 2010.

STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology Biotechnology**, Croatia, v. 42, n. 2, p.115-120, 2004.

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

TENGBORG, C.; STENBERG, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G.; LARSSON, S.; PALMQYIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 70/72, p. 3-15, 1998.

TORTORA, J.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 964p.

THOMPSON, D.A.; DESAI, M.M.; MURRAY, A.W. Ploidy Controls the Success of Mutators and Nature of Mutations during Budding Yeast Evolution. **Current Biology**, London, v. 16, p.1581–1590, 2006.

VAN MARIS, A.J.; ABBOTT, D.A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M.A.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VOLPE, P.L.O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, Campinas, v. 20, n. 5, 7p,1997.

XU, N.; ZHANG, W.; REN, S.; LIU, F.; ZHAO, C.; LIAO, H.; XU, Z.; HUANG, J.; LI, Q.; TU, Y.; YU, B.; WANG, Y.; JIANG, J.; QIN, J.; PENG, L. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus. **Biotechnology for Biofuels**, New York, v. 5, p. 58, 2012.

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

WIEMKEM, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leewenhoek**, Amsterdam, v. 58, p. 209-217, 1990.

WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, New York, v. 50, p. 3-16, 1994.

ZHANG, Y.X.; PERRY, K.; VINCI, V.A.; POWELL, K.; STEMMER, W.P.C.; CARDAYRE, S.B. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. **Nature**, London, v. 415, p. 6444-646, 2002.

ZAKRAJŠEK, T.; RASPOR, P.; JAMNIK, P. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism — characterization at cellular and proteome level. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 12, p. 2837-2845, 2011.

ZHENG, D. Q.; WU, X. -C.; TAO, X. -L.; WANG, P. -M.; LI, P.; CHI, X. -Q.; LI, Y. -D.; YAN, Q. -F.; ZHAO, Y. -H. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, n. 3, p. 3020-3027, 2011a.

ZHENG, D.Q.; WU, X.C.; WANG, P.M.; CHI, X.Q.; TAO, X.L.; LI, P.; JIANG, X.H.; ZHAO, Y.H. Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 38, p. 415 – 422, 2011b.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 6 – Viabilidade celular (%) mediante ensaios de fermentação com reciclo de células ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 1)

Linhagens	Viabilidade celular (%)				
	1°	2°	3°	4°	5°
PE-2	92,0	86,9	79,7	74,8	66,2
	93,9	87,9	78,8	72,0	66,5
	95,9	88,0	80,9	76,3	67,3
Média	93,0	87,4	79,3	73,4	66,4
Desvio padrão	2,0	0,6	1,1	2,2	0,6
SA-1	96,8	89,4	81,8	77,6	67,0
	93,2	94,0	84,5	75,6	71,3
	93,4	89,5	83,7	76,6	68,4
Média	94,5	91,0	83,3	76,6	68,9
Desvio padrão	2,0	2,6	1,4	1,0	2,2
D10	97,4	97,3	92,9	88,9	83,9
	97,0	97,0	94,3	88,5	85,5
	95,0	96,6	93,5	87,9	88,7
Média	96,5	97,0	93,6	88,4	86,0
Desvio padrão	1,3	0,4	0,7	0,5	2,4
F4	91,6	87,0	79,0	60,8	64,2
	91,9	86,0	82,7	74,5	65,5
	91,7	84,5	81,0	75,2	63,3
Média	91,7	85,8	80,9	70,2	64,3
Desvio padrão	0,2	1,3	1,9	8,1	1,1
G4	95,4	94,2	89,0	81,6	74,0
	93,2	93,9	87,0	80,8	70,0
	93,5	92,3	86,6	85,4	75,4
Média	94,0	93,5	87,5	82,6	73,1
Desvio padrão	1,2	1,0	1,3	2,5	2,8
233	95,0	87,5	80,9	79,2	72,9
	92,0	86,8	87,0	78,2	69,5
	94,0	86,6	81,5	78,7	70,0
Média	93,7	87,0	83,1	78,7	70,8
Desvio padrão	1,5	0,5	3,4	0,5	1,8

ANEXO A

Tabela 7 – Viabilidade celular (%) mediante ensaios de fermentação com reciclo de células ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 1 continuação)

