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

**Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica
usando processo de fermentação extrativa**

Alexandra Pavan Novello

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Alexandra Pavan Novello
Bióloga

**Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando
processo de fermentação extrativa**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

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

Novello, Alexandra Pavan

Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando processo de fermentação extrativa / Alexandra Pavan Novello. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

116 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fermentação alcoólica 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Seleção de leveduras
4. Pressão osmótica 5. Fermentação extrativa I. Título

CDD 660.62
N939i

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

DEDICATÓRIA

À DEUS

Agradeço infinitamente pela vida, saúde, força e toda dedicação.

DEDICO:

Aos meus pais Antonio Orlando e Neusa e minha irmã Adriana, que me ensinaram tudo
que sei de melhor

Ao meu amor Danilo, por ser tão especial em minha vida

COM TODO MEU AMOR E CARINHO.

Aos meus Familiares: Rodrigues da Silva, Medinilha, Pavan e Novello e também aos
amigos que sempre torceram e torcem pela minha felicidade e sucesso,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado. E a todos os professores que participaram dessa jornada.

Ao Prof. Dr Luiz Carlos Basso, pela orientação e pelos grandes ensinamentos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e recursos financeiros para o desenvolvimento do trabalho.

A banca examinadora pelas contribuições no trabalho.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira pela oportunidade de realizar os experimentos do meu doutorado.

Ao amigo Daniel Atala que sempre me incentivou e acreditou no meu trabalho e que me proporcionou a oportunidade de ingressar na área de fermentação alcoólica.

Aos amigos da ESALQ: Renata, Camila, Stefania, Thalita, Cometa, Elisa, Elisangela, Beto, Nathalia, Maria Fernanda... Por toda a ajuda.

Em especial aos amigos “fermenteiros” Juliana, Carolina, Ana Karina, Luciano e Júlio pela ajuda nos experimentos, discussões e que compartilharam as lutas e conquistas.

A Juliana, pela amizade, incentivo, discussões, revisões e grande ajuda nos dias e noites de fermentação.

Ao Nilton pelo grande conhecimento e ajuda no experimento da FEV.

Aos amigos do CTC, Rafael, Liliane, Godoy, Danilo, Mike, Célia, José Augusto, Eliano, Graciela, Sérgio, Cassiara, Noemia, Moises, Wokimar, Marcinha, Ana, Claudia e a toda equipe E2G, que compartilharam e compartilham os desafios e conquistas.

A Débora e Ana Teresa da empresa Genotyping pela ajuda nas análises de genotipagem.

Ao professor Anderson Cunha, pelos ensinamentos nos experimentos em placa e genotipagem.

A amiga Luciana pela ajuda nas análises estatísticas.

As minhas amigas queridas PP: Ana Luiza, Camila, Cristiane, Daiana e Kamila pela grande amizade e incentivo.

Aos amigos queridos Ana Teresa e Libardi, e Larissa e César pelo apoio, amizade e descontração.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

"Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tomam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tomam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tomam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tomam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... Tornam-se seu destino".

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Desafios científicos da produção de etanol no Brasil	19
3.2 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.3 A busca por linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> adequadas para a produção de etanol	21
3.3.1 Seleção de leveduras	22
3.4 Fermentação Alcoólica para produção de etanol	23
3.4.1 A essência da fermentação alcoólica	23
3.4.2 Fermentação Industrial	27
3.4.3 Produção de etanol via fermentação extrativa	28
3.5 Substrato fermentativo.....	29
3.6 Os estresses da fermentação industrial sobre as leveduras.....	30
3.6.1 Etanol.....	31
3.6.2 Pressão osmótica	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Origem e manutenção de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4.2 Seleção de leveduras pressão osmótica.....	34
4.2.1 Seleção de leveduras – aumento da concentração de melaço.....	35
4.2.2 Seleção de leveduras – aumento da concentração de vinhaça.....	35
4.2.3 Quantificação de açúcares, etanol e glicerol do mosto e do vinho	36
4.2.4 Determinação da viabilidade celular.....	36
4.3 Genotipagem – microssatélite (PCR - Polymerase Chain Reaction)	37
4.4 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em larga escala (microplacas).....	38
4.5 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em placas de Petri.....	39
4.6 Avaliação prévia das linhagens no transcorrer de fermentações com reciclo celular e o incremento da pressão osmótica com vinhaça.....	40
4.6.1 Multiplicação das leveduras.....	40
4.6.2 Fermentações.....	41
4.6.2.1 Reciclos fermentativos – 15 ciclos	41
4.6.2.2 Reciclos Fermentativos – 6 ciclos	42
4.6.2.3 Reciclos fermentativos para análise estatística - 3 ciclos	42
4.6.3 Análises dos resultados fermentativos	42
4.6.4 Quantificações de açúcares, etanol e glicerol.....	43
4.6.5 Viabilidade celular	43
4.6.6 Cálculo dos parâmetros de fermentação.....	43
4.6.7 Análise Estatística	43
4.7 Genotipagem - PCR	44
4.8 Montagem do sistema de extração a vácuo e avaliação do seu desempenho.....	44
4.8.1 Fermentador e o processo de fermentação	46

4.8.2 Tanque flash	46
4.8.3 Bomba de vácuo e sistema de condensação	47
4.8.4 Análises dos resultados fermentativos	51
4.8.5 Viabilidade celular	51
4.8.6 Quantificação de açúcares do mosto e vinho e glicerol	51
4.8.7 Determinação do etanol e rendimento fermentativo	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Seleção de leveduras	53
5.1.1. Aumento crescente da concentração de melaço	54
5.1.2. Aumento crescente da concentração de vinhaça	60
5.2 Genotipagem	65
5.2.1 Análise das populações de leveduras por marcadores microssatélites	65
5.3 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em microplacas	67
5.4 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em placa de Petri	70
5.5 Avaliação prévia das linhagens no transcorrer de fermentações com reciclo celular e o incremento da pressão osmótica com vinhaça	77
5.5.1 Reciclos fermentativos – 15 ciclos	77
5.5.2 Reciclos fermentativos – 6 ciclos	85
5.5.3 Reciclos fermentativos em triplicata	89
5.6 Confirmação do gênero das linhagens selecionadas	92
5.7 Fermentação Extrativa	93
6 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101

RESUMO

SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO COM ALTA PRESSÃO OSMÓTICA USANDO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

Processos fermentativos que visam um salto tecnológico na produção de etanol, que potencialize o processo fermentativo, destaca-se a fermentação extrativa a vácuo. Assim buscou-se selecionar linhagens tolerantes à alta pressão osmótica para serem empregadas em processo de fermentação extrativa. Foram realizadas seleções a partir de 444 cepas de leveduras oriundas da biodiversidade das Usinas Brasileiras, que fazem parte do banco de leveduras do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), tendo como base o meio formulado com melaço e vinhaça para simular a fermentação extrativa. A seleção se baseou em submeter as linhagens às fermentações em condições crescentes de estresse osmótico, buscando destacar linhagens com a tolerância desejada. Para tal, as linhagens em mistura foram submetidas à propagação durante 93 gerações em meios com crescentes quantidades de melaço e vinhaça. Em etapa seguinte, 90 cepas foram isoladas e avaliadas mediante o crescimento ($\mu_{\max}$ e biomassa) em condição de estresse osmótico e genotipadas. O método usado na genotipagem foi o PCR - microsatélite, o qual permitiu verificar se as cepas resultantes da seleção eram cepas industriais (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1) ou cepas selvagens e/ou predominantes. Foram utilizados 5 pares de primers representando 5 diferentes *loci*. A genotipagem e a avaliação do crescimento em condições de estresse osmótico, baseado em características genéticas e fisiológicas, permitiu identificar 24 linhagens com potencial de tolerância a pressão osmótica. As cepas com desempenho superior foram submetidas à avaliação de crescimento em placa e as sete mais tolerantes à pressão osmótica foram selecionadas e utilizadas em ciclos fermentativos empregando-se mosto constituído de melaço e vinhaça. A linhagem com as melhores características para a fermentação com alta pressão osmótica foi avaliada em condições de fermentação extrativa à vácuo. A linhagem selecionada, denominada de F1-5, mostrou-se com grande potencial para a fermentação extrativa quando comparada com a referência CAT-1.

Palavras-chaves: Fermentação alcoólica; *Saccharomyces cerevisiae*; Seleção de leveduras; Pressão osmótica; Fermentação extrativa

ABSTRACT

YEAST SELECTION FOR HIGH OSMOTIC PRESSURE FERMENTATION BY EXTRACTIVE FERMENTATION PROCESS

Fermentative processes that aim for technology innovations in the ethanol production, which improve the fermentative process, emphasizing the in vacuum extractive fermentation. So we have selected strains tolerant for high osmotic pressure to be in extractive fermentation process for ethanol production. We 444 yeast strains from Brazilian Mills biodiversity, which Sugarcane Technology Center's (CTC) yeast bank, based on a medium formulated with molasses and vinasse, to simulate the extractive fermentation. The selection was based on submitting strains to the fermentation in in high osmotic stress condition, trying to feature strains with desired tolerance, so, the mixed strains were submitted to propagation for 93 generations in medium with increasing amounts of molasses and vinasse. In the following step, 90 strains were isolated and evaluated by growth ($\mu_{\max}$ and biomass) in osmotic stress condition and genotyped. The method used in genotyping was the PCR - microsatellite, which enable to estimate if resulting selection strains were from industrial strains (BG-1, CAT-1, PE-2 and SA-1) or wild strains and / or prevalent. 5 pairs of primers were used representing 5 different loci. The genotyping and the growth evaluation in osmotic stress conditions allowed identify strains based on genetic and physiological characteristics, making possible to identify 24 strains with a potential tolerance to osmotic pressure. The strains with better performance were submitted to evaluation growth on boards and the 7 most tolerant to osmotic pressure were selected and used in fermentative recycles using medium containing molasses and vinasse. The strain with the best features in the fermentation in high osmotic pressure was evaluated in vacuum extractive fermentation conditions. The selected strain, named F1-5, proved to have a great potential for extractive fermentation when compared to the reference CAT-1.

Keywords: Alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, Yeasts selection, Osmotic pressure, Extractive fermentation

1 INTRODUÇÃO

O interesse mundial pelo desenvolvimento dos biocombustíveis aumentou em virtude da maior preocupação com o desenvolvimento de fontes energéticas renováveis e mais limpas, que permitam avançar na superação do atual paradigma, baseado nos combustíveis fósseis (BNDES; CGEE, 2008). Nesse cenário, destaca-se o Brasil, cujo programa de bioetanol de cana-de-açúcar apresenta resultados interessantes, desde a pesquisa de variedades de cana de maior rendimento até a fabricação de etanol.

No Brasil, a cana de açúcar se destaca, pela sua disponibilidade e custo, como principal meio utilizado na fermentação, pois se trata de uma fonte rica de carbono com elevada concentração de açúcares nas formas de sacarose, glicose e frutose, facilmente consumida por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, resultando na produção de etanol. A obtenção do etanol se dá pela via fermentativa, sendo que este é um processo utilizado há séculos para a produção de bebidas (STRATFORD, 1996).

Foi verificado em algumas usinas brasileiras, que as leveduras inoculadas no início do processo fermentativo, desaparecem do processo, sendo substituídas por outras leveduras durante o período da safra. Isso ocorre devido às condições estressantes e competitivas presentes na fermentação industrial, tais como: reciclo de células, alta concentração de etanol, alta temperatura, estresse osmótico devido à presença de açúcares e sais, acidez e contaminação bacteriana que favorecem o desenvolvimento de cepas mais resistentes, que entraram no processo principalmente pela matéria prima.

Por isso, leveduras selecionadas a partir do próprio processo fermentativo são hoje utilizadas nas usinas brasileiras (BASSO et al., 2008). Atualmente existem muitas pesquisas visando melhorar ainda mais o processo fermentativo, seja com leveduras melhoradas ou mesmo melhorias no sistema fermentativo. Uma técnica empregada no melhoramento de leveduras é a evolução adaptativa, que consiste no princípio da variação e seleção natural, onde as leveduras podem ao longo do tempo se adaptar ao ambiente (BASSO, 2011). Assim no processo de adaptação é possível impor condições desejáveis às leveduras, como exemplo alta pressão osmótica.

O etanol que se acumula no meio fermentativo inibe a atividade metabólica do microrganismo (LUONG, 1985). Estudos mostram que a utilização de processos de extração do etanol durante a fermentação, melhora o desempenho da atividade das leveduras (MAIORELLA et al., 1983)

A fermentação extrativa foi inicialmente proposta para a redução na toxidez do etanol, porém apresenta outras vantagens para uma fermentação industrial, utilização de meios fermentativos com alta concentração de substrato, sendo de grande interesse para a indústria, pois diminuem de forma significativa o volume das dornas e o volume de vinhaça quando comparado com os processos atuais. Além disso, devido a grandes quantidades de etanol no meio, consome menos energia no processo de extração. Como, esta alta concentração de etanol inibe o processo fermentativo, surge, a necessidade do etanol ser retirado do meio logo que é produzido através de um processo de extração (ATALA, 2004).

Dentre os processos fermentativos que visam melhorias na produção de bioetanol no país, que potencialize o processo fermentativo, destaca-se a fermentação extrativa a vácuo (ATALA, 2004). O passo limitante da fermentação extrativa é a disponibilidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que suportem a pressão osmótica do meio. Assim, o presente trabalho tem como principal foco a obtenção de linhagens apropriadas a esse tipo de fermentação, buscando características como alta resistência à pressão osmótica.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a seleção de linhagens para serem empregadas em processo de fermentação extrativa de produção de etanol, para isto os seguintes passos foram seguidos:

- Seleção de cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com características de tolerância à pressão osmótica para a utilização das mesmas na fermentação extrativa;
- Avaliação dos parâmetros fisiológicos e tecnológicos destas linhagens de leveduras selecionadas em condições de estresse osmótico induzido pela fermentação extrativa;
- Avaliação dos parâmetros tecnológicos da linhagem selecionada em condições de fermentação extrativa a vácuo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desafios científicos da produção de etanol no Brasil

Nas últimas décadas, tem se verificado um preocupante crescimento, principalmente associado ao uso intensivo de combustíveis fósseis, capaz de promover o incremento do efeito estufa na atmosfera terrestre e o consequente aquecimento global. Nesse sentido, os biocombustíveis apresentam duas importantes vantagens: seu uso permite reduzir a emissão de carbono para a atmosfera e, além disso, a produção de biomassa é potencialmente favorecida, dentro de limites e para algumas espécies, pela crescente disponibilidade de dióxido de carbono na atmosfera (BNDES; CGEE, 2008).

A produção de etanol recebe atenção global, porque pode ser obtido a partir de fontes renováveis (RAMOS et al., 2013). A produção de etanol combustível no Brasil a partir de cana-de-açúcar é um exemplo de sucesso de bioprocessos em grande escala, que proporciona um biocombustível a preços competitivos e de baixo impacto ambiental (DELLA-BIANCA et al., 2013).

A agroindústria do álcool representa um considerável gerador econômico. Como toda a produção de álcool ocorre por via fermentativa, é fundamental o conhecimento do processo fermentativo, que tem sido constantemente aprimorado. O processo de fermentação brasileiro é bastante incomum e desafiador já que as células de levedura são intensivamente recicladas, causando assim grande estresse as mesmas, resultando em uma densidade celular muito alta dentro do fermentador, que contribui para um tempo muito curto de fermentação. A concentração de etanol no final das fermentações variam de 8-11% (v/v) dentro de um período de 6-11 horas a 30-35°C (BASSO et al, 2008). Após a fermentação, as células de leveduras são recicladas, durante a safra de produção, em torno de 200 a 250 dias.

Por dia são realizadas de duas a três fermentações, com tratamento de ácido sulfúrico (pH 2,0-2,5) do creme de levedura (para reduzir a contaminação bacteriana) entre ciclos consecutivos, em um ambiente não asséptico, essas são algumas das características que tornam o processo de produção de etanol brasileiro bastante peculiar (DELLA-BIANCA et al., 2013; BASSO, et al., 2008). Assim é necessário selecionar leveduras que tolerem a esses impactos químicos e fisiológicos.

Pesquisadores estão investigando maneiras de melhorar o processo da produção de etanol. Segundo Basso et al., (2011) fermentações com alta concentração de etanol são desejáveis a fim de reduzir o consumo de água e custos de energia durante a etapa de destilação. Também é esperado que estas condições de fermentação irão favorecer o equilíbrio de energia do etanol produzido e melhorar a sustentabilidade do processo industrial. Entretanto, na maioria das destilarias, o teor final de etanol é limitado pela tolerância das cepas ao etanol.

Um outro desafio é a redução do volume da vinhaça. A vinhaça é caracterizada como efluente de destilarias com alto poder poluente e alto valor fertilizante; o poder poluente, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (FREIRE; CORTEZ, 2000). Alguns processos fermentativos, como a fermentação extrativa reduz o volume da vinhaça quando comparado com os processos atuais, pois utiliza meios com alta concentração de substrato, esse fator desperta grande interesse para a indústria (ATALA, 2004).

3.2 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas para produção de etanol, embora outras espécies de leveduras sejam também empregadas. A cepa selecionada deve crescer bem, produzir grande quantidade de etanol e apresentar alta tolerância ao produto sintetizado (PELCZAR, 1997). Pesquisadores tem consumido grande parte do tempo para selecionar e melhorar leveduras com essas características, principalmente para o ambiente industrial.

As células da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura (PELCZAR, 1997). Essa levedura trata-se de um fungo, unicelular, tipicamente esférico ou oval, não filamentoso. Reproduzem-se por brotamento, processo no qual, o núcleo duplica os cromossomos seguindo de divisão celular (mitose), mantendo o número de cromossomos da célula mãe. Além disso, uma levedura diplóide pode também ser originada através do cruzamento entre dois isolados haplóides. Estes haplóides devem obrigatoriamente ser opostos quanto à diferenciação

sexual, isto é, uma célula deve possuir o “mating-type” “a” e outra o “alfa”, gerando uma célula diplóide (CARVALHO NETTO, 2012).

3.3 A busca por linhagens *Saccharomyces cerevisiae* adequadas para a produção de etanol

Leveduras foram selecionadas a partir de Usinas localizadas no Estado de São Paulo, estas leveduras selvagens pertencem ao grupo *Saccharomyces* sensu stricto, denominadas de CAT-1 PE-2, SA-1 e BG-1. Os nomes destas linhagens correspondem a suas unidades originais. Assim a cepa CAT-1 foi isolada da unidade de Catanduva, pertencente ao Grupo Virgolino de Oliveira S/A Açúcar e Álcool, enquanto PE-2 é originalmente da Pedra Agroindustrial S/A, SA-1 da Usina de Santa Adélia S/A e BG-1 da Usina Barra Grande de Lençóis S/A (ANDRIETTA et al., 2011). Essas leveduras estão sendo produzidas em grande escala e comercializadas como inóculo para iniciar os processos de fermentação alcoólica há décadas.

