Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Elisângela de Souza Miranda

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

Piracicaba
2015

Elisângela de Souza Miranda
Licenciada em Biologia

Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Orientador:
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

Miranda, Elisângela de Souza
Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar / Elisângela de Souza Miranda. - - Piracicaba, 2015.
111 p. : il.

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

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

CDD 589.23
M672s

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

DEDICO

Aos meus pais Vera Miranda e João Miranda, minha irmã Luciana Miranda e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Amo muito vocês!

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, que não medindo esforços, disponibilizou parte de seu precioso tempo, auxiliando-me na confecção deste trabalho, possibilitando-me findá-lo com êxito e em tempo hábil.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

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

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela orientação, compreensão, incentivo e pelos grandes ensinamentos, sempre com muita solicitude.

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

A banca examinadora pelas contribuições no trabalho.

Ao querido técnico e amigo Luiz Lucatti (Cometa), sempre prestativo e alegre!

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

Ao Endrews por me ajudar nos momentos finais do meu experimento.

Ao Ronan Guimarães Muynarsk por me ajudar, pela companhia e por sempre me incentivar.

Aos amigos do laboratório, Camila, Renata, Cristiane, Osni, Elisa, Thalita, Alexandra, Ricardo, Otávio, Reinaldo e Eliane com quem convivi ao longo desses anos. Esse período na companhia de amigos foi a melhor experiência da minha formação acadêmica.

Aos amigos de república, Gisely, Ana Paula, Eliete, Joyce e Amanda.

A todos os meus familiares e amigos que mesmo distantes estão sempre torcendo por mim, em especial aos meus avós Rosa e Vital.

Muito Obrigada!

“FELICIDADE: É ter a oportunidade de viver intensamente todos os momentos de uma existência. É olhar para trás e ver que está valendo a pena. É acreditar que tudo que acontece é para o meu bem e para me fazer cada dia mais feliz. A minha felicidade é feita das coisas simples e de pessoas maravilhosas.

Eduardo Botelho, Minutos de Felicidade.

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Bioetanol 17
2.2 Matéria-prima lignocelulósica 18
2.2.1 Bagaço como matéria-prima 19
2.3 Fermentação alcoólica 21
2.3.1 Hidrolisado de bagaço e melaço como substrato para fermentação 22
2.3.2 Processo industrial brasileiro 22
2.3.3 Inibidores fermentativos 24
2.4 *Saccharomyces cerevisiae* 26
2.4.1 Condições estressantes para a levedura 29
2.5 Evolução adaptativa 29
3 OBJETIVO 31
4 MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* 35
4.2 Reativação das linhagens 35
4.3 Propagação das linhagens 36
4.4 Condução da fermentação 36
4.5 Avaliação do crescimento em microplacas 36
4.6 Cariotipagem 36
4.7 Evolução adaptativa 37
4.7.1 Avaliação do crescimento dos produtos da evolução adaptativa em ensaio com microplacas 37
4.8 Pré-seleção 1 - mediante ensaios de fermentação com reciclo de células 38
4.8.1 Pré-seleção 2 - mediante ensaios de fermentação com reciclo de células 38
4.9 Avaliação das linhagens isoladas de destilarias brasileiras 38
4.9.1 Pressão seletiva sobre as linhagens 39
4.9.2 Avaliação dos isolados evoluídos e das linhagens oriundas de destilarias mediante crescimento em microplacas 39
4.9.3 Pré-seleção mediante ensaios com reciclos fermentativos 40
4.10 Avaliação final (referente à primeira etapa de seleção, figura 5) 40