Linhagens	Viabilidade celular (%)				
	1°	2°	3°	4°	5°
244	86,3	89,6	80,0	70,6	62,8
	87,5	85,0	73,0	70,2	60,5
	82,2	80,0	69,2	74,4	64,9
Média	85,3	84,9	74,1	71,7	62,7
Desvio padrão	2,8	4,8	5,5	2,3	2,2
398	84,4	77,6	69,0	62,0	58,3
	81,0	78,3	64,3	68,6	58,7
	83,6	72,4	70,0	60,8	58,6
Média	83,0	76,1	67,8	63,8	58,5
Desvio padrão	1,8	3,2	3,0	4,2	0,2

ANEXO B

Tabela 8 – Viabilidade celular (%) mediante ensaios de fermentação com reciclo de células ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 2)

Linhagens	Viabilidade celular (%)				
	1°	2°	3°	4°	5°
PE-2	99,7	93,8	75,0	74,2	65,4
	98,0	90,0	70,5	70,6	66,4
	97,0	90,0	72,0	70,4	64,6
Média	98,2	91,3	72,5	71,7	65,5
Desvio padrão	1,4	2,2	2,3	2,1	0,9
SA-1	98,9	94,8	77,2	70,3	68,0
	99,0	92,5	77,2	73,7	69,1
	98,5	91,0	82,6	70,6	65,0
Média	98,8	92,8	79,0	71,5	67,4
Desvio padrão	0,3	1,9	3,1	1,9	2,1
200	99,7	98,6	92,2	86,0	78,3
	100,0	99,6	95,7	88,0	72,8
	100,0	97,7	94,7	87,2	74,6
Média	99,9	98,6	94,2	87,1	75,2
Desvio padrão	0,2	1,0	1,8	1,0	2,8
208	99,7	98,0	92,8	81,3	72,6
	100,0	98,4	93,4	83,1	73,8
	100,0	98,9	91,6	85,5	73,2
Média	99,9	98,4	92,6	83,3	73,2
Desvio padrão	0,2	0,5	0,9	2,1	0,6
F23	99,4	98,5	90,6	76,5	73,2
	99,7	98,9	92,3	79,4	75,3
	99,7	98,9	92,3	82,7	76,4
Média	99,6	98,8	91,7	79,5	75,0
Desvio padrão	0,2	0,2	1,0	3,1	1,6
G2	99,4	98,8	95,3	82,9	68,6
	99,4	98,3	92,3	82,7	62,3
	100,0	98,2	93,2	83,5	70,8
Média	99,6	98,4	93,6	83,0	67,2
Desvio padrão	0,3	0,3	1,5	0,4	4,4
G8	98,0	95,9	88,4	80,5	64,5
	98,7	95,9	87,6	78,0	65,6
	98,0	96,8	88,7	77,0	68,1
Média	98,2	96,2	88,2	78,5	66,1
Desvio padrão	0,4	0,5	0,6	1,8	1,8

ANEXO C

Tabela 9 – Teor de biomassa, úmida centrifugada (g) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 1)

Linhagens	Biomassa (g)				
	1º	2º	3º	4º	5º
PE-2	3,89	3,88	3,62	3,54	3,42
	3,88	3,89	3,64	3,55	3,45
	3,90	3,88	3,63	3,54	3,43
Média	3,89	3,88	3,63	3,54	3,43
Desvio padrão	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
SA-1	3,85	3,87	3,66	3,55	3,44
	3,94	3,95	3,76	3,66	3,53
	3,91	3,93	3,76	3,68	3,57
Média	3,90	3,92	3,73	3,63	3,51
Desvio padrão	0,05	0,04	0,06	0,07	0,07
D10	4,22	4,18	3,96	3,87	3,76
	4,25	4,23	4,01	3,93	3,82
	4,26	4,26	4,05	3,97	3,88
Média	4,24	4,22	4,01	3,92	3,82
Desvio padrão	0,02	0,04	0,05	0,05	0,06
F4	3,83	3,75	3,50	3,41	3,33
	3,89	3,73	3,49	3,39	3,30
	3,86	3,71	3,47	3,35	3,27
Média	3,86	3,73	3,49	3,38	3,30
Desvio padrão	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03
G4	4,15	4,00	3,84	3,79	3,68
	4,04	4,03	3,80	3,74	3,63
	4,02	3,93	3,69	3,57	3,48
Média	4,07	3,99	3,78	3,70	3,60
Desvio padrão	0,07	0,05	0,08	0,12	0,10
233	4,07	4,00	3,82	3,70	3,61
	4,10	4,05	3,84	3,74	3,67
	4,11	4,06	3,87	3,81	3,73
Média	4,09	4,04	3,84	3,75	3,67
Desvio padrão	0,02	0,03	0,03	0,06	0,06