A seleção de novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* é uma forma adequada para melhorar a produção de combustível em escala industrial. A obtenção de linhagens potencialmente resistentes aos estresses encontrados no processo de produção de etanol é uma estratégia para garantir a competitividade do processo fermentativo, assim como a eficiência do produto final, o etanol. Várias estratégias têm sido realizadas nesse sentido, como por exemplo, isolando e identificando linhagens selvagens com potencial a aprimorar os desafios do processo.

Um grande desafio encontrado nas usinas brasileiras de produção de etanol é a tolerância e permanência das leveduras iniciadoras durante toda a safra, pois nem sempre as linhagens introduzidas no início da safra continuam no processo, pois não resistem aos estresses do ambiente, sendo substituídas rapidamente por outras leveduras selvagens que nem sempre apresentam bons atributos fermentativos.

Encontra-se ampla biodiversidade de leveduras na fermentação industrial, cada usina com a sua própria população, assim linhagens dominantes são encontradas infreqüentemente, e ainda mais raro linhagens persistentes (BASSO et al., 2008). Assim é necessário isolar e selecionar leveduras para várias condições específicas, como por exemplo: alta concentração de etanol, alta pressão osmótica, dentre outras.

As linhagens PE-2 e CAT-1, selecionadas na década de 1990 (AMORIM et al., 2011), foram selecionadas de processos industriais por programa de seleção de

leveduras (BASSO et al., 2008). Essas cepas foram monitoradas usando a técnica de cariotipagem a partir das fermentações industriais, sendo avaliadas sob condições de laboratório e reintroduzidas em suas respectivas usinas durante sucessivos anos para provar suas habilidades fermentativas. Características tais como, dominância sobre outras cepas e permanência no processo durante a safra foram levados em consideração (AMORIM et al., 2011).

3.3.1 Seleção de leveduras

A produção de etanol apresenta várias barreiras que devem ser solucionadas, dentre elas a permanência e tolerância de leveduras durante toda a safra, sendo a seleção de cepas de leveduras com bons atributos fermentativos, capazes de sobreviver às condições industriais, um grande desafio. Assim se faz necessária a contribuição da seleção e do melhoramento de leveduras.

A seleção de células com tolerância para um específico fator de estresse pode partir de um conjunto de milhões de células, sendo selecionada pela sobrevivência ou crescimento (STEENSELS et al., 2014). A evolução adaptativa pode ser empregada para designar uma estratégia de melhoramento de microrganismos, baseada no princípio da variação e seleção natural, onde podem ao longo do tempo se adaptar ao seu ambiente. Assim, desde que seja possível impor a pressão seletiva adequada em laboratório, através de imposição de uma ou mais pressões seletivas, contando com a ocorrência de mutações e de seleção natural (BASSO, 2011).

O melhoramento de linhagens através da engenharia evolutiva baseia-se no princípio básico da variação genética (natural e/ou induzida). Geralmente, uma população de células é cultivada sob seleção por muitas gerações (divisões celulares). Com o passar do tempo, os mutantes aleatórios surgirão nesta população (STEENSELS et al., 2014) e podem ou não ter características mais relevantes que seus iniciadores. Devido ao curto tempo de geração, a manipulação e cultivo de microrganismos no laboratório, pela engenharia evolutiva é um caminho possível para gerar cepas de leveduras com fenótipos melhorados (ELENA; LENSKI, 2003).

Pesquisadores observaram que o polimorfismo observado entre cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser explicado em parte pela reorganização da estrutura cromossômica que ocorre durante a mitose. Concluindo que a reprodução assexuada permitiu rearranjos cromossômicos. Eles testaram cepas, que foram submetidas a várias transferências e depois de 55, 137, 275 e 412 gerações foram isoladas para a

análise de cariotipagem. Uma das cepas se apresentou idêntica a cepa original, independente do número de gerações. No entanto, outra cepa, apresentou alterações no cariótipo já com 55 gerações (LONGO; VEZINHET, 1993).

A obtenção de linhagens de leveduras evoluídas em laboratório é uma estratégia comprovadamente eficiente para diversas finalidades, na busca de um fenótipo desejado, por exemplo com maior tolerância a alta concentração de glicose. Assim, a pressão seletiva é imposta através do aumento gradativo da concentração de glicose. O fato é que uma população de microrganismos pode se duplicar num intervalo de poucas horas, sendo que após várias gerações, acaba sofrendo mutações e, dentro de um ambiente que confere pressão seletiva, passará também por seleção para indivíduos com melhores condições de desenvolvimento neste ambiente (BASSO, 2011).

Querol et al., (2003) relataram que na fermentação alcoólica para produção de vinho, geralmente realizado por espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, organismo altamente especializado evoluíram para utilizar seu potencial sob diferentes ambientes. Assim, durante a fermentação alcoólica, a levedura foi adaptada sob diferentes condições de estresse. Essa adaptação é chamada de “domesticação”. Durante a fermentação alcoólica, as leveduras são submetidas a diversas condições, dentre elas estresse osmótico e estresse alcoólico. A cepa que melhor e mais rápido se adaptar às mudanças no ambiente, tem maior probabilidade de ser uma linhagem dominante durante o processo de fermentação alcoólica.

3.4 Fermentação Alcoólica para produção de etanol

3.4.1 A essência da fermentação alcoólica

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir energia química necessária à sua sobrevivência e o etanol é um subproduto desse processo. A sacarose, açúcar da cana, é um dissacarídeo, que consiste em dois monossacarídeos glicose e frutose. A hidrólise da sacarose é frequentemente denominada de inversão, e os produtos da hidrólise são ditos de invertidos. A hidrólise de sacarose é catalisada pela enzima invertase (LEHNINGER, 1976a). O etanol é produzido a partir de monossacarídeos, glicose e frutose, assim a levedura precisa transformar a sacarose antes de ser utilizada como suprimento energético.

Segundo Carlson; Botstein (1982) a invertase tem sido caracterizada bioquimicamente, e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* vários genes responsáveis pela sua síntese têm sido caracterizados. Os genes da família SUC codificam esta enzima, sendo que o locus ancestral encontrado em todas as leveduras *Saccharomyces* é o denominado SUC2.

Muitos microrganismos, incluindo as leveduras do Gênero *Saccharomyces*, podem degradar monossacarídeos, especialmente glicose e frutose. Segundo Pelczar (1997), as principais etapas da glicólise são:

- 1) Duas moléculas de ATP (Adenosina Trifosfato) são utilizadas para a conversão da glicose a frutose-1,6-difosfato;
- 2) Quatro moléculas de ATP são produzidas por fosforilação em nível do substrato, sendo duas moléculas de ATP formadas durante a conversão de duas moléculas de ácido 1,3-difosfoglicérico a duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. As outras duas são produzidas durante a conversão de duas moléculas de ácido fosfoenolpirúvico em duas moléculas de ácido pirúvico;
- 3) No total 4 moléculas de ATP são produzidas, mas duas moléculas são utilizadas, então a produção líquida por molécula de glicose é de duas moléculas de ATP;
- 4) Em geral, no processo da glicólise, uma molécula de glicose, é clivada, originando duas moléculas de ácido pirúvico, cada uma com três átomos de carbono;
- 5) Uma molécula da coenzima NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) é utilizada para oxidar cada molécula de ácido-1,3-difosfoglicerídeo. Uma vez que duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são oxidadas, duas moléculas de NADH₂ são formadas.

Para que a glicólise continue, as células precisam regenerar continuamente o NAD a partir do NADH₂. Para que isso ocorra existem dois métodos: a fermentação (Figura 1) e a respiração (PELCZAR, 1997). A fermentação é um processo independente do oxigênio, as leveduras removem uma molécula de CO₂ do ácido pirúvico para formar acetaldeído que é utilizado pelas células para oxidar o NADH₂ o acetaldeído é reduzido a etanol, regenerando assim o NAD (PELCZAR, 1997). Uma molécula de glicose é desdobrada em duas moléculas de etanol (C₂H₅OH), um composto de dois carbonos, e em duas moléculas de CO₂ (LEHNINGER, 1917b) (Figura 1). Na presença de oxigênio, há um

deslocamento de parte do ácido pirúvico para o ciclo de Krebs, onde este será oxidado a dióxido de carbono e água (SOUZA, 2009).

Figura 1 – Regeneração do NAD a partir do NADH₂ na fermentação alcoólica

O que determina o caminho por alguma dessas rotas é a condição do meio, por exemplo, quando a glicose é fornecida em altas concentrações, independente da presença ou não de oxigênio a levedura segue a rota da fermentação. Esse fato é conhecido como efeito Crabtree, e ocorre por repressão catabólica das enzimas respiratórias (BREUNIG et al., 2000). Leveduras Crabtree-positivas, tais como a *Saccharomyces cerevisiae*, preferem a glicose para seguirem o caminho da fermentação (STEENSELS et al., 2014).

As etapas da fermentação alcoólica segundo (LEHNINGER, 1917b) são:

- 1) O piruvato é descarboxilado a acetaldeído e CO_2 pela enzima piruvato-decarboxilase;
- 2) A piruvato-decarboxilase requer Mg^{2+} e possui uma coenzima ligada firmemente, a tiamina-pirofosfato. A descarboxilação do piruvato se processa através de uma série de intermediários ligados covalentemente à tiamina-pirofosfato.
- 3) Na etapa final da fermentação alcoólica, o acetaldeído reduz-se a etanol, sendo o poder redutor fornecido pelo $\text{NADH} + \text{H}^+$, através da enzima álcool-desidrogenase.
- 4) A equação global da fermentação alcoólica pode, portanto ser descrita:
$$\text{glicose} + 2\text{P}_i + 2\text{ADP} \rightarrow 2 \text{ etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}.$$

3.4.2 Fermentação Industrial

Segundo Andrietta et al., (2011) a fermentação alcoólica industrial ocorre em três etapas básicas: fermentação, unidade de separação de células e tratamento de leveduras, para posterior reciclo das células. A fermentação, propriamente dita, ocorre nos fermentadores, onde açúcares são convertidos em etanol. A fermentação alcoólica industrial pode ser conduzida através de três processos: batelada, batelada alimentada (Melle-Boinot) e contínuo.

O processo de batelada, ocorre com a adição do mosto a dorna de fermentação, inoculando-se o fermento e espera-se até que o rendimento máximo tenha sido obtido. Encerra-se assim a fermentação e recupera-se o etanol por destilação (ALVES, 1996; STECKELBERG, 2001).

O processo de batelada alimentada, consiste em alimentar a dorna de fermentação por um determinado tempo, aproximadamente 4 horas, em uma concentração de mosto determinada, por exemplo 150 g/L de açúcares. Essa concentração normalmente ocorre em função da inibição das leveduras pelo substrato. Após o término da fermentação, o vinho levedurado é bombeado para a centrífuga, onde ocorre a separação do fermento. O creme de leveduras é diluído em água e passa por um tratamento ácido para eliminar contaminação de bactérias, depois do tratamento o fermento é utilizado em outro ciclo fermentativo. Esse processo pode apresentar uma produtividade três vezes maior do que o processo batelada (ALVES, 1996).

O processo contínuo requer alimentação de mosto e retirada de vinho contínuas, com vazões iguais. O vinho levedurado é submetido a separação das leveduras, e retornam ao fermentador, após tratamento ácido. O tempo de fermentação pode variar de 7 a 8 horas, dependendo da linhagem utilizada e da matéria-prima empregada (ANDRIETTA et al, 2011). Esse processo apresenta elevada produtividade, quando comparados aos de batelada. Uma das desvantagens é por apresentar constantes variações nas vazões de alimentação e nas concentrações de açúcares no mosto. Outra desvantagem é a maior contaminação bacteriana, devido ao uso contínuo do processo.

3.4.3 Produção de etanol via fermentação extrativa

Novos métodos de fermentação vêm sendo desenvolvidos para aumentar a produtividade do etanol. Segundo Luong (1985), o etanol que se acumula no meio fermentativo inibe a atividade metabólica do microrganismo. A utilização de técnicas de extração do etanol do meio fermentativo assim que ele é produzido, melhora o desempenho do processo. Nos últimos anos vários esquemas combinando fermentação com sistema de separação do etanol foram propostos: Ramalingham; Finn (1977), Cysewski; Wilke (1978), Maiorella et al., (1983) e Atala, (2004), utilizando fermentação sob vácuo.

O sistema que acopla o fermentador a um evaporador apresenta a maior quantidade de aspectos positivos, ajustado às unidades brasileiras, pois pode-se operar a uma temperatura que elimine a necessidade de trocadores de calor no estágio fermentativo, o que reduz drasticamente os custos fixos e de manutenção (SILVA,1997).

Segundo Atala (2004) a fermentação extrativa foi inicialmente proposta para a redução na toxidez do etanol, porém apresenta outras vantagens para uma fermentação industrial, como: redução de gastos energéticos (dispensa uma coluna de destilação) uma vez que o etanol produzido já apresenta cerca de 50°GL; redução ou eliminação dos trocadores de calor a placa para o controle de temperatura das dornas; aumento significativo da produtividade e projetos de fermentadores mais compactos e eficientes, além, principalmente, da redução do volume de vinhaça gerado, com grande impactos nos aspectos econômicos e ambientais. O uso do evaporador possibilita usar altas concentrações de açúcares no meio de alimentação do biorreator, o que tem como consequência maior produção de etanol.

Pesquisadores da Unicamp (Universidade Estadual de Campinas) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) realizaram estudos focados na otimização do processo de fermentação, utilizando vácuo para a extração contínua do etanol nos reatores e construíram juntos um sistema em escala piloto para a fermentação extrativa a vácuo. A tecnologia se baseia no acoplamento de um evaporador tipo flash, às dornas (reatores) de fermentação. Uma bomba a vácuo força a retirada do etanol contido no vinho, que é recolhido pelo evaporador a concentrações próximas a 50% de etanol em massa.

A remoção parcial do etanol durante o processo reduz o poder inibitório sobre as leveduras fermentadoras, expandindo o potencial de produção alcoólica, atingindo concentrações elevadas de etanol. O passo limitante da fermentação extrativa é a resposta fisiológica da levedura *S. cerevisiae* frente à alta pressão osmótica. Por isso o escopo deste

trabalho visa encontrar uma levedura mais tolerante ao efeito osmótico dentro das dornas de fermentação.

3.5 Substrato fermentativo

O melaço de cana é um subproduto da produção de açúcar, que é utilizado como fonte de açúcar na produção de etanol. Apresentando em sua composição água, carboidratos fermentescíveis, compostos não açúcares de origem orgânica (aminoácidos, vitaminas, proteínas) e minerais. O melaço apresenta 45 a 60% de sacarose e 5 a 20% de glicose e frutose (BASSO et al., 2011).

Fermentações a partir de mosto de melaço, apresenta maiores concentrações de matéria orgânica e minerais, comparadas com fermentações que utilizem caldo de cana como principal substrato.

A vinhaça é um resíduo obtido depois da destilação, sendo rica em minerais, tais como potássio, cálcio, magnésio, nitrogênio e fósforo (AMORIM et al., 2011).

Fatores adicionais podem agir sobre a levedura, afetando a performance da fermentação, como, a presença de níveis tóxicos de alumínio e potássio no meio. As condições ácidas de fermentação tornam o alumínio (absorvidos pela cana-de-açúcar em solo ácido) em sua forma tóxica (Al^{3+}), reduzindo a viabilidade da levedura, as concentrações de trealose celular e as taxas de fermentação com impacto negativo no rendimento do etanol (BASSO et al., 2004).

A composição mineral de substratos de cana-de-açúcar varia amplamente, dependendo da proporção de melaço usada para formular os meios, a variedade de cana de açúcar, sua maturidade, tipo de solo, clima e processamento de caldo de cana (Tabela 1) (Basso et al., 2011).

Tabela 1 - Composição Mineral de substratos à base de cana-de-açúcar e as concentrações recomendados para fermentação (Amorim; Leão, 2005)

Nutriente	Faixa de concentração * (mg/L)	Concentração ideal (mg/L)
Nitrogênio	70-350	100-300
Fósforo	20-200	50-250
Potássio	300-12.000	700-1.300
Magnésio	80-3.900	100-200
Enxofre	80-3.900	O mais baixo possível
Cálcio	150-2.000	O mais baixo possível
Zinco	0.45-9	1-5
Cobre	0.20-8	1-5
Manganês	2-8	1-5
Alumínio**	2-500	<10 (em caldo)

* Concentração do elemento; ** Não é um nutriente, mas um tóxico

3.6 Os estresses da fermentação industrial sobre as leveduras

Respostas ao estresse são de particular importância em microrganismos, cujo ambiente é altamente variável e condições como temperatura, osmolaridade ou disponibilidade de nutrientes estão longe de ser constante (ESTRUCH, 2000).

Na fermentação alcoólica industrial, as células de levedura são expostas a inúmeros estresses ambientais, incluindo o estresse osmótico, o etanol, baixo pH, todas as quais impõem limitações sobre o crescimento e viabilidade de levedura (BASSO et al., 2008; ZHAO; BAI, 2009). Enquanto outros são decorrentes do próprio metabolismo celular da levedura, como o acúmulo de etanol, podendo causar sua própria inibição de crescimento e da produção de etanol. Por tais razões muitas linhagens de *S. cerevisiae* empregadas não sobrevivem nas dornas de fermentação, sendo substituídas por linhagens selvagens, as quais normalmente se mostram com características fermentativas inadequadas (excessiva formação de espuma, intensa floculação e incapacidade de fermentar todo o açúcar do mosto).

A estratégia para seleção de linhagens adequada para fermentação de bioetanol no Brasil usa o próprio processo industrial com reciclo celular para impor pressão seletiva na população de leveduras selvagens. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

prevalentes e tolerantes à fermentação industrial foram selecionadas por aumentarem a performance da fermentação. Observa-se nas unidades industriais, ao longo da safra, uma enorme biodiversidade de leveduras selvagens, dentre as quais tem sido possível a seleção de linhagens com bons atributos fermentativos. Nos últimos 20 anos, linhagens selvagens das próprias dornas vêm sendo selecionadas por possuírem características de interesse e boa permanência nas dornas de fermentação, dentre as leveduras isoladas, destacam-se PE-2, CAT-1, BG-1 e SA-1, bastante utilizadas na produção de etanol pelas usinas brasileiras (BASSO et al., 2008).

Estudos realizados para selecionar leveduras de alta performance são de grande importância do ponto de vista biotecnológico e econômico, permitindo desenvolver estratégias de forma a incrementar o desempenho das linhagens de leveduras, tanto por modificações na condução do processo industrial, quanto desenvolvendo leveduras que possuam as características desejadas para a fermentação industrial.

3.6.1 Etanol

O etanol é um produto do metabolismo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A presença de alta concentração de etanol no meio de fermentação, reduzem consideravelmente a viabilidade celular. Esse efeito é o fator limitante para o aumento no rendimento da fermentação alcoólica.

Segundo Alexandrino, (2012) um dos fatores limitantes do processo de produção de etanol é a tolerância das leveduras hoje disponíveis para suportar o estresse de uma fermentação industrial com elevado teor alcoólico 13-16%, quando atualmente a média estaria ao redor de 8,0-9,0%. Luong (1984) cita que o etanol apresenta um efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular a concentrações acima de 15 g/L e a concentração de etanol a partir da qual as células não mais cresciam era aproximadamente de 100 g/L. E a capacidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* foi completamente inibida a partir de 115 g/L de etanol.