4.11 Seleção mediante hibridação de linhagens (segunda etapa da seleção -Figura 6) 40
4.11.1 Dissecação das tétrades 41
4.11.2 Cruzamento direcionado 41
4.11.3 Cruzamento Massal 42
4.11.4 Avaliação em microplaca dos isolados gerados durante o cruzamento massal e direcionado ... 42
4.12 Avaliação mediante ensaios com reciclos fermentativos dos produtos dos cruzamentos massal e direcionado 42
4.13 Determinação do teor de etanol 43
4.14 Determinação de biomassa 43
4.15 Estimativa de viabilidade 43
4.16 Quantificação de açucares residuais 43
4.17 Determinação da trealose 43
4.18 Extração e quantificação de glicogênio 44
4.19 Determinação da velocidade de fermentação 44
4.20 Análises estatísticas 44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Cariotipagem eletroforética da linhagem parental (SA-1) 45
5.2 Evolução adaptativa 46
5.3 Pré-seleção 1- Ensaio fermentativo com reciclo de células 48
5.4 Ensaio fermentativo com reciclo de células 51
5.5 Avaliação individualizada das linhagens oriundas de destilarias mediante crescimento emmicroplacas 56
5.6 Pré-seleção por meio de ensaios com reciclos fermentativos 61
5.7 Avaliação final 65
5.8 Obtenção e seleção dos haploides 73
5.9 Cruzamento direcionado 76
5.10 Cruzamento Massal 78
5.11 Ensaio fermentativo dos híbridos selecionados a partir dos cruzamentos massal e direcionado .. 80
6 CONCLUSÕES 85
RFERÊNCIAS 87
ANEXOS 97

RESUMO

Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

A busca por soluções sustentáveis, levando a um processo energético mais eficiente induziu a novas tecnologias e esforços estão sendo realizados para viabilizar o etanol de segunda geração, com o aproveitamento da biomassa celulolítica como substrato para a fermentação alcoólica. Contudo, durante a hidrólise do bagaço, muitos compostos tóxicos à levedura são formados como o furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, e compostos fenólicos com efeitos depressivos sobre a fermentação. A adição de melaço no hidrolisado de bagaço poderia permitir uma fermentação com maior teor alcoólico, contribuindo para um balanço energético favorável da destilação, além de propiciar nutrientes minerais e orgânicos para a levedura. Tais nutrientes poderiam permitir um processo fermentativo com reciclo de células de leveduras aproveitando assim uma estrutura e conhecimentos já existentes na destilaria de etanol de primeira geração. O reciclo de células permitiria fermentações rápidas, porém impõe repetidas condições estressantes, o que torna um grande desafio a obtenção de linhagens com o perfil de tolerância desejado. Assim este trabalho se propôs a selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com múltiplas tolerâncias em relação aos inibidores tanto presentes no hidrolisado como no melaço. Para tal, foram impostas condições estressantes sobre culturas da linhagem SA-1 e de leveduras isoladas de destilarias brasileiras durante cerca de 62 gerações, forçando uma evolução adaptativa ou mesmo um enriquecimento/seleção de indivíduos mais tolerantes. Paralelamente a biodiversidade de linhagens isoladas de destilarias foi avaliada quanto aos atributos de tolerância aos compostos tóxicos presentes no hidrolisado do bagaço. As linhagens com maiores desempenhos foram avaliadas em fermentações com reuso de células empregando-se substrato constituído de hidrolisado e melaço, sendo que 4 linhagens se mostraram superiores às linhagens referenciais. Destas, dois isolados (242 e 408) foram esporulados e os conjuntos dos haploides foram empregados em cruzamentos massais. Simultaneamente, 273 haploides isolados das linhagens 242 e 408 foram avaliados quanto ao crescimento (DO_{600nm}) em substrato constituído por hidrolisado e melaço, sendo que 32 foram selecionados. Após a tipificação segundo o "mating type" os mesmos foram utilizados em cruzamentos direcionados mediante micromanipulação, resultando em 35 cruzamentos. Cinco híbridos de cada cruzamento direcionado foram resgatados (155 isolados), que juntamente com 80 isolados oriundos do cruzamento massal, foram novamente avaliados quanto ao crescimento (DO_{600nm}) e a seguir em fermentações com reciclo de células. Cinco linhagens se destacaram como superiores aos parentais, demonstrando que mediante o protocolo empregado foi possível incrementar o perfil de tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* para suportar os estresses impostos por um substrato para produção do etanol de segunda geração.