ANEXO C

Tabela 10 – Teor de biomassa, úmida centrifugada (g) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 1 continuação)

Linhagens	Biomassa (g)				
	1°	2°	3°	4°	5°
244	4,00	4,04	3,88	3,80	3,71
	3,98	4,00	3,83	3,74	3,66
	4,02	4,06	3,92	3,82	3,74
Média	4,00	4,03	3,88	3,79	3,70
Desvio padrão	0,02	0,03	0,05	0,04	0,04
398	3,81	3,66	3,43	3,38	3,34
	3,95	3,87	3,56	3,50	3,44
	3,94	3,89	3,63	3,58	3,50
Média	3,90	3,81	3,54	3,49	3,43
Desvio padrão	0,08	0,13	0,10	0,10	0,08

ANEXO D

Tabela 11 – Teor de biomassa, úmida centrifugada (g) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 2)

Linhagens	Biomassa (g)				
	1º	2º	3º	4º	5º
PE-2	3,33	3,60	3,60	3,35	3,17
	3,24	3,52	3,67	3,48	3,22
	3,35	3,50	3,70	3,52	3,30
Média	3,31	3,54	3,66	3,45	3,23
Desvio padrão	0,06	0,05	0,05	0,09	0,07
SA-1	3,44	3,55	3,42	3,17	3,09
	3,37	3,58	3,47	3,23	3,19
	3,40	3,60	3,45	3,27	3,20
Média	3,40	3,58	3,45	3,22	3,16
Desvio padrão	0,04	0,03	0,03	0,05	0,06
200	3,38	3,70	3,70	3,46	3,41
	3,48	3,66	3,72	3,53	3,46
	3,44	3,66	3,75	3,55	3,44
Média	3,43	3,67	3,72	3,51	3,44
Desvio padrão	0,05	0,02	0,03	0,05	0,03
208	3,55	3,59	3,54	3,39	3,33
	3,38	3,66	3,70	3,53	3,39
	3,39	3,63	3,68	3,52	3,32
Média	3,44	3,63	3,64	3,48	3,35
Desvio padrão	0,10	0,04	0,09	0,08	0,04
F23	3,39	3,58	3,58	3,30	3,14
	3,34	3,59	3,61	3,32	3,23
	3,14	3,42	3,48	3,17	2,98
Média	3,29	3,53	3,56	3,26	3,12
Desvio padrão	0,13	0,10	0,07	0,08	0,13
G2	3,46	3,69	3,74	3,39	3,35
	3,42	3,72	3,75	3,46	3,35
	3,42	3,72	3,74	3,46	3,40
Média	3,43	3,71	3,74	3,44	3,37
Desvio padrão	0,02	0,02	0,01	0,04	0,03
G8	3,41	3,58	3,48	3,19	2,90
	3,40	3,62	3,56	3,22	3,09
	3,43	3,68	3,54	3,22	3,04
Média	3,41	3,63	3,53	3,21	3,01
Desvio padrão	0,02	0,05	0,04	0,02	0,10

ANEXO E

Tabela 12 – Teor de etanol (% v/v) nos vinhos ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 1)