3.6.2 Pressão osmótica

Durante a fermentação alcoólica realizada por leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* há estresse formado por um conjunto de pressões biológicas, químicas e fisiológicas que afetam o crescimento celular e a formação de diferentes

produtos da fermentação. Segundo Ferea et al., (1999) um ponto importante a se considerar no processo de fermentação é a resposta fisiológica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente à concentração de açúcares presentes no meio. Enquanto as enzimas da via glicolítica, como vários outros genes, foram conservados durante a evolução de *Saccharomyces cerevisiae*, os mecanismos que controlam a metabolização das diferentes fontes de carbono e a produção de energia, se adaptam às necessidades de cada linhagem no setor industrial na qual estão inseridas.

As leveduras durante a fermentação alcoólica produzem além de etanol e gás carbônico, compostos secundários como glicerol, álcoois superiores, ácido pirúvico e succínico (GUTIERREZ, 1991). O estresse osmótico pode ser apontado pelas leveduras com aumento da concentração de glicerol durante a fermentação. A produção de glicerol pode sofrer influências durante a fermentação e podem ser observadas diferenças na concentração de glicerol entre diferentes linhagens, (GUTIERREZ, 1991). O glicerol produzido pelas leveduras apresenta função reguladora da célula ao estresse osmótico (MAGER et al., 2002). Isso também é verificado pelo acúmulo da trealose na célula sob alta pressão osmótica (BLOMBERG, 2000).

Em processos industriais, utilizando leveduras, essas são normalmente expostas a condições externas que podem ser diversas, tais como alta pressão osmótica ou acúmulo de etanol. Ao encontrar tais modificações, as células dinamicamente mudam os comportamentos de suas redes biológicas complexas, consistindo de genes, proteínas, metabolitos, e assim por diante (HIRASAWA et al., 2009).

A membrana citoplasmática é altamente afetada por fator de estresse, altas pressões osmóticas tendem a desestabilizar o equilíbrio composicional interno da célula dos organismos que garantem as funções celulares estáveis (homeostase celular) (JOHN et al., 2012).

No processo de fermentação extrativa as leveduras encontram durante o processo fermentativo alta pressão osmótica, devido a alta concentração de açúcares no mosto a ser fermentado, assim se faz importante selecionar linhagens que tolerem essa alta pressão osmótica e apresentem bons atributos fermentativos, como alto rendimento fermentativo.

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) da Universidade de São Paulo e no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), no Laboratório de Biotecnologia Industrial – LABIN.

A seguir é apresentado o fluxograma (Figura 2), com as principais etapas do desenvolvimento do trabalho.

Figura 2 - Fluxograma das etapas do desenvolvimento do trabalho

4.1 Origem e manutenção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram estudadas quanto à tolerância a pressão osmótica para a fermentação extrativa. Sendo utilizadas no estudo 444 linhagens retiradas do banco de leveduras do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) das safras 2007, 2008, 2009, 2010 e 2011 e como controle as linhagens padrões BG-1, SA-1, PE-2 e CAT-1. Todas as cepas foram mantidas em glicerol a 20% sob congelamento a -80°C.

4.2 Seleção de leveduras pressão osmótica

Foi utilizada técnica de fermentação sob condições controladas para avaliação do desempenho de cepas de leveduras. Segundo a metodologia de Alexandrino (2012), a técnica consiste em colocar dentro de um Erlenmeyer, diversas cepas sob diferentes condições de estresse, como crescentes concentrações de ART (açúcares redutores totais) e com isso realizar transferências sucessivas, utilizando em cada nova transferência 1mL de meio contendo as leveduras para a transferência seguinte, aumentando assim gradualmente a condição de estresse para a população de leveduras. Deste modo, as cepas que tolerarem as condições de interesse permaneceram no sistema, e as menos adaptadas vão sendo extintas com o passar das transferências.

As cepas foram submetidas ao estresse osmótico com diferentes concentrações de melaço, coletado da Usina São Manoel e vinhaça, coletada da Usina Itacema, divididos em diferentes frascos para melhor aproveitar a biodiversidade disponível, sendo:

- Frasco 1: 100 cepas da safra 2007;
- Frasco 2: 100 cepas da safra 2008;
- Frasco 3: 100 cepas da safra 2009;
- Frasco 4: 100 cepas da safra 2010;
- Frasco 5: 40 cepas da safra 2011 e
- Frasco 6: 4 cepas como referência (controle) (PE-2, BG-1, SA-1 e CAT-1).

As cepas utilizadas foram ativadas em 100 mL de meio YEPD líquido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, em água destilada) contidos em Erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados com ajuda de alça de platina uma alçada de biomassa de

cada cepa. Cada frasco foi incubado por 48 horas a 32°C para crescimento e em seguida utilizadas nos experimentos.

4.2.1 Seleção de leveduras – aumento da concentração de melaço

Inicialmente as cepas foram submetidas em meios com crescentes concentrações de ART, vindos do melaço de cana, perfazendo 6 transferências, sendo cada transferência as concentrações aproximadas de: 12-13%, 15-16%, 20-21%, 22-23%, 24-25% e 25-26% (m/m) de ART, respectivamente. O mosto foi preparado com melaço e diluído com água até a concentração desejada, sendo 100 mL armazenado em Erlenmeyer de 250mL e esterilizados sob 121°C durante 15 minutos. O tempo de crescimento das leveduras foi de 48 a 96 horas, mantidos sob 32°C, sem agitação. Após o final do cultivo, 1mL de meio contendo as leveduras de cada Erlenmeyer foi utilizado para iniciar a transferência seguinte. Assim até finalizar as 6 transferências.

4.2.2 Seleção de leveduras – aumento da concentração de vinhaça

As cepas resultantes do estresse com aumento gradativo de ART conforme citadas anteriormente, foram submetidas em mais 8 transferências, com estresse osmótico pela adição de vinhaça, em diferentes concentrações, sendo sucessivamente 13%, 26%, 39%, 53%, 66% e 75% (v/v) de vinhaça e a concentração de ART (melaço) mantida em aproximadamente 16 % (m/m). A concentração com 75% de vinhaça foi repetida por mais duas transferências. O tempo de cada cultivo foi de 76 a 91 horas, mantidos a 32°C, sem agitação. Após o final do cultivo, 1mL de meio contendo as leveduras foi utilizado para iniciar a transferência seguinte.

A porcentagem de fermento observada ao final de cada transferência por centrifugação de 10 mL de mosto levedurado e, a quantidade de biomassa foi calculada observando o volume celular no tubo graduado.

As cepas foram isoladas com o intuito de recuperar e preservar as linhagens, após o procedimento de adaptação. Essas amostras foram diluídas e plaqueadas em meio YEPD sólido (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% de ágar) com os agentes antibacterianos cloranfenicol e tetraciclina (100 mg/L cada). As placas foram incubadas sob 32°C por 48 horas. Após o crescimento, 15 colônias de cada lote, totalizando 90 cepas

foram isoladas e crescidas em 5 mL de meio YEPD a 30°C por 48 horas e mantidos em glicerol 20% sob refrigeração a -80°C.

4.2.3 Quantificação de açúcares, etanol e glicerol do mosto e do vinho

Foram determinados a quantidade de ART presente no melaço e mosto e em cada cultivo foram avaliados a formação de glicerol, açúcares residuais e produção de etanol.

As substâncias quantificadas foram: sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol. Esses componentes foram quantificados por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) Waters – Alliance, modelo – e2695 equipado com coluna Aminex – HPX87H (BioRad) e detector I.R. – Waters 2414, utilizando fase móvel H_2SO_4 (0,005M). O equipamento foi operado com temperatura do forno de 30°C, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e tempo de análise de 30 minutos.

Durante o experimento, foi realizado a quantificação de glicose e sacarose por analisador bioquímico rápido (YSI - 2900), que serviu como parâmetro qualitativo durante as fermentações. As amostras foram preparadas por diluição conforme curva de calibração do equipamento.

4.2.4 Determinação da viabilidade celular

Foi avaliada a viabilidade celular estimada ao final de cada cultivo mediante microscopia óptica através de coloração diferencial de células, usando como corante solução de azul de metileno (azul de metileno 0,025%, cloreto de sódio 0,9%, cloreto de potássio 0,042%, cloreto de cálcio 0,048%, 0,02 bicabornato de sódio, glicose 1% e água destilada). As células vivas, não coradas, e as mortas, coradas de azul, foram contadas em Câmara de Neubauer. A viabilidade foi expressa em porcentagem, em função da proporção de células vivas sobre o total de células (vivas e mortas).

4.3 Genotipagem – microssatélite (PCR - Polymerase Chain Reaction)

As 90 cepas isoladas, foram genotipadas para identificar se as cepas resultantes do experimento de pressão osmótica seriam cepas selvagens ou cepas industriais (PE-2, CAT-1, BG-1 e SA-1). Por este método também foi possível observar a existência de cepas prevalentes, ou seja, que predominaram após a seleção por pressão osmótica. O método usado para a genotipagem foi o de PCR (Polymerase Chain Reaction) - microssatélite, o qual permite identificar as cepas resultantes da seleção como cepas industriais ou cepas selvagens.

Para a obtenção do DNA das leveduras isoladas foi utilizado o método proposto por Howell et al., (2004) com algumas adaptações propostas por Antonangelo (2012). Uma colônia de levedura isolada em meio sólido foi coletada com alça de platina, transferida para micro-tubo estéril contendo 50 µL de água ultra-pura autoclavada, homogeneizada vigorosamente por 15 segundos com o auxílio de vórtex e centrifugada à velocidade máxima por 15 segundos. A seguir cada amostra foi mantida em freezer -80° C por 15 minutos. Após o período de congelamento as amostras foram incubadas a 80°C por 20 minutos em banho-maria e então homogeneizadas no vórtex por 15 segundos e centrifugadas a velocidade máxima por 15 segundos. Os sobrenadantes foram transferidos para micro-tubos e armazenadas em freezer a -20° C.

Para a amplificação dos *loci* microssatélite foram utilizados oligonucleotídeos de propriedade da empresa Genotyping Biotecnologia Ltda, Botucatu-SP. As reações de PCR contendo 20 µL foram constituídas de 4 µL da preparação de DNA, 10 µL de *GoTaq Colorless Master Mix* 2X (Promega, USA), 1 µM de cada oligonucleotídeo *forward* e 1 µM de cada oligonucleotídeo *reverse* específico para cada *locus* microssatélite e água ultra pura estéril suficiente para 20 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador *Biometra TGradient Thermal Cycler* (USA) sob as seguintes condições: 5 minutos a 94°C; 14 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C (decrecendo 1°C por ciclo até 47°C) e 30 segundos a 72°C; 25 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C e 30 segundos a 72°C, além disso; uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

A amplificação dos *loci* microssatélite foram analisados em sistema de eletroforese capilar *QIAxcelAdvanced* (Qiagen, Alemanha) usando o capilar *QIAxcel DNA Screening Kit* e *QX Alignment Marker* 15 bp/5000bp como padrão de alinhamento interno. A separação dos produtos de amplificação ocorreu na voltagem de 6 KV (quilovolts) no tempo de separação de 320 segundos e tempo de injeção de 20 segundos. O tamanho das bandas

foi determinado através do marcador *QX DNA Size Marker* 100pb-3kb e os dados foram analisados usando-se o software *Qiaxcel Screengel*.

Os dados gerados pela amplificação dos microssatélites foram usados para construir uma árvore fenética com o *software* Population 1.2.3. utilizado por Antonangelo (2012). Árvore fenética calculada pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

4.4 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em larga escala (microplacas)

As 90 linhagens isoladas da seleção em alta pressão osmótica foram avaliadas individualmente em meio seletivo em condição de estresse osmótico, mediante a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e a densidade óptica para a avaliação do crescimento da biomassa. Todas as linhagens antes de serem submetidas aos ensaios de crescimento foram previamente crescidas em 3,0 mL de YEPD líquido a 30°C, por 48 horas.

Nos experimentos utilizou-se um espectrofotômetro de microplacas com leitura de 96 poços (Tecan, Infinite M200 – RChisto) para avaliar o crescimento das linhagens em meio seletivo a 30°C, por 24 horas, que foi medido por absorbância (densidade óptica - D.O.) a 600 nm, em intervalos de 2 horas precedidas sempre de agitação lineares durante 10 minutos. Cada placa continha 30 linhagens, 1 linhagem referência (CAT-1) e um branco (somente com o meio), todas amostras foram realizadas em triplicata, para o cálculo das médias. Em cada poço adicionou-se 90 μ L do meio, contendo 75 % (v/v) de vinhaça (concentrada em 2,3 X), coletada da Usina Iracema e 17,7 % (g/g, oriundo de melaço) de ART, coletado da Usina São Manoel e 10 μ L da cultura homogeneizada de cada linhagem a ser avaliada. O meio utilizado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência para detectar a presença de glicerol, açúcares (glicose, frutose e sacarose) e etanol. E a concentração de sais do meio foi mensurada pela determinação da concentração de cálcio, sódio e potássio no meio utilizado por espectrometria de absorção atômica (SpectrAA 55B Varian) com chama (FAAS), segundo a metodologia do CTC, denominada de CTC-LA-MT6-001.

As cepas com desempenho superior foram submetidas a novos testes, sendo avaliadas quanto ao crescimento em placa de Petri e posteriormente em ciclos fermentativos empregando-se mosto constituído de melaço e vinhaça.

4.5 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em placas de Petri

Foram avaliadas 24 cepas, analisadas quanto ao crescimento e à sensibilidade aos meios contendo 74% (v/v) de vinhaça (concentrada em 2,3 X), coletada da Usina Iracema e 16,3 % (g/g, oriundo de melaço) de ART, coletada da Usina São Manoel, e o mesmo meio acrescido de 6% (v/v) de etanol (para simular a condição de ciclos fermentativos). Foi utilizado como referência a comparação entre as linhagens e também a CAT-1, que apresentou pela genotipagem maior similaridade genética com as linhagens selvagens e também prevalência depois da seleção osmótica, comparando com as linhagens padrão (PE-2, BG-1 e SA-1). As cepas denominadas padrões foram testadas também nessas mesmas condições. Esse experimento foi realizado primeiramente em duplicata. Após análise dos resultados às 12 melhores cepas, observadas pela tolerância aos meios citados, foram reavaliadas mais uma vez (triplicata) nos mesmos meios seletivos.

A metodologia empregada foi modificada a partir da metodologia aplicada por Kim *et al.*, (2010) e Junmei *et al.*, (2010). As amostras foram ativadas em tubos com meio YEPD líquido com 3 mL, mediante crescimento após 12 horas a 32°C, sob agitação de 180 rpm (rotação por minuto). Após este tempo foi mensurada a densidade óptica em espectrofotômetro (HACH - Modelo DR 4000 V) a 600nm, sendo estabelecida uma relação entre a D.O. 600nm e a concentração de células. Foram realizadas diluições de modo a resultar em suspensões de leveduras com 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 células por mL.

O meio de cultura utilizado foi distribuído em placas de petri, possibilitando o inóculo de até 5 linhagens por placa, nas seguintes diluições: 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 (Figura 3). Cada área recebeu 5µL de amostra, mantidos a 30°C por 48 horas. A avaliação dos resultados foi realizada visualmente, observando o crescimento das cepas, sendo pontuado com o uso de notas de 0 a 5, sendo 5 o melhor crescimento comparando com a CAT-1 e as demais linhagens da mesma placa.

Figura 3 - Esquema do plaqueamento, sendo cada linha uma amostra

4.6 Avaliação prévia das linhagens no transcorrer de fermentações com reciclo celular e o incremento da pressão osmótica com vinhaça

Nestes experimentos foram avaliadas as linhagens F1-3, F1-4, F1-5, F3-4, F3-10, F3-11, F5-15 e a linhagem CAT-1 como referência. Foram utilizados mosto composto por melaço de 150 a 170g/L de ART (coletada da Usina São Manoel), e teores crescentes de vinhaça (coletada da Usina Itacema), com reciclo de células.

4.6.1 Multiplicação das leveduras

As cepas foram propagadas inicialmente transferindo-se 100 μ L da cultura estoque em YEPD líquido para tubos contendo 5,0 mL de meio YEPD líquido, seguido de incubação a 32°C por 48 horas. Posteriormente, o conteúdo desse tubo foi transferido para Erlenmeyers com 100mL, 300mL e 600mL de meio, contendo 5% (m/m) de glicose, 8% (m/m) de glicose e 10% (m/m) de melaço sucessivamente, esterilizados a 121°C por 15 minutos, incubados a 32°C, sob agitação de 120 rpm, até consumo total dos açúcares. As propagações ocorreram até atingir concentração de biomassa desejada. A biomassa para o primeiro ciclo das fermentações foi coletada por centrifugação e ajustadas para que todas as linhagens iniciassem a fermentação com a mesma concentração de fermento (10% g/g).

4.6.2 Fermentações

Foram realizados ciclos fermentativos para selecionar entre as 7 leveduras que apresentaram os melhores resultados analisados anteriormente. As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyer e mantidos em Shaker – New Brunswick Scientific (Incubator Shaker Serie – INNOVA® 44).

Foram realizados 3 experimentos de fermentação, sendo 15 ciclos (divididos em 2 lotes), depois foi realizado novo experimento com 6 ciclos, para repetição do experimento anterior, mas somente com as mais altas concentrações de estresse osmótico e em seguida mais 3 ciclos foram realizados para a confirmação dos resultados em triplicata.

Nas fermentações de 15 e 6 ciclos foram utilizados volume total de 300 mL, já nos 3 ciclos em triplicata foram utilizados 100 mL de volume total. Em todos os ciclos a biomassa foi reciclada de uma fermentação para outra por centrifugação em centrífuga modelo Eppendorf - 5810 R sob 4000 rpm (rotação por minuto), durante 5 minutos com temperatura mantida a 15°C. O pé de cuba (biomassa) foi diluído em água e tratado em pH 2,5 com adição de ácido sulfúrico em todas as fermentações, simulando o que ocorre em ambiente industrial, sendo mantido por 50 minutos sob agitação à 32°C, antes da adição do mosto. O mosto utilizado para todos os ciclos foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. As fermentações foram mantidas à 32°C, sob agitação de 70 rpm e pH final de 4,5-5,0 (mosto mais pé de cuba).

O objetivo foi induzir condições próximas às encontradas em processos com alta pressão osmótica e também condições próximas às encontradas no ambiente industrial. Assim a levedura que melhor se destacou, foi analisada no sistema de fermentação extrativa a vácuo.

4.6.2.1 Ciclos fermentativos – 15 ciclos

As fermentações foram conduzidas em 2 lotes diferentes, sendo o Lote 1 composto pelas cepas F1-3, F1-4, F1-5, F3-4 e CAT-1, e o Lote 2 composto pelas cepas F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1, totalizando 15 ciclos para cada lote (os experimentos de cada lote foram realizados em dias diferentes). As fermentações foram realizadas de maneira a simular a elevada pressão osmótica através da adição de 30, 40, 50, 60 e 70% de vinhaça (% v/v) ao mosto a ser fermentado. Os ciclos foram conduzidos mediante a reciclagem das células de leveduras de uma fermentação para outra, com aumento na

concentração de vinhaça, porém mantendo o teor de ART nas concentrações entre 15 - 17% (m/m), conforme metodologia descrita por Furlan (2011).