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

ABSTRACT

Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains tolerant to inhibitors in sugarcane bagasse hydrolysate

The search for sustainable solutions to improve process efficiency has promoted the development of new technologies, and the use of cellulolytic biomass as the substrate for fermentation has emerged as a promising second-generation ethanol production strategy. However, the hydrolysis of this material results in the formation of toxic compounds to yeast such as furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid and phenolic compounds, with deleterious effects on fermentation. Addition of molasses in the bagasse hydrolysate could allow fermentation with higher alcohol content contributing to a favorable energy balance in the distillation, as well as providing minerals and organic nutrients for the yeast. These nutrients could allow a fermentative process with yeast cell recycle, utilizing the structure and knowledge already existing in first generation process. The cell recycle enables a rapid fermentation, but imposes repeated stress conditions, making it challenging to obtain strains with the desired tolerance profile. The purpose of this study was to select *Saccharomyces cerevisiae* strains with multiple tolerances to inhibitors present in the hydrolysate and molasses. Stressful conditions were imposed on cultures of SA-1 strain and indigenous strains from Brazilian distilleries for around 62 generations, forcing an adaptive evolution or even an enrichment / selection of more tolerant individuals. In parallel, the biodiversity of the strains from Brazilian distilleries were evaluated with respect to their tolerance to the toxic compounds present in bagasse hydrolysate. The strains that showed higher performance were assessed in fermentations with cell reuse employing substrate composed by hydrolyzate and molasses. Four of the analyzed strains exhibited better performance than the reference strain. Of these, two isolates (242 and 408) were sporulated and the haploids were subjected to mass mating. Simultaneously, 273 haploids rescued from the strains 242 and 408 were evaluated for growth (OD 600 nm) in the substrate consisting of hydrolysate and molasses, and among them 32 were selected. After the characterization according to the "mating type", the haploids were utilized in direct mating induced by micromanipulation, totaling 35 crossings. Five hybrids from each direct mating were rescued (totaling 155 isolates), which together with 80 isolated from the mass mating, were evaluated for growth (OD 600 nm) and then in fermentation with cell recycle. 5 strains have excelled as superiors to the reference strain showing that by the protocol employed was possible to increase profile of tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to resist pressures imposed by a substrate for second-generation ethanol production.

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

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes de mercado e tecnologia na produção de cana-de-açúcar, conquistando o mercado externo com o uso do bioetanol como alternativa energética, uma vez que seu uso reduz em até 90% a emissão de gás carbônico na atmosfera quando comparado aos combustíveis fósseis (ÚNICA; IEA, 2007).

A busca por soluções sustentáveis, levando a um processo energético mais eficiente, induziu a novas tecnologias que visam o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos como substrato para a fermentação alcoólica. Etanol a partir da biomassa lignocelulósica é uma alternativa promissora pois poderá reduzir custos, uma vez que a matéria-prima é abundante a qual poderá atingir altos rendimentos (LIND et al.,1991). Para cada quatro toneladas de cana-de-açúcar moídas são geradas aproximadamente uma tonelada de bagaço com 50% de umidade (ANDREOLLI, 2008; LEMOS; STRADIOTTO, 2012).