Linhagens	Etanol (%)				
	1°	2°	3°	4°	5°
PE-2	7,10	8,20	8,55	8,50	8,10
	7,20	8,20	8,55	8,50	8,15
	7,15	8,20	8,50	8,50	8,05
Média	7,15	8,20	8,53	8,50	8,10
Desvio padrão	0,05	0,00	0,03	0,00	0,05
SA-1	7,10	8,15	8,55	8,55	8,15
	7,10	8,15	8,50	8,45	8,10
	7,10	8,25	8,55	8,45	8,15
Média	7,10	8,18	8,53	8,48	8,13
Desvio padrão	1,1E-15	5,8E-02	2,9E-02	5,8E-02	2,9E-02
D10	7,15	8,20	8,55	8,55	8,25
	7,20	8,25	8,55	8,50	8,15
	7,10	8,15	8,50	8,45	8,15
Média	7,15	8,20	8,53	8,50	8,18
Desvio padrão	0,05	0,05	0,03	0,05	0,06
F4	7,15	8,25	8,50	8,50	8,20
	7,15	8,20	8,45	8,45	8,10
	7,15	8,20	8,50	8,45	8,10
Média	7,15	8,22	8,48	8,47	8,13
Desvio padrão	1,1E-15	2,9E-02	2,9E-02	2,9E-02	5,8E-02
G4	7,20	8,25	8,55	8,55	8,20
	7,15	8,25	8,55	8,50	8,15
	7,20	8,25	8,55	8,45	8,10
Média	7,18	8,25	8,55	8,50	8,15
Desvio padrão	0,03	0,00	0,00	0,05	0,05
233	7,10	8,20	8,55	8,50	8,20
	7,05	8,20	8,50	8,55	8,15
	7,15	8,20	8,55	8,50	8,10
Média	7,10	8,20	8,53	8,52	8,15
Desvio padrão	0,05	0,00	0,03	0,03	0,05

ANEXO E

Tabela 13 – Teor de etanol (% v/v) nos vinhos ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 1 continuação)

Linhagens	Etanol (%)				
	1°	2°	3°	4°	5°
244	7,00	8,10	8,55	8,55	8,10
	7,05	8,15	8,60	8,55	8,15
	7,00	8,15	8,45	8,50	8,10
Média	7,02	8,13	8,53	8,53	8,12
Desvio padrão	0,03	0,03	0,08	0,03	0,03
398	7,15	8,20	8,45	8,40	8,05
	7,05	8,20	8,45	8,50	8,10
	7,10	8,05	8,50	8,50	8,10
Média	7,10	8,15	8,47	8,47	8,08
Desvio padrão	0,05	0,09	0,03	0,06	0,03

ANEXO F

Tabela 14 – Teor de etanol (% v/v) nos vinhos ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (Lote 2)

Linhagens	Etanol (%)				
	1º	2º	3º	4º	5º
PE-2	7,70	8,20	8,35	8,5	8,20
	7,75	8,15	8,15	8,6	8,45
	7,70	8,15	8,30	8,5	8,30
Média	7,72	8,17	8,27	8,53	8,32
Desvio padrão	0,03	0,03	0,10	0,06	0,13
SA-1	7,60	8,20	8,30	8,5	8,25
	7,60	8,30	8,20	8,5	8,35
	7,75	8,15	8,25	8,5	8,30
Média	7,65	8,22	8,25	8,50	8,30
Desvio padrão	0,09	0,08	0,05	0	0,05
200	7,65	8,15	8,30	8,55	8,25
	7,55	8,00	8,45	8,55	8,25
	7,70	8,25	8,15	8,5	8,30
Média	7,63	8,13	8,30	8,53	8,27
Desvio padrão	0,08	0,13	0,15	0,03	0,03
208	7,80	8,15	8,25	8,5	8,30
	7,85	8,30	8,15	8,5	8,30
	7,80	8,30	8,30	8,45	8,35
Média	7,82	8,25	8,23	8,48	8,32
Desvio padrão	0,03	0,09	0,08	0,03	0,03
F23	7,80	8,35	8,36	8,5	8,25
	7,70	8,30	8,35	8,45	8,30
	7,65	8,20	8,30	8,5	8,35
Média	7,72	8,28	8,34	8,48	8,30
Desvio padrão	0,08	0,08	0,03	0,03	0,05
G2	7,60	8,25	8,40	8,55	8,30
	7,55	8,20	8,30	8,5	8,30
	7,50	8,20	8,25	8,5	8,25
Média	7,55	8,22	8,32	8,52	8,28
Desvio padrão	0,05	0,03	0,08	0,03	0,03
G8	7,60	8,30	8,40	8,55	8,25
	7,40	8,20	8,30	8,55	8,35
	7,55	8,25	8,25	8,50	8,25
Média	7,52	8,25	8,32	8,53	8,28
Desvio padrão	0,10	0,05	0,08	0,03	0,06