4.6.2.2 Reciclos Fermentativos – 6 ciclos

Devido à diferença nos resultados entre as fermentações dos Lotes 1 e 2 (15 ciclos com reciclo de celular), principalmente na cepa referência CAT-1, novas fermentações foram conduzidas, agora com todas as cepas testadas anteriormente (F1-3, F1-4, F1-5, F3-4, F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1), para serem analisadas em comparação com os resultados anteriores (lote 1 e lote 2), onde a diferença maior está nos últimos ciclos, devido à alta pressão osmótica e também pelo fato dessas condições serem as mais estressantes. Assim, foram realizados 6 ciclos repetidos, denominado de Lote 3, variando-se a concentração de vinhaça apenas nas maiores concentrações de 50, 60 e 70% (v/v), em duplicata em cada meio, porém mantendo o teor de ART entre 16-17% (m/m), sendo especificamente, ciclo 1: 17%, ciclo 2: 17%, ciclo 3: 16-17%, ciclo 4 16%, ciclo 5: 17% e ciclo 6: 17% (m/m) de ART.

4.6.2.3 Reciclos fermentativos para análise estatística - 3 ciclos

Para confirmação dos resultados foram realizados mais 3 ciclos em triplicata para analisar as linhagens estatisticamente. As 7 linhagens e a referência CAT-1 foram submetidas aos teores de ART entre 15 a 17% (m/m), sendo especificamente, ciclo 1: 17 %, ciclo 2: 15 % e ciclo 3: 16% (m/m) de ART e 70% (v/v) de vinhaça, com reciclo de células. Com este experimento foi possível analisar a concentração de açúcares residuais, rendimento fermentativo, viabilidade e produção de glicerol para as cepas previamente selecionadas.

4.6.3 Análises dos resultados fermentativos

Foi determinada a concentração de ART e sais de cálcio, magnésio, sódio e potássio presentes no mosto. As fermentações foram analisadas de acordo com os parâmetros de viabilidade celular, formação de glicerol, açúcares residuais (glicose, frutose e sacarose) e produção de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a glicose e sacarose por analisador bioquímico (YSI).

4.6.4 Quantificações de açúcares, etanol e glicerol

As substâncias quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com troca iônica foram: sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol. Metodologia anteriormente descrita (item 4.2.3).

Durante o experimento, foi realizado a quantificação de glicose e sacarose por analisador bioquímico rápido (YSI - 2900), que serviu como parâmetro qualitativo durante as fermentações, para tal as amostras foram preparadas por diluição.

Foi também determinada a concentração de ART e sais de cálcio, magnésio, sódio e potássio presentes no mosto utilizando a metodologia de espectrometria de absorção atômica, a metodologia foi citada anteriormente (item 4.4).

4.6.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi estimada mediante microscopia óptica através de coloração diferencial de células, usando como corante solução azul de metileno. Metodologia anteriormente descrita (item 4.2.4).

4.6.6 Cálculo dos parâmetros de fermentação

O cálculo do rendimento fermentativo foi realizado de acordo com a estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica, sendo considerado um rendimento de 100% quando ocorre a formação de 51,1g de etanol a partir de 100 g de açúcares totais. Como parâmetro tecnológico, calculou-se para todos os ciclos repetidos o rendimento fermentativo (% fração do açúcar fornecido que se converteu em etanol). Para as fermentações de 6 e 3 ciclos foi comparado também o parâmetro fisiológico, pelo fator de conversão de substrato em etanol (Y_p/s), expresso em g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado.

4.6.7 Análise Estatística

Para comparação dos ciclos fermentativos realizou-se a comparação das médias por análise estatística utilizando o software ESTAT (Sistema para análise estatística, versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas – UNESP, Jaboticaba, 1992). As comparações das médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4.7 Genotipagem - PCR

As 7 cepas que demonstraram os melhores perfis de crescimento foram avaliadas quanto ao gênero *Saccharomyces*.

A extração do DNA, foi feita utilizando um tampão de quebra de células (2% triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1mM EDTA). E uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) com bolinhas de vidro (*glass beads*). A amostra foi agitada por 2 minutos e centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo criotubo e adicionado isopropanol, centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se etanol 70% e centrifugou-se por 1 minuto a 12000 rpm. O DNA foi seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 40 µL de água estéril (AUSUBEL et al., 1998).

Para a PCR foram utilizados 5 primers do kit de genotipagem desenvolvido pela UNICAMP e a ETH e por ela foram cedidos (CARVALHO-NETO et al, 2013). As reações de PCR contendo 10 µL foram constituídas de 1 µL da preparação de DNA, 0,5 µL de *Taq DNA polimerase* (Fermentas), 2 µM de cada primer e 2 µM de cada primer *reverse* específico e água ultra pura estéril suficiente para 10 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador *Applied Biosystem – Veriti - Thermal Cycler* sob as seguintes condições: 5 minutos a 94°C; 40 ciclos 94°C e 45 segundos; 55°C por 40 segundos; 72°C por 45 segundos e 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram conferidos gel de agarose 1,5%.

4.8 Montagem do sistema de extração a vácuo e avaliação do seu desempenho

Neste experimento foi avaliado a melhor linhagem selecionada no experimento de ciclos fermentativos, denominada de F1-5, e igualmente comparada a linhagem referência CAT-1. Sendo observados parâmetros fisiológicos e tecnológicos das cepas em condições de fermentação extrativa, no qual ocorre a retirada de etanol no vinho, mantendo o meio em torno de 60 a 70 g/L de etanol. O sistema montado simulou o sistema de fermentação extrativa, descrito por Atala (2004), sendo possível chegar em condições próximas ao encontrado no sistema original.

Para a montagem do sistema fermentativo extrativo a vácuo (Figura 4), foram necessários os seguintes equipamentos:

- Biorreator tipo tanque agitado de 7L;
- Tanque flash para a retirada do etanol;
- Bombas de circulação de vinho: entrada do vinho levedurado do biorreator ao tanque flash e retorno do vinho levedurado ao biorreator;
- Banho de aquecimento do vinho levedurado de 45 a 55°C (Trocador de calor 1);
- Banho de resfriamento do condensado a 6°C (Trocador de calor 2);
- Sistema de vácuo;
- Sistema de condensação.

Figura 4 - Esquema da fermentação extrativa

4.8.1 Fermentador e o processo de fermentação

O biorreator utilizado nestes experimentos foi o BioFlo 310 (New Brunswick – Fermentation Systems) (Figura 5 (a)), que apresenta um volume útil de 5 litros, com uma base de controle que permitiu controlar e monitorar alguns parâmetros dentre eles a temperatura, agitação e tempo de alimentação. Sendo pré-estabelecidas as condições de temperatura à 32°C, agitação de 70 rpm, pH entre 4,5 e 5, tempo de alimentação de 4 horas e tempo total e fermentação de 8 horas.

As cepas utilizadas foram propagadas inicialmente transferindo-se 100 µL da cultura estoque em YEPD líquido para tubos contendo 5,0 mL de meio YEPD líquido, seguido de incubação a 30°C por 48 horas, sem agitação. Posteriormente, o conteúdo desse tubo foi transferido para Erlenmeyers com 100mL, 300mL e 600mL de meio, contendo melaço a 5%, 8% e 10% (m/m) de ART sucessivamente, esterilizados a 121°C por 15 minutos, e incubados a 30°C, por 24 horas com 120 rpm de agitação. As propagações foram realizadas até ser atingida a concentração celular desejada para iniciar cada experimento. A biomassa para o primeiro ciclo foi coletada por centrifugação e ajustada para que todas as linhagens iniciem a fermentação com 10% (m/m) de biomassa.

Foi utilizado volume total de 2 litros, com concentração de melaço, coletado da Usina São Manoel, variando em média na linhagem F1-5: ciclo 1: 27%, ciclo 2: 29% e ciclo 3: 32% (m/m) de ART e para a linhagem CAT-1: ciclo 1: 27%, ciclo 2: 28% e ciclo 3: 28% (m/m) de ART (Tabela 24 – Anexo I), diluído em vinhaça coletada da Usina Itacema. Foram realizados 3 ciclos em duplicata com cada linhagem, F1-5 e CAT-1. Em cada ensaio a vinhaça e a biomassa foram recicladas. A vinhaça foi aquecida até evaporação de todo etanol, simulando a coluna de destilação, e assim utilizada no próximo ciclo.

4.8.2 Tanque flash

A tecnologia se baseou no acoplamento de um evaporador flash (balão de fundo redondo com duas bocas) (figura 5 (b, c e d)), à dorna de fermentação. O tanque flash é onde ocorre a extração do etanol presente no meio fermentativo, através da diferença de pressão e a temperatura do vinho.

O vácuo do tanque flash foi mantido à 700 mmHg (milímetro de mercúrio), e o vinho levedurado antes de chegar ao tanque flash foi aquecido por um banho térmico

(trocador de calor 1, modelo HB – 140 - Büchi) numa temperatura de 45 a 55°C (Figura 5 (e)). Por bombeamento o vinho levedurado da dorna passou pelo tanque flash e outra bomba retornou o vinho levedurado do flash para a dorna (figura 5 (h)).

4.8.3 Bomba de vácuo e sistema de condensação

A baixa pressão permite que parte do etanol contido no vinho evapore. Este etanol passa depois pelo condensador, onde é liquefeito e recolhido no reservatório. A bomba de vácuo foi ligada 4 vezes, a partir de 4 horas de fermentação, permanecendo 32 minutos ligada em cada vez, sob vácuo de 700 mmHg, tempo suficiente para todo o meio fermentativo passar pelo sistema flash. A bomba a vácuo não operou continuamente devido ao sistema ser instável, podendo assim causar vazamento pelo flash e contaminar o etanol condensado.

A mistura água-etanol evaporada do tanque flash percorreu um condensador de bolas (Figura 5 (b), (c) e (e)) foi resfriado a 6°C por um banho termostatzado (trocador de calor 2, modelo TE-184 – Tecnal) (Figura 5 (g)). Após passar pelo condensador, a mistura era liquefeita e recolhida em um balão de 3 bocas.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

(h)

(i)

Figura 5 – Fotos dos sistemas montado da fermentação extrativa, sendo a) biorreator; b) tanque flash e condensador; c) condensador e tanque flash; d) tanque flash; e) trocador de calor 1; f) bomba à vácuo; g) trocador de calor 2; h) bombas de circulação e i) todo o sistema fermentativo à vácuo

4.8.4 Análises dos resultados fermentativos

Os seguintes parâmetros foram avaliados nos experimentos realizados: formação de glicerol, açúcar inicial e residual (glicose, frutose e sacarose) e produção de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O etanol foi medido antes e depois de cada operação a vácuo e ao final da fermentação (8 horas) por destilação utilizando o densímetro durante todos os ciclos.

4.8.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular final estimada mediante microscopia óptica através de coloração diferencial de células, usando como corante solução de azul de metileno. Metodologia já relatada (item 4.2.4).

4.8.6 Quantificação de açúcares do mosto e vinho e glicerol

Foram quantificadas sacarose, glicose, frutose e glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram determinados a quantidade de ART presente no melaço e mosto (sacarose, glicose e frutose) e em cada ciclo fermentativo foram avaliados a formação de glicerol e açúcares residuais. Metodologia relatada no item 4.2.3.

4.8.7 Determinação do etanol e rendimento fermentativo

O etanol foi dosado nos vinhos delevedurados antes e depois de cada operação a vácuo e no final da fermentação, sendo possível avaliar a produção de etanol durante o processo fermentativo e também a quantidade de etanol retirada pelo sistema a vácuo, mediante destilação (Tecnal – microdestilador de álcool TE - 012) e seguida de densimetria eletrônica em densímetro (Rudolph Research Analytical – DDM 911 – Automatic Density Meter).

O rendimento fermentativo foi calculado de acordo com base na estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica, sendo considerado um rendimento de 100% quando ocorre a formação de 51,1g de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais. Calculou-se o rendimento considerando a quantidade de etanol

em função do açúcar fornecido (parâmetro tecnológico) e do rendimento do açúcar consumido a etanol (Y_p/s) (parâmetro fisiológico).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de leveduras

As 444 cepas foram submetidas ao estresse adaptativo forçando as populações de leveduras destacar linhagens desejáveis para a fermentação extrativa. Esse experimento permitiu impor condições estressantes sobre as populações de cada frasco, gerando multiplicações de células, no transcorrer de 93 gerações, na perspectiva que algumas linhagens tolerassem condições de alta pressão osmótica durante as propagações. Ao final da seleção as linhagens foram isoladas para serem testadas individualmente. Segundo (STEENSELS et al., 2014) a seleção de células com tolerância a um específico fator de estresse pode ser selecionada a partir de um conjunto de milhões de células, sendo selecionada pela sobrevivência ou crescimento.

Longo e Vezinhet (1993) verificaram o polimorfismo observado entre cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Eles testaram cepas, que foram submetidas a várias transferências e depois de 55, 137, 275 e 412 gerações foram isoladas para a análise de cariotipagem. Uma das cepas se apresentou idêntica a cepa original, independente do número de gerações. No entanto, outra cepa, apresentou alterações no cariótipo já com 55 gerações, concluindo que a reprodução assexuada permitiu rearranjos cromossômicos.

Alexandrino (2012) submeteu leveduras híbridas geradas a partir de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, de cruzamentos entre- e intra-linhagens. Os cruzamentos realizados aleatoriamente (cruzamentos massais) foram submetidos à evolução adaptativa, na expectativa que algumas linhagens evoluíssem para maior tolerância à fermentação alcoólica com elevado teor de etanol, ao final da evolução selecionou-se variantes prevalente na população de híbridos, que foram submetidos a novos testes de seleção. Basso (2001) utilizou a engenharia evolutiva e a engenharia metabólica combinadas, com o objetivo de obter linhagens de leveduras melhoradas, para a aplicação na produção de etanol, a partir de meios contendo sacarose. Assim foi obtida após 60 gerações, uma linhagem mutante (*iSUC2* evoluída) com atividade de transportador de sacarose 20 vezes superior à linhagem *iSUC2*, sendo capaz de consumir toda a sacarose do meio de cultivo.

No presente trabalho as linhagens submetidas a concentrações crescentes de melaço e posteriormente em mosto com vinhaça, foram divididas em 6 frascos, para melhor aproveitamento a biodiversidade disponível, assim foi possível selecionar linhagens tolerantes.

5.1.1. Aumento crescente da concentração de melaço

Os frascos inicialmente submetidos a diferentes concentrações de ART demonstraram pelo perfil da concentração dos açúcares (sacarose, glicose e frutose), que no início da fermentação, a porcentagem de sacarose é bem maior que a porcentagem de glicose e frutose, sendo aproximadamente: 85, 8 e 7% respectivamente. Com o decorrer do tempo, as leveduras através das enzimas do tipo invertase, hidrolisam a sacarose em glicose e frutose ocorrendo um aumento significativo da concentração destes açúcares no meio. A Figura 6 apresenta os resultados de açúcares residuais para cada frasco em meios com crescentes concentrações de açúcares.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 6 – Concentração de açúcares residuais ao final de cada transferência com aumento da concentração de melaço no mosto. Frascos: 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e) e 6 (f). Meio 1 (120-130 g/L de ART), meio 2 (150-160 g/L de ART), meio 3 (200-210 g/L de ART), meio 4 (220-230 g/L de ART), meio 5 (240-250 g/L de ART) e meio 6 (250-260 g/L de ART)

Na Figura 6 é possível notar que os meios 1 e 2 em todos os lotes, apresentaram de 120-160 g/L de ART iniciais que resultou o consumo completo de açúcares, sendo este açúcares convertido em etanol, biomassa e subprodutos. Quando a concentração de substrato passou para 200 até 260g/L (meios 3 ao 6) a conversão começou a diminuir com o aumento de açúcares residuais no meio. Na maioria dos meios a sacarose foi completamente consumida, no entanto, os açúcares redutores foram aumentando com o aumento do ART inicial do mosto, havendo acúmulo de frutose maior do que de glicose. Em todos os frascos foi observado que a hidrólise da sacarose não foi o fator limitante para o consumo dos açúcares. Provavelmente a sobra dos açúcares residuais foi causado pelo estresse múltiplo frente ao melaço, sendo as cepas submetidas a vários estresses, incluindo a alta pressão osmótica. Dados mais detalhados da Figura 6 são mostrados nas Tabelas 2 à 7 que também apresentam os resultados obtidos na seleção com aumento da concentração de melaço

Tabela 2 – Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de ART (melaço) do frasco 1. Glicerol e etanol produzido, viabilidade e tempo de cada cultivo para os 6 diferentes meios testados. Sendo cada transferência os meios iniciais apresentaram, (1) 120-130; (2) 150-160; (3) 200-210 g/L; (4) 220-230; (5) 240-250 e (6) 250-260 g/L de ART

Meios	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L	Viabilidade Final %	Tempo h
1	7,0	48,2	91	48
2	8,8	64,9	94	48
3	6,5	59,4	87	73
4	7,7	58,5	89	73
5	8,5	51,8	96	96
6	11,2	51,8	98	96

Tabela 3 – Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de ART (melaço) do frasco 2. Glicerol e etanol produzido, viabilidade e tempo de cada cultivo para os 6 diferentes meios testados. Sendo cada transferência os meios iniciais apresentaram, (1) 120-130; (2) 150-160; (3) 200-210 g/L; (4) 220-230; (5) 240-250 e (6) 250-260 g/L de ART

Meios	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L	Viabilidade Final %	Tempo h
1	6,7	52,1	74	48
2	8,9	64,6	98	48
3	6,0	58,6	89	73
4	8,5	52,7	93	73
5	11,1	63,8	96	96
6	10,2	44,7	95	96

Tabela 4 – Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de ART (melaço) do frasco 3. Glicerol e etanol produzido, viabilidade e tempo de cada cultivo para os 6 diferentes meios testados. Sendo cada transferência os meios iniciais apresentaram, (1) 120-130; (2) 150-160; (3) 200-210 g/L; (4) 220-230; (5) 240-250 e (6) 250-260 g/L de ART

Meios	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L	Viabilidade Final %	Tempo h
1	6,6	53,9	89	48
2	8,6	67,8	95	48
3	6,4	57,7	78	73
4	7,8	52,2	93	73
5	9,6	52,2	100	96
6	8,9	65,4	100	96

Tabela 5 – Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de ART (melaço) do frasco 4. Glicerol e etanol produzido, viabilidade e tempo de cada cultivo para os 6 diferentes meios testados. Sendo cada transferência os meios iniciais apresentaram, (1) 120-130; (2) 150-160; (3) 200-210 g/L; (4) 220-230; (5) 240-250 e (6) 250-260 g/L de ART

Meios	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L	Viabilidade Final %	Tempo h
1	6,6	50,0	97	48
2	8,6	62,5	96	48
3	5,6	56,8	80	73
4	8,3	67,5	94	73
5	10,2	68,6	100	96
6	9,9	59,7	98	96

Tabela 6 – Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de ART (melaço) do frasco 5. Glicerol e etanol produzido, viabilidade e tempo de cada cultivo para os 6 diferentes meios testados. Sendo cada transferência os meios iniciais apresentaram, (1) 120-130; (2) 150-160; (3) 200-210 g/L; (4) 220-230; (5) 240-250 e (6) 250-260 g/L de ART

Meios	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L	Viabilidade Final %	Tempo h
1	7,1	53,0	99	48
2	8,6	69,1	92	48
3	5,4	59,3	83	73
4	9,3	71,4	90	73
5	10,4	61,8	96	96
6	9,4	58,1	100	96

Tabela 7 – Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de ART (melaço) do frasco 6. Glicerol e etanol produzido, viabilidade e tempo de cada cultivo para os 6 diferentes meios testados. Sendo cada transferência os meios iniciais apresentaram, (1) 120-130; (2) 150-160; (3) 200-210 g/L; (4) 220-230; (5) 240-250 e (6) 250-260 g/L de ART

Meios	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L	Viabilidade Final %	Tempo h
1	6,8	54,0	96	48
2	8,0	63,5	94	48
3	6,6	66,4	85	73
4	7,5	61,3	91	73
5	7,7	49,3	94	96
6	9,6	60,3	97	96

Analisando os dados Tabelas 2 à 7 pode-se observar a concentração de glicerol que apresentou valores mais elevados com o aumento de ART no meio, confirmando que a produção de glicerol se dá com o aumento da pressão osmótica, visto que o aumento de glicerol está acoplado ao estresse osmótico sofrido pela levedura. Esta condição adversa induz a levedura a produzir mais glicerol. Como já é conhecido, as células de levedura acumulam glicerol sob condições de elevada pressão osmótica (HIRASAWA et al., 2009).