Para obter etanol empregando o bagaço da cana-de-açúcar como matéria prima (2ª Geração) é necessário o pré-tratamento da estrutura lignocelulósica o qual reduz a quantidade de lignina, seguido de hidrólise até açucares fermentescíveis e subsequente fermentação por micro-organismos (HAMELINCK et al., 2005). No entanto a hidrólise deste material é acompanhada da formação de inibidores, como o ácido acético, furfural e outros, sendo que o primeiro deles sabidamente potencializa a ação tóxica do etanol, com efeitos depressivos sobre a fermentação (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

A adição de melaço no hidrolisado de bagaço de cana pode permitir uma fermentação com maior teor alcoólico, contribuindo para um balanço energético favorável da destilação, além de propiciar nutrientes minerais e orgânicos para a levedura (MORRISON, 1959; HARRISON, 1971). Tais nutrientes poderiam permitir um processo fermentativo com reciclo de células de leveduras, aproveitando assim uma estrutura e conhecimentos já existentes na destilaria de etanol de primeira geração.

A espécie mais empregada na fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica é a *Saccharomyces cerevisiae* que converte as hexoses presente no hidrolisado em etanol, entretanto, não apresenta, naturalmente, capacidade metabólica para converter as pentoses (CARDONA et al., 2010). Obter linhagens aprimoradas para tolerância simultânea aos inibidores presentes no hidrolisado visando maior desempenho diante o processo fermentativo a partir de material lignocelulósico será um diferencial (LIU, 2006).

Técnicas têm sido desenvolvidas com o intuito de gerar estirpes que apresentam maior desempenho no processo industrial. Um exemplo é o processo de hibridação sexual que a partir

do cruzamento de linhagens parentais gera híbridos que podem apresentar melhor performance em relação as estirpes progenitoras (STEENSELS et al., 2014).

Uma outra alternativa para a formação de fenótipos desejáveis quanto à tolerância aos inibidores é a evolução adaptativa que consiste em submeter linhagens à uma evolução pelo crescimento contínuo sob pressão seletiva apropriada (SAUER, 2001).

O presente estudo objetivou selecionar linhagens com múltiplas tolerâncias aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mediante exploração da biodiversidade das linhagens indígenas encontradas em destilarias brasileiras, hibridação e evolução adaptativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioetanol

Com o intuito de reduzir a dependência do petróleo importado aliado a motivação do uso de energia renováveis, foi introduzido no Brasil o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) para competir com a gasolina em veículos leves (BIODIESELBR, 2006). Entre os motivos para a produção do etanol destacam-se o desenvolvimento tecnológico e agrícola, uso sustentável do solo e água, redução da emissão de gás carbônico (CO_2) e geração de empregos (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999).

Desde o advento do Proálcool, tecnologias no setor sucroalcooleiro vêm sendo desenvolvidas, com ganhos expressivos em rendimento e em eficiência, contribuindo para que o país apresente o menor custo de produção do etanol, quando comparado com os demais produtores (GOLDEMBERG et al.; 2004).

Atualmente, a cultura da cana-de-açúcar ocupa no Brasil uma área de aproximadamente 8,5 milhões de hectares, correspondendo a uma produção total na safra 2014/15 de 659,10 milhões de toneladas gerando cerca de 35 milhões de toneladas de açúcar e 28 bilhões de litros de etanol no mesmo período (CONAB, 2015).

A produção de bioetanol pode ser classificada em etanol de primeira e segunda-geração com base no tipo de matéria-prima empregada. O etanol de primeira-geração utiliza o açúcar ou amido presente nas plantas, enquanto o etanol de segunda-geração emprega material lignocelulósico previamente convertido em açúcares fermentescíveis (RUTZ; JANSSEN, 2008).

A utilização de recursos renováveis para a produção de etanol de segunda-geração tem cada vez maior interesse pelo fato das matérias-primas não serem finitas, motivando assim a busca por soluções sustentáveis o qual inclui possuir um processo energético mais eficiente. A implantação da tecnologia de etanol do bagaço de cana-de-açúcar vem sendo considerada uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol, pois a partir da biomassa seca pode-se produzir etanol considerando somente o uso da parte celulósica (SOCCOL et al., 2010).

São gerados, anualmente, mais de 500 milhões de toneladas de bagaço sendo os dois maiores produtores o Brasil com 40% e a Índia com 19% (SUN et al., 2013). O bagaço é produzido na proporção de 240 a 280 Kg (com 50% de umidade) por tonelada de cana, sendo oriundo da moagem da cana-de-açúcar (CGEE, 2009).

É valido ressaltar que o uso de material lignocelulósico está agregando valor a essa produção uma vez que o bagaço já se encontra na usina e a palha já está produzida, necessitando apenas de novos equipamentos e o custo operacional de coleta e transporte da palha.

O aproveitamento dos excedentes de bagaço, palha e das pontas presentes no campo pode elevar consideravelmente a produção de bioetanol, sem aumentar a área plantada e o comprometimento com a produção de alimentos (CTC, 2013).

2.2 Matéria-prima lignocelulósica

São os materiais lignocelulósicos: a madeira, resíduos gerados pelo uso da madeira, resíduos agroindustriais, entre outros. Esses materiais podem ser utilizados para gerar bioetanol, no entanto algumas tecnologias são empregadas.

Dependendo do tipo da biomassa empregada, o pré-tratamento é requerido para assim aumentar a susceptibilidade desses materiais a conversão eficiente da celulose e hemicelulose em etanol (GRAY; ZHAO, 2006).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por estruturas complexas. Embora esse material possa variar entre as plantas, os três principais componentes são lignina, hemicelulose e celulose (Figura 1) (YANG et al., 2005).

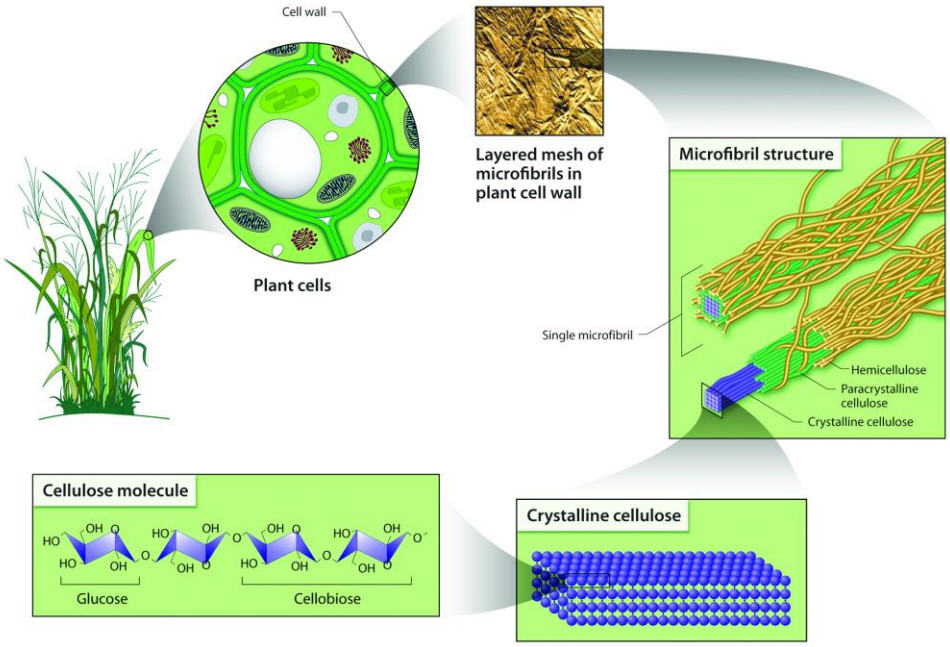

Figura 1 - Estrutura da Lignocelulose

Fonte: science.energy.gov/ber/

A lignina está presente em toda biomassa lignocelulósica e é responsável por sua rigidez, impermeabilidade e resistência. Sua estrutura é complexa, apresentando diferentes tipos de ligações (HAMELINCK et al., 2005). Durante a transformação do material lignocelulósico em etanol, a lignina é liberada como resíduo.