Vale ressaltar que o consumo de açúcar, a formação de biomassa e a produção de etanol foram lentos, comparados com uma fermentação convencional, pois a concentração celular inicial foi baixa (1 mL do meio em 100 mL de mosto), para estimular a propagação das células e conseqüentemente uma melhor seleção das leveduras que necessitavam tolerar as condições do meio para sobreviver e propagar. A viabilidade celular manteve-se elevada durante todas as transferências apresentando valores maiores que 74%, oscilando na maioria das transferências entre 80 a 100%. No total foram 6 transferências, resultando em 40 gerações e totalizando 434 horas.

Em geral esse experimento teve o objetivo de proporcionar uma prévia seleção, sendo possível observar que ocorreu estresse osmótico na população de leveduras de todos os frascos, observado pelo aumento dos açúcares residuais, nos meios mais estressantes e pelo aumento da concentração de glicerol ao final dos cultivos.

Após a seleção, nova seleção adaptativa (item 5.1.2) foi realizada com aumento gradativo da concentração de vinhaça no mosto para proporcionar mais estresse

na população das linhagens presentes nos frascos, submetendo a população de leveduras a altas concentrações osmóticas. As cepas que toleraram primeiramente alta concentração de ART e posterior pressão osmótica vinda da vinhaça, foram isoladas e avaliadas individualmente em experimentos seguintes.

5.1.2. Aumento crescente da concentração de vinhaça

Os mesmos frascos selecionados pelo aumento da concentração de ART, foram submetidos a uma nova condição de estresse osmótico, agora com aumento crescente de vinhaça, conhecidamente rica em sais. Os meios continham uma média de 160 g/L de ART e concentração crescente de vinhaça: 13% (meio 1), 26% (meio 2), 39% (meio 3), 53% (meio 4), 66% (meio 5) e 75% (v/v) (meio 6). A última seleção com 75% de vinhaça foi repetida por mais duas transferências (meios 6a e 6b), para potencializar a seleção sob este estresse osmótico. Os resultados das Tabelas 8 à 13 apresentam as seleções em meios contendo vinhaça.

Tabela 8 - Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de vinhaça no frasco 1. Açúcares residuais, etanol e glicerol produzidos, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação e o tempo de cultivo. Sendo cada transferência os meios: (1) 13%; (2) 26%; (3) 39%; (4) 53%; (5) 66% e (6, 6a e 6b) 75% de vinhaça e aproximadamente 16% de ART

Meios	ART final g/L	Etanol produzido g/L	Glicerol produzido g/L	Viabilidade Final %	Fermento Final %	Rendimento Tecnológico* %	Tempo h
1	9	56,3	4,5	87	2	72	76
2	9	61,8	5,6	100	2	78	76
3	20	57,7	5,2	94	2	73	81
4	34	51,7	5,1	66	2,5	66	81
5	43	48,2	5,5	36	3	62	81
6	41	42,2	5,6	62	3	55	91
6 a	36	49,7	7,3	52	3	64	91
6 b	13	56,1	6,9	86	3	75	91

*Cálculo de rendimento: Açúcar fornecido

Tabela 9 - Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de vinhaça no frasco 2. Açúcares residuais, etanol e glicerol produzidos, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação e o tempo de cultivo. Sendo cada transferência os meios: (1) 13%; (2) 26%; (3) 39%; (4) 53%; (5) 66% e (6, 6a e 6b) 75% de vinhaça e aproximadamente 16% de ART

Meios	ART final g/L	Etanol produzido g/L	Glicerol produzido g/L	Viabilidade Final %	Fermento Final %	Rendimento Tecnológico* %	Tempo h
1	18	57,4	4,5	78	2	72	76
2	7	62,6	6,1	92	2	78	76
3	11	62,3	7,1	76	2	77	81
4	20	42,1	6,8	75	3	52	81
5	47	43,6	5,5	70	2,5	54	81
6	34	48,0	5,9	75	3	59	91
6 a	24	49,9	7,6	89	3	62	91
6 b	22	58,8	6,1	45	3	63	91

*Cálculo de rendimento: Açúcar fornecido

Tabela 10 - Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de vinhaça no frasco 3. Açúcares residuais, etanol e glicerol produzidos, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação e o tempo de cultivo. Sendo cada transferência os meios: (1) 13%; (2) 26%; (3) 39%; (4) 53%; (5) 66% e (6, 6a e 6b) 75% de vinhaça e aproximadamente 16% de ART

Meios	ART final g/L	Etanol produzido g/L	Glicerol produzido g/L	Viabilidade Final %	Fermento Final %	Rendimento Tecnológico* %	Tempo h
1	53	40,7	4,4	32	2	51	76
2	10	59,6	6,2	96	2,5	74	76
3	15	61,0	6,3	80	2	76	81
4	10	60,6	7,1	92	3,5	75	81
5	43	45,2	5,1	62	3,5	56	81
6	40	41,0	5,6	69	3	50	91
6 a	24	50,1	8,1	73	3	62	91
6 b	22	53,8	7,3	78	3	70	91

*Cálculo de rendimento: Açúcar fornecido

Tabela 11 - Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de vinhaça no frasco 4. Açúcares residuais, etanol e glicerol produzidos, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação e o tempo de cultivo. Sendo cada transferência os meios: (1) 13%; (2) 26%; (3) 39%; (4) 53%; (5) 66% e (6, 6a e 6b) 75% de vinhaça e aproximadamente 16% de ART

Meios	ART final g/L	Etanol produzido g/L	Glicerol produzido g/L	Viabilidade Final %	Fermento Final %	Rendimento Tecnológico* %	Tempo h
1	28	52,8	3,8	87	2	66	76
2	20	58,4	5,4	89	2	72	76
3	11	62,7	6,3	71	2	78	81
4	17	58,9	5,9	70	3	73	81
5	35	50,6	6,7	64	3	62	81
6	41	46,7	5,4	50	3	57	91
6 a	14	55,6	8,0	79	3	69	91
6 b	12	51,2	8,5	88	4	66	91/

*Cálculo de rendimento: Açúcar fornecido

Tabela 12 - Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de vinhaça no frasco 5. Açúcares residuais, etanol e glicerol produzidos, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação e o tempo de cultivo. Sendo cada transferência os meios: (1) 13%; (2) 26%; (3) 39%; (4) 53%; (5) 66% e (6, 6a e 6b) 75% de vinhaça e aproximadamente 16% de ART

Meios	ART final g/L	Etanol produzido g/L	Glicerol produzido g/L	Viabilidade Final %	Fermento Final %	Rendimento Tecnológico* %	Tempo h
1	25	54,3	3,5	81	2	68	76
2	6	61,3	6,6	95	2	76	76
3	11	59,2	6,5	74	2	74	81
4	32	47,7	4,4	73	2,5	59	81
5	33	50,0	6,0	71	3	62	81
6	42	43,1	5,0	50	3	53	91
6 a	23	53,4	6,5	88	2	66	91
6 b	13	54,2	6,5	87	3	70	91

*Cálculo de rendimento: Açúcar fornecido

Tabela 13 - Parâmetros ao final de cada transferência com aumento da concentração de vinhaça no frasco 6. Açúcares residuais, etanol e glicerol produzidos, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação e o tempo de cultivo. Sendo cada transferência os meios: (1) 13%; (2) 26%; (3) 39%; (4) 53%; (5) 66% e (6, 6a e 6b) 75% de vinhaça e aproximadamente 16% de ART

Meios	ART final g/L	Etanol produzido g/L	Glicerol produzido g/L	Viabilidade Final %	Fermento Final %	Rendimento Tecnológico* %	Tempo h
1	6	61,0	4,9	91	3	77	76
2	15	58,0	5,3	95	3	72	76
3	24	53,8	5,3	65	2,5	67	81
4	20	57,0	6,1	67	3	71	81
5	30	50,4	5,5	60	3	62	81
6	28	50,7	5,4	75	3	62	91
6 a	32	46,8	5,7	70	3	58	91
6 b	20	50,6	6,7	74	3	65	91

*Cálculo de rendimento: Açúcar fornecido

Nas Tabelas 8 à 13, verifica-se os parâmetros observados em cada frasco com relação aos açúcares residuais, etanol produzido, glicerol, viabilidade, porcentagem de fermento, rendimento da fermentação.

Comparando as transferências no mesmo frasco, com relação a produção de etanol e açúcar residual, e conseqüentemente o rendimento, foi observado que os frascos 1, 3 e 5 apresentaram menor concentração de ART e maior concentração de etanol nas transferências iniciais e na última transferência, provavelmente as linhagens estavam mais adaptadas. Isso também foi verificado no frasco 4 que apresentou nas transferências iniciais e nas duas últimas menor concentração de ART e maior concentração de etanol. Já nos frascos 2 e 6 as primeiras transferências apresentaram os maiores rendimentos. Comparando as últimas 3 transferências, que apresentam as maiores pressões osmóticas (Meios 6, 6a e 6b), verificou-se que o açúcar residual foi diminuindo com o passar das transferências, e ocorreu aumento na produção de etanol, e conseqüentemente no rendimento fermentativo. Isso pode ser explicado que a população de leveduras estavam se adaptando ao meio estressante com exceção do frasco 6 que apresentou no meio 6a aumento de açúcar residual, mas na transferência seguinte (meio 6b) houve decréscimo do ART residual.

Foram realizadas 8 transferências, resultando em 53 gerações e totalizando 668 horas de cultivo após todas as transferências. A viabilidade celular apresentou muitas variações, a menor foi de 32%, oscilando na maioria dos ciclos entre 60 a 100%. Quanto a viabilidade mostrou-se mais baixa, também foi observado a confirmação do estresse pelo baixo rendimento.

Em geral as concentrações de glicerol das duas últimas transferências foram mais altas que as iniciais, provavelmente devido ao aumento da pressão osmótica (maiores concentrações de sais). Mas também foi observado em algumas transferências iniciais concentrações de glicerol próximas aos últimos meios, assim concluindo estresse já nos meios iniciais.

A biomassa foi estimada somente na etapa final do processo, podendo ser observado que a concentração de células iniciais foi baixa, sendo 1 mL de uma transferência para a outra em 100 mL de mosto, sendo assim a concentração de fermento final dos lotes ficaram entre 2 e 4 % (v/v).

As seleções com aumento gradativo de açúcares (item 5.1.1) e posterior aumento de vinhaça, submeteram as linhagens de leveduras aos mostos com alto estresse osmótico, sendo possível isolar linhagens com possíveis perfis de tolerância aos estresses encontrados na fermentação extrativa. Assim o experimento selecionou linhagens, que se destacaram pela sobrevivência e tolerância as condições impostas entre as 444 linhagens. As cepas foram isoladas com o intuito de recuperar e preservar as linhagens mais resistentes, resultando em 90 cepas (15 colônias de cada frasco). Essas cepas foram submetidas individualmente a outros métodos de seleção e genotipagem.

5.2 Genotipagem

5.2.1 Análise das populações de leveduras por marcadores microsatélites

As 90 cepas foram genotipadas para identificar se as cepas resultantes dos experimentos de seleção em altas pressão osmótica seriam cepas selvagens ou cepas industriais: PE-2, CAT-1, BG-1 e SA-1 introduzidas no processo industrial. As amostras foram analisadas pelo método de Eletroforese Capilar. Foram utilizados 5 pares de *primers* representando 5 diferentes *loci*, sendo sempre comparados com as cepas industriais. Foi possível estimar se as cepas são uma das linhagens industriais ou selvagens e/ou predominantes, podendo ser observado na árvore fenética (Figura 7).

Os dados gerados pela amplificação dos 5 microsatélites em 90 cepas foram usados para construir uma árvore fenética com o *software* Population 1.2.3. (Figura 7). A árvore fenética calculada pelo método de agrupamento UPGMA.

Através da comparação do perfil de 5 diferentes loci, chegamos as seguintes relações:

- O frasco F1 (Figura 7 – a), apresentou todas as cepas diferentes entre si e diferentes das cepas industriais.
- O frasco F2 (Figura 7 – b), a cepa 11 é idêntica com a CAT-1; as cepas 14, 3 e 10 são idênticas entre si. As outras são diferentes entre si e das industriais.
- O frasco F3 (Figura 7 – c), as cepas: 2, 13 são idênticas, mas diferentes das cepas industriais. E as demais são diferentes entre si.
- O frasco F4 (Figura 7 – d), apresentou todas as cepas diferentes entre si e diferentes das cepas industriais.
- O frasco F5 (Figura 7 – e), apresentou todas as cepas diferentes entre si e diferentes das cepas industriais.
- O frasco F6 (Figura 7 – f), são CAT-1: 2, 3, 6, 8, 13, 14 e 15 e BG-1: 1, 4, 5, 7, 9 e 10, 11 e 12.
- A linhagem CAT-1 apresentou maior familiaridade genética com as linhagens selvagens, em comparação com as outras linhagens padrões (BG-1, PE-2 e SA-1). Sendo assim essa linhagem foi utilizada nos demais experimentos como linhagem referência.

Figura 7- Árvore fenética construída com o algoritmo de agrupamento UPGMA com base nos resultados da análise de microsatélite. Resultado da análise por 5 *loci* microsatélites em 90 cepas e 4 cepas industriais (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1), divididas em: F1 (a), F2 (b), F3 (c), F4 (d), F5 (e) e F6 (f). A árvore foi construída com o software Populations 1.2.3.

5.3 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em microplacas

Todos os isolados da seleção de leveduras (90 linhagens), em triplicata, foram avaliadas mediante o crescimento, em microplacas de 96 poços, para realizar uma seleção individualizada das linhagens. Foi possível identificar se as linhagens apresentavam crescimento e velocidade específica máxima próxima ou melhor que a linhagem referência CAT-1 (Figura 8). O meio seletivo utilizado foi similar ao substrato industrial (melaço e vinhaça), induzindo condição de estresse osmótico, sendo 75% de vinhaça e 17,7% de ART (melaço), foi quantificado quanto a presença de sais de cálcio, sódio e potássio (Tabela 14 – Anexo A). A vinhaça foi utilizada no meio, pois no processo de fermentação extrativa há acúmulo de vinhaça concentrada, visto que é utilizado alta concentração de melaço, assim há aumento de sais no vinho final. A Figura 8 apresenta os resultados de crescimento e velocidade específica máxima de todos os frascos.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 8 – Gráfico de correlação entre a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e a densidade óptica (600 nm) dos isolados dos frascos: 1 (a); 2 (b); 3 (c); 4 (d); 5 (e) e 6 (f) da seleção de leveduras, avaliados após 24 horas em microplacas em meio com estresse osmótico em comparação com a linhagem CAT-1

A Figura 8 mostrou os parâmetros de crescimento observados em cada frasco. O meio empregado possibilitou realizar seleção, sendo consideradas as linhagens que apresentaram perfis mais próximos ou superiores a referência CAT-1, tendo como referência principal o crescimento da biomassa (quantificado por D.O.), pois a biomassa foi considerada prioritária, visto que a produção de etanol está acoplada à síntese de biomassa em condições de anaerobiose (FURLAN, 2013). Esse parâmetro se relaciona com a capacidade da linhagem em atingir a maior biomassa no período, assim supõe-se tolerância superior as demais linhagens, diante dos estresses do mosto.

O Frasco 1 (Figura 8 (a)) apresentou 67% das cepas com maiores crescimentos, comparados com a CAT-1. Nos Frascos 2 e 5 (Figura 8 (b) e (e)) todas as cepas apresentaram crescimentos próximos a CAT-1. Os Frascos 3 e 4 (Figura 8 (c) e (d)) apresentaram 40% e 73% cepas com os maiores crescimentos, respectivamente, comparados com a CAT-1. A Figura 8 (f) apresenta as linhagens BG-1 e CAT-1, assim foi possível comparar essas duas linhagens frente as condições impostas nesse experimento, os resultados entre essas linhagens foram parecidos, de acordo com os parâmetros de crescimento e a velocidade específica máxima, mas em média a levedura CAT-1 demonstrou os melhores resultados.

Assim diante dos resultados comparativos de crescimento de células com a CAT-1, 24 linhagens foram selecionadas com os melhores desempenhos, as mesmas foram identificadas e segue a relação conforme a Figura 9 e Tabela 15 (Anexo B). As outras 69 linhagens foram descartadas por apresentaram valores inferiores a D.O. da linhagem referência. Dentro das 69 linhagens também foram descartadas para as próximas etapas as cepas iguais às cepas padrões, observadas pela genotipagem, ou as que se apresentaram iguais dentro do mesmo frasco (prevalência), considerando somente uma como representante.

Figura 9 – Gráfico de correlação entre a velocidade específica máxima ($\mu_{\max}$) de crescimento e a densidade óptica (600 nm), das melhores linhagens em comparação a linhagem CAT-1. Avaliados após 24 horas em microplacas em meio com estresse osmótico em comparação com a linhagem CAT-1

As 24 linhagens selecionadas foram submetidas a uma avaliação de crescimento em placa e posteriormente foram avaliados cultivos com ciclos celular com mostos com alta pressão osmótica.

5.4 Avaliação do crescimento de leveduras em condição de estresse osmótico em placa de Petri

Utilizou-se seleção sob avaliação do crescimento de células em placas. Essa metodologia, foi utilizada por Jummei et al., (2010), onde foi comparado o efeito do etanol sobre o crescimento de *S. cerevisiae* selvagem com uma cepa mutante (Δ sr1p) em meio YEPD contendo diferentes concentrações de etanol (0, 8, 10, 11 e 12%), os resultados mostraram que o mutante era mais sensível ao etanol do que a cepa selvagem, em 10, 11 e 12% de etanol, pois o gene *Asr1* está envolvido em resposta ao estresse do etanol.