A hemicelulose apresenta uma estrutura de cadeias curtas altamente ramificadas sendo composta por açúcares de seis carbonos tais como galactose, glicose e manose e açúcares de cinco carbonos, arabinose e principalmente xilose (HAMELINCK et al., 2005). Sua composição varia consideravelmente dependendo do tipo de biomassa utilizada.

A celulose é um polímero de cadeia longa composto por unidades de glicose unidos por ligações β-1,4-glicosídicas. As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez enquanto as ligações intramoleculares pela formação fibrilas. Sua estrutura micro-cristalina a torna resistente, sendo dificilmente dissolvida ou hidrolisada (HAMELINCK et al., 2005).

2.2.1 Bagaço como matéria-prima

O processamento da cana-de-açúcar gera subprodutos, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. No entanto ambos possuem altos teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO, 2005). O bagaço de cana é produzido em larga quantidade e geralmente é queimado para produzir vapor no processo de aquecimento das caldeiras e/ou gerar energia elétrica para o próprio consumo, bem como para a venda.

Cerca de 140 Kg de palha são gerados por tonelada de cana-de-açúcar, entretanto é necessário manter uma parte dessa palha (cerca de 50%) na superfície do solo devido ao seu benefício para o canavial, por exemplo, ciclagem de nutrientes e diminuição de plantas daninhas (BNDS, 2008; LOMBARDI et al.,2012). Portanto nem toda a palha produzida no cultivo poderá ser utilizada na indústria, quer para produção de vapor ou etanol de segunda geração.

A composição química do bagaço de cana depende da sua exposição ao clima e aos micro-organismos, variando entre 19 a 24% de lignina, 27 a 32% de hemicelulose e 32 a 44% de celulose. Ainda podem conter, em menor quantidade, outros compostos tais como cinzas e extrativos (ROCHA, et al. 2012).

O melhor aproveitamento da biomassa residual da cana-de-açúcar para a produção de etanol como fonte de carboidratos está sendo amplamente estudado e apresenta potencial para competir em larga escala, porém é necessário avanços em sua tecnologia principalmente em relação as enzimas que apresentam alto custo e a produção inibidores durante o pré-tratamento (HU et al., 2013).

O bagaço apresenta características de recalcitrância ao ataque de agentes químicos e biológicos devido a sua composição constituída por uma complexa mistura de carboidratos poliméricos e lignina, fator limitante para o processamento desse material (CARDONA; PAZ, 2010). Devido a essa estrutura é necessário um pré-tratamento para disponibilizar os polissacarídeos através da remoção de lignina, redução do caráter cristalino da celulose e o incremento da porosidade do material seguidos de hidrólise ácida ou enzimática para obtenção de açúcares e fermentação microbiana destes açúcares a etanol (MOSIER et al., 2005). Entre os métodos de pré-tratamento principais relatados na literatura incluem aquecimento com ácido diluído e explosão a vapor.

O pré-tratamento utilizando ácido diluído é realizado sob alta temperatura e pressão em um intervalo de tempo relativamente curto. Neste processo, o ácido sulfúrico nas concentrações entre 0,5 a 1,5 por aproximadamente 160°C é o mais empregado, resultando na quebra da estrutura da hemicelulose, resultando em uma parte liquida (oriunda da hemicelulose) e uma parte sólida (celulose e lignina) e formação de compostos inibidores (SUN; CHENG, 2002).

No método de explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem a desestruturação e desagregação das fibras, além do rompimento das ligações químicas devido à alta pressão de vapor empregado. Este processo é iniciado a uma temperatura de 160 a 260ºC por vários segundos antes da exposição da biomassa ao vapor. Este processo resulta na degradação da hemicelulose e lignina potencializando o processo de hidrólise da celulose (SUN; CHENG, 2002). Compostos inibidores podem ser formados durante a desidratação da glicose e xilose em 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural respectivamente (JONSSON et al., 2013).