Foram avaliadas 24 cepas, analisadas quanto ao crescimento em meios com alta pressão osmótica, sendo meio 1: 74% (v/v) de vinhaça e 16,3 % (m/m) de ART (melaço) e meio 2 acrescido de 6% (v/v) de etanol, sendo aproximadamente a porcentagem de etanol que se encontra em contato com leveduras na fermentação extrativa a vácuo (ATALA,

2004), assim foi possível identificar cepas tolerantes frente as condições impostas, visualizadas pelo crescimento de células, observadas nas Figuras 10 a 12.

Figura 10 - Seleção de cepas em meio com alta pressão osmótica, sendo: Meio 1: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e Meio 2: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e 6% (v/v) etanol, respectivamente. Sendo em cada linha a cepa correspondente, plaqueadas em 4 diluições: 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2

Figura 11 - Seleção em meio com alta pressão osmótica: Meio 1: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e Meio 2: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e 6% (v/v) etanol, respectivamente. Sendo em cada linha a cepa correspondente, plaqueadas em 4 diluições: 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2

Figura 12 - Seleção em meio com alta pressão osmótica: Meio 1: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e Meio 2: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e 6% (v/v) etanol, respectivamente. Sendo em cada linha a cepa correspondente, plaqueadas em 4 diluições: 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 . Observação: o F5-9 está invertido com a maior diluição do começo para o fim, concluindo que não houve crescimento nas maiores diluições, isso também ocorreu na duplicata

Nas Figuras 10 a 12 foi possível visualizar que das 24 cepas selecionadas anteriormente, 12 cepas se destacaram, onde apresentaram os melhores resultados de crescimento. Foi utilizado como base notas de 0 a 5, tendo como referência as linhagens entre si e a CAT-1 (Tabela 16), sendo assim avaliadas visualmente.

Também foram avaliadas as cepas padrões (Figura 13), os resultados confirmaram que a CAT-1, dentre as cepas padrões apresentou os melhores resultados em meio com alta pressão osmótica, provenientes de vinhaça e melaço. Isso já havia sido observado depois da seleção adaptativa, que confirmou a prevalência da CAT-1 pela genotipagem.

As 12 cepas foram submetidas a novo teste, com as mesmas condições já testadas em duplicata, confirmando em triplicata os melhores crescimentos (Figura 14). Foi possível selecionar 7 linhagens, as quais apresentaram média de pontuação 5 (Tabela 16), sendo testadas com fermentações com reciclo de células. As cepas selecionadas foram: F1-3, F1-4, F1-5, F3-4, F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1.

Figura 13 - Seleção em meio com alta pressão osmótica: Meio 1: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e Meio 2: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e 6% etanol, respectivamente. Sendo em cada linha a cepa correspondente, plaqueadas em 4 diluições: 10⁵, 10⁴, 10³ e 10²

Figura 14- Seleção das 12 melhores cepas em meio com alta pressão osmótica: Meio 1: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e Meio 2: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e 6% (v/v) etanol, respectivamente. Sendo em cada linha a cepa correspondente, plaqueadas em 4 diluições: 10⁵, 10⁴, 10³ e 10²

Tabela 16 – Avaliação das linhagens em diferentes meios: Meio 1: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART; Meio 2: 74% (v/v) de vinhaça, 16% (m/m) de ART e 6% (v/v) etanol e. A avaliação dos resultados foi realizada visualmente, observando o crescimento das cepas, sendo pontuado com o uso de notas de 0 a 5 e a média das repetições

Linhagens	Meio 1*	Meio 2*	Meio 1**	Meio 2**	Meio 1***	Meio 2***	Média
CAT-1	5	4	5	4	5	4	5
F1-3	5	5	5	5	5	4	5
F1-4	4	5	4	5	5	5	5
F1-5	5	5	5	5	5	5	5
F1-7	4	3	4	3			4
F1-10	2	2	2	2			2
F2-2	4	2	4	2			3
F2-3	4	3	4	3			4
F2-7	5	5	4	3	5	4	4
F3-1	5	4	5	4	4	3	4
F3-4	5	5	5	5	4	4	5
F3-7	4	3	4	3			4
F3-10	5	5	5	5	5	5	5
F3-11	5	5	5	5	5	4	5
F4-1	5	4	5	4	5	4	4
F4-2	4	3	4	3			4
F4-4	5	3	5	3			4
F4-11	4	4	4	4			4
F4-12	2	3	2	3			3
F4-13	4	5	4	3	4	3	4
F5-1	5	3	5	3			4
F5-3	5	4	5	4	4	4	4
F5-9	2	2	2	2			2
F5-14	3	3	3	3			3
F5-15	5	4	5	4	5	5	5
CAT-1	5	5	5	4			5
PE-2	5	3	5	3			4
BG-1	4	4	4	4			4
SA-1	4	3	4	3			4

*1ª repetição; ** 2ª repetição e *** 3ª repetição.

5.5 Avaliação prévia das linhagens no transcorrer de fermentações com reciclo celular e o incremento da pressão osmótica com vinhaça

Fermentações foram realizadas com o intuito de selecionar leveduras capazes de tolerar condições de estresse osmótico com reciclo de células. Nos experimentos foi utilizada 8 horas de fermentação, com base nas fermentações industriais, que utilizam em média de 8 a 10 horas. O trabalho de Basso et al., (2008) selecionou leveduras selvagens utilizando mosto industrial (caldo de cana e melaço), notou-se que cerca de 53% das leveduras testadas não metabolizavam todo o açúcar do mosto mesmo depois de 21 horas.

Segundo RAMOS et al. (2013) a levedura adequada é um importante fator para se obter sucesso na produtividade. Condições de estresse afetam o metabolismo celular da levedura, levando a perda de viabilidade celular e a capacidade de fermentação. Esse mesmo autor selecionou leveduras capazes de crescer em temperatura elevada (42°C), alta concentração de etanol (12%) e também osmo e sulfito tolerantes (1 M de NaCl e 0,04% de sulfito).

5.5.1 Reciclos fermentativos – 15 ciclos

As fermentações foram realizadas de maneira a simular a elevada pressão osmótica que se obteve mediante adições de 30, 40, 50, 60 e 70% de vinhaça (% v/v) no mosto de fermentação. Assim as concentrações de sais foram aumentando conforme o aumento da concentração de vinhaça no transcorrer dos ciclos (Tabela 17 – Anexo C). Fatores adicionais podem agir sobre a levedura, afetando a performance da fermentação, tais como, a presença de níveis tóxicos de alumínio e potássio no meio, reduzindo a viabilidade da levedura, os níveis de trealose celular e as taxas de fermentação com impacto negativo no rendimento do etanol (BASSO et al., 2004). Segundo Basso e Amorim, (1997), em ensaios de laboratório, doses de 10 mg de Al/L em meio semi-sintético já exercem efeito depressivos sobre o crescimento e a viabilidade celular, mas ao se empregar meios de melaço, tais efeitos tóxicos são atenuados, possivelmente devido a componentes presente no meio.

As cepas do lote 1 (F1-3, F1-4, F1-5, F3-4) apresentaram viabilidade, em torno de 80-91% (Figura 15 (a)), a linhagem F1-5 apresentou a maior viabilidade, com uma média dos ciclos de 91%. O lote 2 (F3-10, F3-11, F5-15) apresentou viabilidade, em torno de 80-92%, sendo a linhagem F3-11 a que obteve viabilidade mais alta com média de 90% (Figura 15 (b)). Como mostrado nos gráficos da figura 16.

Figura 15 – Viabilidade celular finais dos ciclos: 1, 5, 7, 11 e 15 do lote 1 (a) e 2 (b)

Com relação a açúcares residuais, os lotes 1 e 2 apresentaram nos primeiros ciclos baixa concentração e nos últimos ciclos sobraram mais açúcares residuais (Figura 16 e tabela 18 – Anexo D), isso pode ser explicado pelo aumento da pressão osmótica que resultou inibição das células no consumo de todo açúcar. No lote 1 somente a linhagem F1-5 apresentou menor quantidade de açúcares residuais, mostrando um diferencial perante as demais linhagens. Mas no lote 2 a concentração de açúcares residuais de todas as linhagens ficaram próximas a linhagem F1-5 do lote 1. Novos testes foram realizados para comprovação dos resultados, devido principalmente do fato que a CAT-1 (referência) apresentou diferenças entre os dois lotes, mesmo sendo submetidas as mesmas condições.

As Figuras 17 e 18 mostram o consumo de açúcares separadamente (sacarose e glicose). O lote 1, mostrou que a linhagem F1-5 apresentou rápida inversão da sacarose, iniciada a ação em 0 horas (o tempo 0 horas pode ser considerado como aproximadamente 15 minutos, devido o tempo necessário para a finalização da análise) e em menos de 2 horas de fermentação toda a sacarose foi convertida em glicose e frutose. O lote 2 não mostrou diferenças significativas entre as linhagens. Segundo o trabalho de Parazzi-Junior, (2006) as leveduras apresentam diferentes velocidades de hidrólise da sacarose, tanto em meios de crescimento como em mosto, por exemplo, a CAT-1 apresentou 3 horas, a PE-2 = 2 horas e a BG-1 = 2 horas, assim como a velocidade de metabolização dos açúcares presentes no mosto.

Figura 16– Perfil de ART residual (sacarose, glicose e frutose) ao longo dos 15 ciclos repetidos do lote 1 e lote 2, analisado por HPLC. Ciclos 1 ,2 e 3: mosto com 30% de vinhaça; ciclos 4, 5 e 6: mosto com 40% de vinhaça; ciclos 7, 8, e 9: mosto com 50% de vinhaça e 10, 11 e 12: mosto com 60% de vinhaça e ciclos 13, 14 e 15: mosto com 70% de vinhaça. Sendo a) F1-3, F1-4, F1-5, F3-4 e CAT-1 e b) F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1

Figura 17 - Perfil de açúcares residuais (sacarose e glicose) nos ciclos 1 (a), 7 (b) e 15 (c) do lote 1, analisado por YSI de 2 em 2 horas (0, 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação). Ciclo 1: mosto com 30% de vinhaça; ciclo 7: mosto com 50% de vinhaça; e ciclo 15: mosto com 70% de vinhaça. Observação: O tempo 0 horas pode ser considerado como aproximadamente 15 minutos, devido o tempo necessário para a finalização da análise

Figura 18 - Perfil de açúcares residuais (sacarose e glicose) nos ciclos 2 (a), 8 (b) e 15 (c) do lote 2, analisado por YSI de 2 em 2 horas (0, 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação). Ciclo 1: mosto com 30% de vinhaça; ciclo 7: mosto com 50% de vinhaça; e ciclo 15: mosto com 70% de vinhaça. O tempo 0 horas pode ser considerado como aproximadamente 15 minutos, devido o tempo necessário para a finalização da análise

O rendimento foi calculado a partir do açúcar fornecido no mosto no lote 1 (Figura 19 (a)) mostrando que em média o rendimento das linhagens ficou entre 65-75%, a linhagem F1-5 apresentou a maior média do lote 1, em torno de 74% e a CAT-1 63%. Pois a F1-5, como consumiu mais açúcar, consequentemente produziu mais etanol. O lote 2 (Figura 19 (b)) apresentou de 73 a 75% de rendimento fermentativo, a linhagem F5-15 teve a média de 75% e a CAT-1 em torno de 74%, concluindo que a F5-15 ficou muito próxima da referência, não apresentando resultado significativo.

Nesse experimento podemos concluir que das 7 linhagens selecionadas apenas 1 linhagem mostrou maior tolerância no mosto utilizado, apresentando menores teores de açúcares residuais e maior viabilidade. Esta cepa selecionada, denominada F1-5, também apresentou maior produção de glicerol, comparando com as demais do lote 1 (Figura 20 (a)), já comparando a F1-5 com o lote 2, com relação a produção de glicerol todas ficaram próximas da mesma média (Figura 20 (b)), isso pode ser ocorrência do estresse osmótico causado durante as fermentações, sendo a produção de glicerol uma defesa da célula para proteger a integridade da mesma frente a altas concentrações de sais e açúcares. O glicerol produzido pelas leveduras apresenta função reguladora da célula a estresses osmóticos (MAGER et al., 2002), isso provavelmente ajudou a célula a se destacar diante das demais, conseguindo resultar nos melhores resultados para o lote 1.

(a)

(b)

Figura 19 - Perfis de rendimento em etanol (%) do açúcar fornecido. Ao longo dos 15 ciclos repetidos do lote 1 a) (F1-3, F1-4, F1-5, F3-4 e CAT-1) e lote 2 b) (F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1). Ciclos 1, 2 e 3: mosto com 30% de vinhaça; ciclos 4, 5 e 6: mosto com 40% de vinhaça; ciclos 7, 8, e 9: mosto com 50% de vinhaça e 10, 11 e 12: mosto com 60% de vinhaça e ciclos 13, 14 e 15: mosto com 70% de vinhaça

(a)

(b)

Figura 20 – Produção glicerol ao longo dos 15 ciclos repetidos do lote 1 a) (F1-3, F1-4, F1-5, F3-4 e CAT-1) e lote 2 b) (F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1), analisados por HPLC. Ciclos 1, 2 e 3: mosto com 30% de vinhaça; ciclos 4, 5 e 6: mosto com 40% de vinhaça; ciclos 7, 8, e 9: mosto com 50% de vinhaça e 10, 11 e 12: mosto com 60% de vinhaça e ciclos 13, 14 e 15: mosto com 70% de vinhaça

5.5.2 Reciclos fermentativos – 6 ciclos

Para comprovação dos resultados dos 15 reciclos, foram realizadas fermentações (lote 3), perfazendo 6 ciclos repetidos, com todas cepas testadas anteriormente (F1-3, F1-4, F1-5, F3-4, F3-10, F3-11, F5-15 e CAT-1), visto que no lote 1 apresentou variação no consumo de açúcares, comparando com o lote 2, que obteve maior consumo de açúcares e também pela diferença da CAT-1 nos dois lotes (1 e 2). Também foi observado que nas fermentações com 60% de vinhaça foi consumido mais açúcares que em 50% de vinhaça, portanto os 6 ciclos repetidos neste experimento foram realizados variando a concentração de vinhaça em 50, 60 e 70%, a Tabela 19 (Anexo E) mostra a concentrações crescente dos sais encontrados nos mostos utilizados, em duplicata, porém mantendo constante o teor de ART em 15% (m/m).

Os resultados dos reciclos mostraram consumo quase total de açúcares em todas as linhagens, a linhagem F1-5 apresentou a menor porcentagem de ART (Tabela 20) e em todos os ciclos maior viabilidade (Figura 21), isso aponta uma maior tolerância as condições impostas pelo mosto, que mesmo com a alta pressão osmótica a F1-5 apresentou essas características. Um diferencial identificado anteriormente no lote 1 e 2 e comprovado novamente a rápida ação da inversão da sacarose da linhagem F1-5, comparando com as demais linhagens, como mostram as Figuras 22 e 23 (ciclos 3 e 5). No ciclo 3 a linhagem F1-5 com somente 30 minutos de fermentação 100% da sacarose já havia sido convertida em glicose e frutose, e no ciclo 5 com 15 minutos de fermentação 63% da sacarose já havia sido convertida. Já a CAT-1 demorou cerca de 4 horas para que toda a sacarose fosse convertida.

Também foram avaliados o rendimento fermentativo com base no açúcar fornecido e do fator de conversão do açúcar consumido em etanol (Y_p/s) (Tabela 21). A levedura F1-5 não apresentou o maior rendimento, mas apresentou porcentagens bem próximas a maioria das linhagens. Com relação ao glicerol a F1-5 apresentou uma das maiores quantidades produzida, só perdendo para a F1-3 e CAT-1 (Figura 24). Assim a linhagem F1-5, mesmo obtendo um dos maiores índices de produção de glicerol, ou seja, utilizou mais açúcar para produção de glicerol do que algumas cepas, manteve-se com o rendimento bem próximo entre elas, devido o fato de ter consumido mais açúcar que as outras linhagens, assim compensou essa maior produção de glicerol.

Figura 21– Viabilidade celular final e a média da viabilidade.

Tabela 20 - Perfil de ART residual (sacarose, glicose e frutose) ao longo dos 6 ciclos repetidos (C1-C6) do lote 3, analisado por HPLC. Ciclos 1 e 2: mosto com 50% de vinhaça; ciclos 3 e 4: mosto com 60% de vinhaça; ciclos 5 e 6: mosto com 70% de vinhaça. Em todos os ciclos a concentração inicial de ART foi 15%

Linhagem	Açúcar residual g/L						Média	DP*
	C1	C2	C3	C4	C5	C6		
F1-3	1,94	2,27	1,90	1,94	2,27	2,56	2,11	0,26
F1-4	2,56	2,18	2,09	2,09	2,31	2,99	2,25	0,35
F1-5	2,10	2,06	2,02	2,04	2,02	2,15	2,05	0,05
F3-4	2,20	1,82	2,16	2,05	3,47	4,40	2,18	1,02
F3-10	2,07	2,03	1,90	2,63	3,16	2,72	2,35	0,50
F3-11	2,34	2,14	2,09	2,31	3,30	3,68	2,33	0,67
F5-15	1,94	2,39	1,83	2,17	2,63	3,04	2,28	0,45
CAT-1	2,07	3,07	1,77	2,13	2,15	2,67	2,14	0,47

*Desvio padrão

Tabela 21 – Estudo comparativo sobre o fator de conversão de substrato em etanol (Yp/s: expresso em g de etanol produzido por açúcar metabolizado) e rendimento fermentativo (%; fração do açúcar consumido) que se converteu em etanol. Totalizando 6 ciclos (C1-6) (lote 3)

	Yp/s (g/g)								Rendimento (%)							
	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	Média	DP*	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	Média	DP*
F1-3	0,41	0,43	0,41	0,43	0,44	0,46	0,43	0,02	79	83	79	84	85	88	83	3,52
F1-4	0,32	0,4	0,42	0,43	0,45	0,46	0,41	0,05	61	77	81	83	86	89	80	9,95
F1-5	0,42	0,43	0,46	0,42	0,44	0,46	0,44	0,02	81	82	88	82	85	88	84	3,14
F3-4	0,41	0,42	0,46	0,43	0,43	0,45	0,43	0,02	80	82	89	83	82	86	83	3,27
F3-10	0,42	0,45	0,45	0,43	0,45	0,44	0,44	0,01	81	86	86	83	87	85	85	2,25
F3-11	0,42	0,42	0,44	0,45	0,45	0,46	0,44	0,02	80	81	84	87	87	88	85	3,39
F5-15	0,42	0,43	0,44	0,45	0,45	0,46	0,44	0,01	81	83	86	86	87	89	85	2,88
CAT-1	0,42	0,45	0,45	0,44	0,45	0,44	0,44	0,01	81	86	87	85	86	85	85	2,10

*Desvio padrão

Figura 22 - Perfil de açúcares (sacarose e glicose) no ciclo 3 (lote 3), com toda as linhagens selecionadas, com 60% de vinhaça, analisado por YSI (30 minutos, 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação)

Figura 23- Perfil de açúcares (sacarose e glicose) no ciclo 5 (lote 3), com toda as linhagens selecionadas, com 70% de vinhaça, analisado por YSI (15 minutos, 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação)

Figura 24 - Produção glicerol ao longo dos 6 ciclos repetidos, analisados por HPLC. Ciclos 1 e 2: mosto com 50% de vinhaça; ciclos 3 e 4: mosto com 60% de vinhaça; ciclos 5 e 6: mosto com 70% de vinhaça

5.5.3 Reciclos fermentativos em triplicata

Comparando os experimentos de fermentação com reciclo de células, todos apontaram a linhagem F1-5, sendo diferenciada perante as demais linhagens com relação a alguns parâmetros: rápida inversão da sacarose, menor quantidade de açúcar residual e alta viabilidade. Assim foram realizados esses experimentos em triplicata, para confirmação dos resultados.

A linhagem F1-5 apresentou nos ciclos 2 e 3 a menor média de açúcares residuais, comparando com as demais cepas e a CAT-1, mas estatisticamente no ciclo 2 as linhagens F1-3, F1-4, F1-5, F3-4, F3-10 e F5-15 não diferem entre si. E no ciclo 3 a F1-5 não difere das linhagens F1-4, F5-15 e CAT-1 (Figura 25 (a)) (Tabela 21 – Anexo F).

Comparando o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$) da linhagem F1-5 com as demais linhagens, notou-se que a conversão foi alta de 0,45 à 0,46 (Figura 25 (b)) (Tabela 21 – Anexo C). E o rendimento fermentativo do ART fornecido apresentou-se na faixa de 86-88% (Figura 25 (c)) (Tabela 22 – Anexo G).

A linhagem F1-5 apresentou os mais altos índices de produção de glicerol, perante as demais leveduras, mas estatisticamente diferiram pouco entre si (Figura 25 (e)) (Tabela 23 – Anexo H).

Todas as linhagens apresentaram alta viabilidade, mas a linhagem F1-5 mostrou maior viabilidade celular que as demais nos ciclos 2 e 3, sendo 98% e diferiram estatisticamente diante das demais linhagens (Figura 25 (f)).

Dentre as linhagens, foi confirmado que a linhagem F1-5, apresentou as mesmas características identificadas anteriormente, tais como: rápida inversão da sacarose, menor quantidade de açúcar residual e alta viabilidade. Então diante dos resultados das fermentações em recírculos a levedura F1-5 foi considerada a melhor e a mais competente a ser avaliada em condições de fermentação extrativa a vácuo em biorreator de bancada.

Figura 25 – Perfil fermentativo nos 3 ciclos repetidos. Sendo a) Açúcar residual total (g/L) do vinho; b) Fator de conversão de substrato em etanol (g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado); c) Rendimento fermentativo do açúcar fornecido (%; fração do açúcar que se converteu em etanol); d) Teores de glicerol do vinho (g/L); e) Viabilidade celular (%). Para as diferentes linhagens ao final de cada ciclo. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem entre si ao nível de 5% de significância

5.6 Confirmação do gênero das linhagens selecionadas

As 7 cepas que demonstraram os melhores perfis de crescimento foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, pois os primers utilizados na genotipagem realizada anteriormente não eram específicos para *Saccharomyces cerevisiae*. Por essa análise também foi possível constatar que as linhagens F1-3 e F1-4 são iguais, e todas as outras são diferentes entre si e comparadas a CAT-1 e as demais linhagens padrões (Figura 26).

Cada linhagem e a CAT-1 foram avaliadas com 5 primers. Somente as linhagens PE-2, BG-1 e SA-1 foram avaliadas com 4 primers. Então comparando com a análise de genotipagem anterior testada via microsatélite, a F1-5 também apresentou-se diferente das linhagens padrões e das 7 demais linhagens selvagens.

Figura 26 – PCR (Polymerase Chain Reaction) das 7 linhagens selvagens e as 4 linhagens industriais. As linhagens selvagem e a CAT-1 foi avaliada com 5 primers. E as linhagens PE-2, BG-1 e SA-1 com 4 primers

5.7 Fermentação Extrativa

O processo de fermentação com extração do etanol do meio fermentativo já foi citado por alguns autores Ramalingham; Finn (1977); Cysewski; Wilke (1978); Mariorella et al (1983); Nguyen et al., (2001) e Atala (2004). Pesquisadores realizaram estudos focados na otimização do processo de fermentação, utilizando vácuo para extrair continuamente o etanol dos reatores. A remoção parcial do etanol durante o processo reduz o poder inibitório sobre as leveduras fermentadoras, expandindo o potencial de produção alcoólica.

A linhagem selvagem F1-5 foi testada nas condições de fermentação extrativa à vácuo e comparada igualmente com a cepa industrial CAT-1, que mostrou melhores resultados comparando com as cepas industriais PE-2, BG-1 e SA-1. A linhagem F1-5 foi selecionada nos experimentos de fermentação com ciclos de células relatados anteriormente, pois demonstrou melhor perfil de tolerância a fermentações com alta pressão osmótica, na presença de alta concentração de açúcares do melaço e alta concentração de sais provenientes da vinhaça.

Foi montado um sistema de fermentação extrativa a vácuo mediante acoplamento de um evaporador flash às dornas de fermentação (biorreator de bancada). O diferencial do processo é possibilitar o uso de maiores concentrações de açúcar, aproximadamente duas vezes em relação ao processo comum, reduzindo consideravelmente a quantidade de vinhaça residual.

Enquanto produz etanol, as células de levedura estão usualmente expostas a uma alta concentração do mesmo, que eventualmente dificulta a viabilidade celular. Assim essa tecnologia retira o etanol durante a fermentação, mantendo a fermentação por cerca de 6-7% de etanol no meio, diminuindo o estresse do etanol na levedura. Um dos fatores limitantes do processo de produção de etanol é a tolerância das leveduras hoje disponíveis para suportar o estresse de uma fermentação industrial com elevado teor alcoólico 13-16%, quando atualmente a média estaria ao redor de 8,0-9,0% (ALEXANDRINO, 2012). O etanol apresenta um efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular. Segundo Luong (1985) a concentrações acima de 15 g/L apresenta diminuição da velocidade de crescimento e a concentração de etanol a partir de 100 g/L as células não crescem mais.

A concentração de açúcares iniciais, variou em média de 266 a 315 g/L (Tabela 24 – Anexo F), causando alto estresse osmótico. Foi constatado que a levedura F1-5 apresentou menor percentual de ART residual, comparado com a CAT-1. Na F1-5 houve acúmulo principalmente de frutose, enquanto na CAT-1 o acúmulo foi de sacarose (Figura 27). Vale ressaltar que em todos os ciclos o tempo de fermentação foi 8 horas, assim não foi possível observar em quanto tempo o consumo de açúcar seria total e também sua conversão em etanol. A linhagem selecionada apresentou em todos os experimentos, rápida inversão da sacarose, como já verificado nos testes anteriores.

Figura 27 - Média do perfil fermentativo ao final dos 3 ciclos repetidos, realizados em duplicata, para as linhagens F1-5 e CAT-1 ao final de cada ciclo. Sendo as concentrações no vinho residual (g/L): a) Sacarose; b) Glicose; c) Frutose e d) Açúcar residual total (soma dos açúcares)

Nguyen et al., (2001), utilizou concentração de 350 g/L de glicose, sendo que pouco mais de 50% da glicose foi convertida em etanol, sendo o etanol retirado durante o processo por separação a vácuo, reduzindo assim o estresse. Atala (2004) operou o sistema de fermentação extrativa a vácuo com alimentações concentradas de melaço, contendo até 330 g/L de açúcar, durante o processo fermentativo, a concentração de açúcares no reator foi convertida praticamente na sua totalidade, isso quando a alimentação foi de 180 e 230 g/L, já as concentrações de 280 e 330 g/L a conversão não foi total, com acúmulo de açúcares no meio, principalmente frutose.

O sistema operou com bomba a vácuo não contínuo, sendo que a mesma foi ligada 4 vezes por 32 minutos, a partir de 4 horas de fermentação, permanecendo 32 minutos ligada em cada vez. Após cada ciclo a biomassa e a vinhaça foram recicladas e retornados ao processo, para potencializar e observar o comportamento das leveduras, frente a alta concentração osmótica advindas também da alta concentrações de sais da vinhaça, simulando a concentração de sais no processo de fermentação extrativa, pois nesse processo ocorre alto acúmulo de vinhaça concentrada, devido à alta concentração de melaço inicial.

A concentração de glicerol foi maior na linhagem F1-5 (Figura 28 (a)), isso também foi observado nos experimentos anteriores. A média da viabilidade celular da F1-5 foi alta, sendo: ciclo 1 de 96%, ciclo 2 94% e ciclo 3 90%, isso mostra a alta tolerância as condições impostas. Já a CAT-1 apresentou viabilidade um pouco menor, só igualando com a F1-5 no ciclo 2 (Figura 28 (b)) (Tabela 24 – Anexo I). Diante dos resultados de viabilidade e a capacidade de suportar condições de alto estresse osmótico a F1-5 foi melhor do que a CAT-1.

Comparando o rendimento fermentativo (Figura 28 (c) e (d)) (Tabela 25 – Anexo J), o rendimento do açúcar consumido não apresentou diferenças entre as linhagens, somente no rendimento do açúcar fornecido, a linhagem F1-5 se destacou, apresentando os maiores valores, sendo F1-5: 79% (ciclos 1), 72% (ciclos 2) e 67% (ciclos 3) e CAT-1: 75% (ciclos 1), 62% (ciclos 2) e 57% (ciclos 3).

Figura 28 – Média do perfil fermentativo ao final dos 3 ciclos repetidos, realizados em duplicata. Para as linhagens F1-5 e CAT-1 ao final de cada ciclo. Sendo: a) Teores de glicerol do vinho (g/L); b) Viabilidade celular (%); c) Fator de conversão de substrato em etanol (g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado); d) Rendimento fermentativo do açúcar fornecido (%; fração do açúcar que se converteu em etanol)

Na Figura 29, fica evidente que a linhagem F1-5 foi superior a linhagem CAT-1, de acordo com os parâmetros de menor açúcar residual, maior produção de etanol e maior biomassa. Já o aumento da produção de glicerol pode ser explicado como um mecanismo de defesa da F1-5 que produziu mais desse subproduto para conseguir contornar o estresse osmótico e assim tolerar a alta pressão osmótica do processo, pois este poliol é produzido em maior quantidade para exercer uma proteção ao estresse osmótico.

O processo de fermentação extrativa a vácuo permite utilizar uma menor quantidade de água, comparando com os processos convencionais, pois a concentração de açúcar (melaço) pode ser maior e assim não requer grande diluição do mosto. Isso do ponto de vista ambiental e econômico traz grandes benefícios para a indústria sucroenergética, pois minimiza o volume da vinhaça final e consequentemente aumento da produção de etanol, devido a maior quantidade de açúcar utilizado no processo fermentativo.

Figura 29 - Média do perfil do açúcar fornecido em relação a biomassa produzida, subprodutos e açúcares residuais das linhagens F1-5 e CAT-1, ao final de 8 horas de fermentação, sendo: a) 267 g/L de ART fornecido; b) 288 g/L de ART fornecido; c) 315 g/L de ART fornecido; d) 266 g/L de ART fornecido; e) 276 g/L de ART fornecido e f) 284 g/L de ART fornecido

6 CONCLUSÃO

Os dados gerados nesse trabalho possibilitaram concluir que:

- A identificação de novas linhagens, isoladas da biodiversidade das usinas brasileiras, com o potencial de serem empregadas em processo de produção de etanol utilizando altas concentrações de melaço de cana;
- A partir das linhagens utilizadas na seleção, foram selecionadas 24 cepas, com tolerância a altas concentrações osmóticas. Após outras etapas de seleção foram identificadas 7 cepas, estas testadas em fermentações com reciclo de células, em meio com alta pressão osmótica. Obtendo resultados satisfatórios, frente as condições impostas, onde foram consideradas aptas para a fermentação com alta pressão osmóticas. A linhagem F1-5 se destacou em alguns aspectos, como: menor concentração de açúcar residual e maior viabilidade celular. Assim a linhagem F1-5 foi selecionada para ser testada em condição de fermentação extrativa a vácuo;
- Em fermentação extrativa a vácuo, a F1-5, mostrou-se com grande potencial, comparando com a CAT-1. Visto a rápida inversão da sacarose, provavelmente favoreceu o rápido consumo de açúcar, isso é de grande importância do ponto de vista industrial, onde a fermentação varia entre 8 a 10 horas. Ficou evidente que a linhagem F1-5 foi superior a linhagem CAT-1, de acordo com os parâmetros de menor açúcar residual, maior produção de etanol e biomassa. O aumento de glicerol pode ser explicado como um mecanismo de defesa no metabolismo da cepa F1-5 como forma de contornar o estresse osmótico e assim tolerar a alta pressão osmótica do processo. O tempo de fermentação deveria ter sido superior a 8 horas, visto que a concentração de açúcar é superior a utilizada no processo industrial convencional, pois só assim poderíamos avaliar em quanto tempo todo o açúcar teria sido metabolizado e convertido em etanol;
- Dentre a biodiversidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* encontradas no ambiente das destilarias brasileiras, foi possível selecionar linhagens promissoras, não só para o processo de fermentação extrativa, mas aos múltiplos estresses, presentes no mosto composto por melaço de cana, bem como ao impacto do reciclo de células;

Sugestões para continuidade deste trabalho:

- As 7 linhagens selecionadas: F1-3, F1-4, F1-5, F3-4, F3-10, F3-11, F5-15, poderão ser testadas posteriormente no processo de fermentação extrativa a vácuo, bem como em processos que utilizem mostos com alta concentração de melaço;
- Além da tolerância a alta pressão osmótica, testes com alta concentração de etanol deverão ser avaliados, para identificar se as 7 linhagens apresentam essa tolerância ao produto;
- O estudo fisiológico e genético da linhagem F1-5, com relação a inversão da sacarose e velocidade de consumo, seria importante, pois possibilitaria melhor entendimento, comparando com resultados fisiológicos e tecnológicos obtidos nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa**. 2012. 101 p. Dissertação (Mestrado na Área de Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALVES, J.G.LF. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. 1996. 69 p. Dissertação (Mestre na área de Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H.. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267–75, 2011.
- AMORIM, H.V.E; LEÃO, R.M. **Fermentação Alcoólica – ciência e tecnologia**. Piracicaba,:Fermentec, , 2005. 448p.
- ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – What Has Brazil Learned About Yeasts Inhabiting the Ethanol Production Processes from Sugar Cane ? **Biofuel Production – Recent Developments and Prospects**, v. 2, p. 67-84, 2011.
- ANTONANGELO, A.T.B.F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 83p. Tese (Doutorado na area de Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.
- ATALA, D.I.P. **Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo Fermentativo Extrativo de Produção de Etanol**. 2004, 152 p. Tese (Doutorado na área de Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos,Universidade de Campinas, 2004.
- AUSUBEL, F.M.R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J G. SEIDMAN, J. G.; SMITH, A. J.; STRUHL, K., **Current Protocols in Molecular Biology**. New York, 1998.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Toxic action of aluminum toward yeast fermentation. In: EUROCONFERENCE, SESIMBRA, 1997. **Proceedings...** Lisboa, 1997, p. 131.
- BASSO, L.C.; PAULILO, S.C.L; RODRIGUES, D.A.; BASSO, T.O.; AMORIN, A.V.; WALKER, G.M. Aluminium toxicity towards yeast fermentation and the protective effect of magnesium. International **Congress on Yeasts–Yeasts in Science and Biotechnology - The Quest for Sustainable Development, Book of Abstracts**, Rio de Janeiro, p. PB-14. 2004.

BASSO, T.O. **Melhoramento da Fermentação Alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. 2011. p 136. Tese (Doutorado na área de Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo São Paulo, 2011.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol Production in Brazil: The industrial Process and its impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production - Recent Development and Prospects**, Croatia v.1, p. 85-100, 2011.

BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.182, p. 1–8, 2000.

BNDES, CGEE (2008) **Cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro:BNDES, 2008. 316p.

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

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, Cambridge. v. 28, p. 145-154, 1982.

CARVALHO NETTO, O.V. **Fisiologia da fermentação alcoólica: Análise da expressão Gênica de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo fermentativo**. 2012. 165p. Tese de (Doutorado na área de Genética e biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; RODRIGUES, A.; BRAGANÇA, W.O.; COSTA, G.G.L.; ARGUESO, J.L.; PEREIRA, G.A.G. A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. **Journal of Biotechnology, Amsterdam**, v.168, p. 701-709, 2013.

CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, New York-, v.20, n.9, p.1421-1444, 1978.

DELLA-BIANCA, B.E.; BASSO, T.; STAMBUK, B; BASSO, L.C.; GOMBERT, A. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 979-991, 2012.

ELENA, S.F.; LENSKI, R.E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. **Nature Reviews Genetics**, London, v.4, p. 457–469, 2003.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 469–86, 2000.

FEREA, T.L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ROSENZWEIG, F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptative evolution. **Yeast**, Davis, v. 96, p. 9721–9726, 1999.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. Vinhaça de cana-de-açúcar. **Guaíba: Agropecuária**, 2000. 203p.

FURLAN, R.M.C. **Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**. 2012. 125 p. Dissertação (Mestrado na área Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

HIRASAWA, T.; ASHITANI, K.; YOSHIKAWA, K.; NAGAHISA, K.; FURUSAWA, C.; KATAKURA, Y.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. et al. Proteomic analysis of responses to osmotic stress in laboratory and sake-brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, Londo, v. 44, n. 6, p. 647–653, 2009.

HOWELL, K.S.; BARTOWSKY, E.J.; FLEET, G.H.; HENSCHKE, P.A. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **Applied Microbiology, Oxford**, v. 4, p. 315-320, 2004.

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

JUNMEI, D.; HUANG, XIAOWEI, H.; ZHAO, N.; GAO, F.; LU, Q.; ZHANG, K.Q. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress Involves Actions of protein ASR1p. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n.12, p. 1630-1636, 2010.

KIM, HYUN-SOO; KIM, NA-RAE; CHOI, WONJA. Total fatty acid content of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is more responsible for ethanol tolerance than the degree of unsaturation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht v. 33, p. 509-515, 2010.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica** 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, 1976a. 262p.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica** 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 1976b. 262p.

LONGO, E.; VEZINHET, F. Chromosomal Rearrangements during vegetative Growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 59, n. 1, p.322-326, 1993.

LUONG, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.27, n.3, p.280-285, 1985.

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

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; CHARLES, R. Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York , v.15, p. 103–121, 1983.

PARAZZI JR, O. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase**. 2006. 106p. Dissertação (Mestrado na área de Ciências e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

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

RAMALINGHAM, A.; FINN, R.K. The vacuform process: A new approach to fermentation alcohol. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v.19, p.583-589, 1977.

RAMOS, C.L.; DUARTE, W.F.; FREIRE, A.L.; DIAS, D. R.; ELEUTHERIO, E.C.A.; SCHWAN, R.F. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian journal of microbiology** : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], São Paulo, v. 44, n. 3, p. 935–944, jan. 2013.