O tratamento térmico prévio do bagaço já pode liberar as pentoses (xilose, e arabinose) em uma fração de açúcares a ser transformada por processo fermentativo em etanol (WYMAN, 1994).

Após a etapa de pré-tratamento, a hidrólise da celulose é realizada para ser convertida em glicose. Neste processo a celulose, na presença de uma enzima específica, é convertida em celobiose. A celobiose é então hidrolisada, gerando a glicose e assim podendo ser convertida em etanol pelo micro-organismo empregado. As enzimas utilizadas neste processo são denominadas celulases, sendo divididas em endocelulases, celobio-hidrolases e β-glicosidades, sendo que cada enzima apresenta papel catalisador específico (WYMAN, 1994).

2.3 Fermentação alcoólica

O etanol é produzido pela fermentação dos açúcares, tal como a glicose, pela via denominada via *Embden-Meyerhof*. Esse processo ocorre anaerobicamente e pode ser dividido em três etapas segundo Madigan (2010):

A primeira etapa inclui a transformação da glicose em gliceraldeido 3-fosfato. Esse processo ocorre por fosforilação e ação de enzimas com consumo de energia (ATP).

Na segunda etapa ocorre a síntese de ATP e piruvato. O gliceraldeido 3-fosfato é oxidado a 1,3-bifosfoglicérico e nessa etapa a enzima gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase reduz o NAD^+ a NADH. Quando a molécula 1,3-bifosfoglicérico é convertida em ácido 3-fosfoglicérico ocorre a síntese de 2 moléculas de ATP.

A molécula 3-fosfoglicérico é convertida em 2-fosfoglicérico e está em fosfoenolpiruvato. Durante a conversão do fosfoenolpiruvato a piruvato, ocorre nova síntese de 2 moléculas de ATP.

A última etapa corresponde a síntese de produtos de fermentação. Para que ocorra a redução do piruvato a produtos de fermentação, o NADH gerado durante a etapa de glicólise deve ser oxidado em NAD^+. Esse processo ocorre durante a redução do piruvato em etanol e CO_2 por enzimas.

Outras vias metabólicas ocorrem durante a fermentação alcoólica, tanto para a formação de materiais necessários para a produção de biomassa (proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos), quanto para a formação de outros produtos relacionados com a adaptação e sobrevivência (glicerol e ácidos orgânicos). Ambas as formações ocasionam uma redução na produção de etanol, pois procedem a partir do desvio de uma parte da fonte de carbono (REED; NAGODAWITHANA, 1990).

O glicerol e os ácidos orgânicos, conjuntamente com a biomassa, são subprodutos relacionados ao equilíbrio de óxido-redução em anaerobiose, pois a fermentação alcoólica é um processo não oxidativo, e, para manter o equilíbrio de oxido-redução, todo NADH formado em reações de oxidação (decorrentes da produção de biomassa e a formação de ácidos orgânicos, como ácidos succínico e acético) deve ser consumido em reações de redução (estas últimas acopladas à produção de etanol e glicerol) (BLOMBERG; ADLER, 1992; VAN-DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). O glicerol é o produto secundário formado em maior quantidade pelas leveduras e formado na mesma via em que o etanol é sintetizado. É um metabólito osmorregulador, sendo sua formação aumentada quando há alta pressão osmótica no meio, protegendo as células na presença deste estresse (ALBERTYN et al., 1994; GUO et al., 2011).

2.3.1 Hidrolisado de bagaço e melaço como substrato para fermentação

No Brasil, é utilizado caldo da cana-de-açúcar e/ou melaço (um subproduto de usinas) como matéria-prima para a produção de etanol de primeira-geração devido a sua liderança de mercado e de tecnologia, além do maior rendimento energético obtido através do processamento quando comparado a outros tipos de cultura (HASSUANI et al., 2005).