SILVA, F.L.H. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua extrativa**. 1997. 162p. Tese (Doutorado na área de Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperatura elevadas por uma linhagem de *S. Cerevisiae***. 2009. 155p. Tese (Doutorado na área de Biotecnologia) Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 215p. Tese (Doutorado na área de Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

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.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: restructuring the theories in line with recent research. **Cerevisia, Bruxelas**, v. 21, p. 38-45, 1996.

ZHAO, X.Q., BAI, F.W., 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal Biotechnology**. Amsterdam, v. 144,p. 23–30, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 14 - Resultados da análise de HPLC e Espectrometria de Absorção Atômica do meio utilizado

Amostra	Sacarose g/L	Glicose g/L	Frutose g/L	Glicerol g/L	Ácido acético g/L	Etanol g/L
Meio*	131,52	19,36	19,44	5,74	2,47	2,04

Amostra	Cálcio mg/Kg	Sódio mg/Kg	Potássio mg/Kg
Meio*	2277	788	7838

*Melaço e vinhaça

ANEXO B

Tabela 15 – Parâmetros das cepas que obtiveram os melhores resultados de crescimento, avaliadas em meio composto de melaço 17,7% (m/m) ART, oriundos de melaço e 75% (v/v) vinhaça com relação ao crescimento da linhagem referência CAT-1. Medida da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e da densidade óptica (D.O.) ao final de 24 horas. Cada valor corresponde à média de 3 repetições para cada cepa

Cepas	$\mu_{\text{máx}}$	D.O.
F1-3	0,2887	0,976
F1-4	0,2681	0,973
F1-5	0,2507	0,991
F1-7	0,232	0,988
F1-10	0,2345	1,014
CAT-1	0,2315	1,009
F2-2	0,3076	1,022
F2-3	0,2946	1,032
F2-7	0,2705	1,025
CAT-1	0,2489	1,015
F3-1	0,2926	0,993
F3-4	0,2998	0,998
F3-7	0,2844	0,996
F3-10	0,3237	1,012
F3-11	0,3314	1,002
CAT-1	0,2315	1,009
F4-1	0,2679	0,971
F4-2	0,2593	0,969
F4-4	0,2723	0,981
F4-11	0,2414	1,005
F4-12	0,2321	0,977
F4-13	0,2304	0,986
CAT-1	0,2315	1,009
F5-1	0,2801	1,015
F5-3	0,2847	1,020
F5-9	0,2674	1,017
F5-14	0,2713	1,022
F5-15	0,1682	1,009
CAT-1	0,227	1,051

ANEXO C

Tabela 17 - Resultados da análise de sais por Espectrometria de Absorção Atômica do meio utilizado (Lotes 1 e 2)

Amostras	Alumínio mg/kg	Sódio mg/kg	Cálcio mg/kg	Magnésio mg/kg	Potássio mg/kg
Meio: Lote 1 30%	13	31	1773	658	5726
Meio: Lote 1 40%	15	32	1816	687	5918
Meio: Lote 1 50%	17	41	2071	774	6673
Meio: Lote 1 60%	18	45	2188	833	7114
Meio: Lote 1 70%	21	56	2492	937	7569
Meio: Lote 2 30%	12	32	1768	656	5736
Meio: Lote 2 40%	18	36	1952	732	6389
Meio: Lote 2 50%	18	41	2060	703	6650
Meio: Lote 2 60%	19	48	2189	830	7051
Meio: Lote 2 70%	20	56	2402	902	7562

ANEXO D

Tabela 18 - Perfil de ART residual (sacarose, glicose e frutose) ao longo dos 15 ciclos repetidos (C1-C15) do lote 1 e 2, analisado por HPLC. Ciclos 1 ,2 e 3: mosto com 30% de vinhaça; ciclos 4, 5 e 6: mosto com 40% de vinhaça; ciclos 7, 8, e 9: mosto com 50% de vinhaça e 10, 11 e 12: mosto com 60% de vinhaça e ciclos 13, 14 e 15: mosto com 70% de vinhaça

Linhagens	Açúcar residual (g/L)															M*	DP**
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15		
F1-3	4,86	3,46	11,65	7,22	12,59	9,53	21,44	13,49	37,19	12,32	22,85	17,98	43,38	33,61	35,18	19,12	12,71
F1-4	3,23	3,06	8,47	7,34	7,61	8,85	18,28	15,47	38,46	10,45	21,62	17,25	31,57	30,09	30,13	16,79	11,30
F1-5	3,94	3,25	5,20	5,44	3,62	3,88	5,98	6,58	18,97	5,56	6,02	6,37	9,16	7,90	9,61	6,76	3,87
F3-4	7,35	4,56	11,20	7,31	10,31	6,72	16,16	12,77	32,51	9,53	16,89	16,57	28,69	22,75	26,69	15,33	8,71
CAT-1	3,49	3,13	5,11	3,87	6,94	7,43	18,33	11,37	30,50	4,69	6,42	8,42	31,77	26,82	32,46	13,38	11,31
F3-10	6,50	6,42	5,41	6,87	7,08	6,39	6,57	12,45	8,79	4,94	7,12	12,00	17,63	13,86	12,16	8,95	3,74
F3-11	6,00	5,94	5,30	6,35	5,96	6,48	6,09	8,66	6,67	6,36	6,38	8,72	15,74	11,22	11,90	7,85	2,95
F5-15	5,94	5,45	6,67	6,70	5,71	6,77	7,12	10,18	8,94	5,44	6,50	7,97	9,31	8,44	11,72	7,52	1,86
CAT-1	5,70	5,80	6,22	6,65	6,21	6,03	6,50	10,52	9,65	5,30	7,46	10,43	15,05	17,47	18,33	9,15	4,42

* Média ** Desvio Padrão

ANEXO E

Tabela 19 - Resultados da análise de sais por Espectrometria de Absorção Atômica do meio utilizado (Lote 3)

	Alumínio	Sódio	Cálcio	Magnésio	Potássio
Amostras	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Meio 50%	16	92	2189	816	5874
Meio 60%	19	96	2227	820	5985
Meio 70%	23	110	2373	854	6203

ANEXO F

Tabela 21 – Perfil de açúcares residuais e Yp/s (fator de conversão de substrato em etanol) (g de etanol produzido por g de açúcar metabolizado) ao final de cada ciclo fermentativo para as diferentes linhagens

ART Residual (g/L)				Yp/s (g/g)			
Linhagem	C1	C2	C3	Linhagem	C1	C2	C3
F1-3	18,34	4,98	5,70	F1-3	0,46	0,43	0,46
	16,03	5,00	5,35		0,46	0,44	0,46
	16,19	4,96	6,10		0,46	0,42	0,46
Média	16,85	4,98	5,72	Média	0,46	0,43	0,46
Desvio Padrão	1,29	0,02	0,37	Desvio Padrão	0,00	0,01	0,00
F1-4	3,44	4,85	5,75	F1-4	0,46	0,46	0,46
	3,01	5,15	5,33		0,46	0,46	0,46
	3,44	5,07	5,55		0,46	0,41	0,46
Média	3,30	5,02	5,54	Média	0,46	0,44	0,46
Desvio Padrão	0,25	0,16	0,21	Desvio Padrão	0,00	0,03	0,00
F1-5	7,20	4,40	4,42	F1-5	0,46	0,43	0,46
	7,45	4,18	4,72		0,45	0,46	0,46
	7,12	4,08	5,15		0,46	0,46	0,46
Média	7,26	4,22	4,76	Média	0,46	0,45	0,46
Desvio Padrão	0,17	0,16	0,37	Desvio Padrão	0,01	0,02	0,00
F3-4	8,41	5,68	6,99	F3-4	0,46	0,45	0,44
	8,45	4,20	7,37		0,45	0,44	0,45
	8,49	5,73	6,60		0,45	0,45	0,43
Média	8,45	5,21	6,99	Média	0,45	0,45	0,44
Desvio Padrão	0,04	0,87	0,39	Desvio Padrão	0,00	0,00	0,01
F3-10	9,87	5,03	5,92	F3-10	0,43	0,45	0,46
	9,43	4,45	5,64		0,46	0,45	0,46
	8,99	5,61	5,78		0,46	0,45	0,44
Média	9,43	5,03	5,78	Média	0,45	0,45	0,45
Desvio Padrão	0,44	0,58	0,14	Desvio Padrão	0,02	0,00	0,01
F3-11	13,96	10,30	8,64	F3-11	0,42	0,44	0,45
	14,89	10,18	7,93		0,42	0,42	0,46
	14,45	10,24	9,35		0,43	0,43	0,44
Média	14,43	10,24	8,64	Média	0,42	0,43	0,45
Desvio Padrão	0,47	0,06	0,71	Desvio Padrão	0,01	0,01	0,01
F5-15	9,62	4,79	4,10	F5-15	0,46	0,46	0,46
	9,83	4,90	5,32		0,46	0,43	0,43
	10,68	4,78	5,90		0,43	0,44	0,44
Média	10,04	4,82	5,11	Média	0,45	0,44	0,44
Desvio Padrão	0,56	0,07	0,92	Desvio Padrão	0,02	0,02	0,01
CAT-1	3,85	6,31	6,24	CAT-1	0,46	0,46	0,46
	3,87	6,38	5,74		0,45	0,46	0,46
	3,75	6,28	6,02		0,45	0,46	0,46
Média	3,82	6,32	6,00	Média	0,45	0,46	0,46
Desvio Padrão	0,06	0,05	0,25	Desvio Padrão	0,46	0,43	0,46

ANEXO G

Tabela 22 – Rendimento fermentativo fisiológico do açúcar consumido em 8 horas e rendimento fermentativo tecnológico do açúcar fornecido no mosto ao final de cada ciclo fermentativo para as diferentes linhagens

Rendimento (%) (ART consumido)				Rendimento (%) (ART fornecido)			
Linhagem	C1	C2	C3	Linhagem	C1	C2	C3
F1-3	89,99	84,30	89,29	F1-3	81,01	81,84	83,54
	90,52	86,95	89,86		82,63	84,41	86,86
	90,61	82,04	90,30		82,63	79,65	86,86
Média	90,37	84,43	89,82	Média	82,09	81,97	85,75
Desvio Padrão	0,34	2,46	0,50	Desvio Padrão	0,93	2,38	1,92
F1-4	90,62	90,06	90,09	F1-4	88,92	87,51	86,86
	90,40	89,46	89,85		88,92	86,76	86,86
	90,62	89,76	89,98		88,92	87,14	86,86
Média	90,55	89,76	89,97	Média	88,92	87,14	86,86
Desvio Padrão	0,12	0,30	0,12	Desvio Padrão	0,00	0,37	0,00
F1-5	90,75	90,54	89,89	F1-5	87,19	88,35	87,42
	87,90	90,12	90,10		84,34	87,91	87,45
	90,98	90,96	90,32		87,46	88,78	87,42
Média	89,88	90,54	90,10	Média	86,33	88,35	87,43
Desvio Padrão	1,71	0,42	0,21	Desvio Padrão	1,73	0,44	0,02
F3-4	89,62	88,24	86,36	F3-4	85,52	85,30	78,83
	87,96	86,46	88,88		85,19	84,33	80,20
	88,97	87,09	85,07		84,86	84,17	81,57
Média	88,85	87,26	86,77	Média	85,19	84,60	80,20
Desvio Padrão	0,84	0,90	1,94	Desvio Padrão	0,33	0,61	1,37
F3-10	90,15	88,03	90,81	F3-10	84,95	85,44	87,46
	90,92	88,66	89,81		84,89	86,35	86,65
	89,37	88,16	90,31		85,01	85,27	87,05
Média	90,15	88,29	90,31	Média	84,95	85,69	87,05
Desvio Padrão	0,77	0,33	0,50	Desvio Padrão	0,06	0,59	0,40
F3-11	81,26	86,66	88,21	F3-11	75,09	81,44	80,98
	81,41	82,91	90,19		74,82	77,96	81,29
	84,31	84,92	86,65		74,96	82,66	81,60
Média	82,33	84,83	88,35	Média	74,96	80,69	81,29
Desvio Padrão	1,72	1,88	1,77	Desvio Padrão	0,14	2,44	0,31
F5-15	89,27	90,23	84,69	F5-15	84,60	87,70	82,03
	90,99	88,62	84,69		86,12	86,14	81,88
	90,13	87,02	85,32		85,36	84,58	82,18
Média	90,13	88,62	84,90	Média	85,36	86,14	82,03
Desvio Padrão	0,86	1,61	0,36	Desvio Padrão	0,76	1,56	0,15
CAT-1	89,71	89,33	89,75	CAT-1	87,84	86,03	86,26
	88,37	90,56	89,46		86,51	87,17	86,26
	89,00	90,49	89,62		87,19	87,16	86,26
Média	89,03	90,13	89,61	Média	87,18	86,79	86,26
Desvio Padrão	0,67	0,69	0,14	Desvio Padrão	0,67	0,66	0,00

ANEXO H

Tabela 23 – Comparação do glicerol produzido após 8 horas de fermentação ao final de cada ciclo fermentativo para as diferentes linhagens

Linhagem	Glicerol (g/L)		
	C1	C2	C3
F1-3	4,56	7,65	6,35
	5,48	7,45	6,87
	5,41	7,75	6,98
Média	5,15	7,62	6,73
Desvio Padrão	0,51	0,15	0,34
F1-4	6,07	8,35	8,23
	5,99	8,23	7,29
	6,19	8,61	7,47
Média	6,08	8,40	7,66
Desvio Padrão	0,10	0,19	0,50
F1-5	6,81	8,98	8,54
	6,91	8,48	7,82
	6,67	8,39	7,74
Média	6,80	8,62	8,03
Desvio Padrão	0,12	0,32	0,44
F3-4	6,44	7,59	6,81
	5,95	7,68	6,76
	6,42	7,07	6,88
Média	6,27	7,45	6,82
Desvio Padrão	0,28	0,33	0,06
F3-10	6,35	7,37	5,63
	6,47	7,07	7,13
	6,47	7,83	6,81
Média	6,43	7,42	6,52
Desvio Padrão	0,07	0,38	0,79
F3-11	5,80	6,95	6,24
	6,26	6,73	7,60
	6,00	6,74	7,34
Média	6,02	6,81	7,06
Desvio Padrão	0,23	0,12	0,72
F5-15	5,97	7,63	7,25
	6,73	6,53	7,61
	4,78	6,47	7,25
Média	5,83	6,88	7,37
Desvio Padrão	0,98	0,65	0,21
CAT-1	6,78	7,49	7,85
	6,68	7,47	7,35
	6,55	7,59	6,76
Média	6,67	7,52	7,32
Desvio Padrão	0,12	0,06	0,55

ANEXO I

Tabela 24 - Perfil de açúcares iniciais do mosto, açúcares residuais: sacarose, glicose, frutose e ART total, comparação do glicerol produzido e viabilidade celular após 8 horas de fermentação ao final de cada ciclo fermentativo (Ciclos 1, 2 e 3) em duplicata para as linhagens CTCF1-5 e CAT-1

Continua

ART fornecido (g/L)			
Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	274	308	345
	260	268	285
Média	267	288	315
Desvio Padrão	9,90	28,28	42,43
CAT-1	259	276	279
	272	275	289
Média	266	276	284
Desvio Padrão	9,19	0,71	7,07

Sacarose final (g/L)			
Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	1,12	1,61	2,44
	1,11	1,49	1,62
Média	1,12	1,55	2,03
Desvio Padrão	0,01	0,08	0,58
CAT-1	45,00	91,51	110,00
	47,98	91,51	122,24
Média	46,49	91,51	116,12
Desvio Padrão	2,11	0,00	8,65

Glicose final (g/L)			
Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	4,14	11,65	25,16
	2,31	4,63	17,51
Média	3,23	8,14	21,34
Desvio Padrão	1,29	4,96	5,41
CAT-1	2,56	1,20	3,02
	1,59	1,34	2,06
Média	2,08	1,27	2,54
Desvio Padrão	0,69	0,10	0,68

Frutose final (g/L)			
Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	36,93	63,76	86,54
	27,19	45,69	68,93
Média	32,06	54,73	77,74
Desvio Padrão	6,89	12,78	12,45
CAT-1	7,00	11,00	12,02
	8,12	10,05	10,53
Média	7,56	10,53	11,28
Desvio Padrão	0,79	0,67	1,05

ART final (g/L)			
Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	42,00	77,00	114,00
	30,67	51,89	88,15
Média	36,33	64,44	101,07
Desvio Padrão	8,01	17,76	18,28
CAT-1	56,95	108,56	130,87
	60,23	107,75	141,31
Média	58,59	108,16	136,09
Desvio Padrão	2,32	0,57	7,38

ANEXO I

Tabela 24 - Perfil de açúcares iniciais do mosto, açúcares residuais: sacarose, glicose, frutose e ART total, comparação do glicerol produzido e viabilidade celular após 8 horas de fermentação ao final de cada ciclo fermentativo (Ciclos 1, 2 e 3) em duplicata para as linhagens CTCF1-5 e CAT-1

Continuação

Glicerol produzido (g/L)				Viabilidade final (%)			
Linhagem	C1	C2	C3	Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	5,50	9,57	9,58	F1-5	95,00	93,00	90,00
	6,91	8,06	8,84		97,00	95,00	90,00
Média	6,21	8,82	9,21	Média	96,00	94,00	90,00
Desvio Padrão	1,00	1,07	0,52	Desvio Padrão	1,41	1,41	0,00
CAT-1	5,60	6,00	6,50	CAT-1	91,00	93,00	90,00
	6,31	5,58	6,00		90,00	95,00	85,00
Média	5,96	5,79	6,25	Média	90,50	94,00	87,50
Desvio Padrão	0,50	0,30	0,35	Desvio Padrão	0,71	1,41	3,54

ANEXO J

Tabela 25 - Rendimento fermentativo fisiológico do açúcar consumido em 8 horas e rendimento fermentativo tecnológico do açúcar fornecido no mosto ao final de cada ciclo fermentativo (Ciclos 1, 2 e 3) em duplicata para as linhagens F1-5 e CAT-1

Yp/s (g/g)				Rendimento do açúcar fornecido (%)			
Linhagem	C1	C2	C3	Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	0,45	0,42	0,43	F1-5	88,18	82,90	83,94
	0,43	0,43	0,42		83,32	83,76	81,81
Média	0,44	0,43	0,42	Média	85,75	83,33	82,87
Desvio Padrão	0,02	0,00	0,01	Desvio Padrão	3,44	0,61	1,51
CAT-1	0,44	0,42	0,42	CAT-1	85,29	82,04	82,60
	0,45	0,42	0,42		87,50	82,09	82,65
Média	0,44	0,42	0,42	Média	86,40	82,06	82,62
Desvio Padrão	0,01	0,00	0,00	Desvio Padrão	1,56	0,04	0,04

Produção de etanol (g/L)			
Linhagem	C1	C2	C3
F1-5	111	110	117
	103	101	97
Média	107	106	107
Desvio Padrão	5,7	6,4	14,0
CAT-1	98	87	82
	106	87	83
Média	102	87	83
Desvio Padrão	5,7	0	0,7