A sacarose presente no caldo de cana é um dissacarídeo constituído de glicose e frutose. Essa molécula deve ser convertida em açúcares simples antes de serem convertidos a etanol. As leveduras possuem uma enzima em seu metabolismo denominada invertase, a qual faz a hidrólise dessa molécula para utiliza-la como suprimento energético.

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar unido à fermentação do hidrolisado possibilita a produção de etanol de primeira e segunda geração sem a necessidade de grandes alterações nas unidades de indústrias de açúcar e álcool, seja em relação a equipamentos ou condições do processo, exigindo investimentos mais baixos e consequentemente aumentando a competitividade deste produto.

A principal dificuldade encontrada no processo de fermentação da biomassa lignocelulolósica é a formação de inibidores durante a etapa de pré-tratamento, o qual interfere negativamente no micro-organismo adotado para essa conversão (HORVÁTH, 2001).

Portanto a adição de melaço ao hidrolisado de bagaço poderá proporcionar nutrientes para a levedura permitindo assim uma fermentação com reuso de células, aproveitando assim uma estrutura e conhecimentos já existentes na destilaria de etanol de primeira geração. O reciclo de células permitiria fermentações rápidas, porém impõe repetidas condições estressantes, o que torna um grande desafio a obtenção de linhagens com o perfil de tolerância desejado.

2.3.2 Processo industrial brasileiro

Nas fermentações alcoólicas industriais, leveduras se deparam com uma infinidade de fatores estressantes. Tais fatores impõem restrições às células, interferindo sobre seu crescimento e metabolismo. Estas tensões incluem: alta concentração de açúcar (estresse osmótico), temperatura elevada, alta concentração de etanol, baixo pH externo (devido ao tratamento ácido), contaminação bacteriana, entre outros sendo estes intensificados com o reciclo de leveduras (BASSO et al., 2011).

Na década de trinta surgiu o processo chamado Melle-Boinot (Fermentação em Bateladas com centrifugação), esse processo consiste na recirculação de células, no tratamento do

fermento com água e ácido, a centrifugação e, a reinserção do fermento no processo (reciclo celular). Desde então, este é o processo mais usado (75% das destilarias), pois, com o aproveitamento do fermento em várias fermentações é obtido um maior rendimento (BASSO et al., 2011).

Este processo (Figura 2) é iniciado pela adição do mosto (caldo de cana e melaço) na concentração de 18 a 22% de ART em uma suspensão com 30% de células de levedura (pé-de-cuba), resultando em um aumento na velocidade de fermentação devido à alta densidade celular. A alimentação é gradativa durante 4 a 6 horas e a fermentação finaliza com 6 a 10 horas. Ao término da fermentação, com teores entre 8 a 12% de etanol, a levedura é separada mediante centrifugação e o creme de levedura é diluído em água e o tratamento ácido é realizado com pH variando entre 1,8 e 2,5 por aproximadamente 2 horas. O tratamento ácido é feito visando eliminar contaminantes e ser reutilizado para iniciar o próximo ciclo fermentativo (BASSO et al., 2011). Segundo Lima et al. (2001) com base na dimensão do processo fermentativo, este não é realizado em condições de completa assepsia e contaminações, principalmente por *Lactobacillus* e *Bacillus*, podem estar presentes.

Contudo, o tratamento ácido pode afetar negativamente a levedura facilitando o transporte de ácidos fracos não dissociados, presentes no substrato ou mesmo produzidos pelo micro-organismo contaminante, através da membrana celular da levedura resultando em queda no valor do pH intracelular (ALVES, 1994), exigindo gastos adicionais de ATP para a levedura manter seu pH interno (NARENDRANATH et al, 2005).

No processo brasileiro ocorrem até 2 ciclos fermentativos diários, durante um período de safra de 200 a 250 dias (BASSO et al., 2011) e a temperatura varia entre 32 a 35ºC podendo alcançar até 40ºC em determinadas épocas do ano (WHEALS et al, 1999; LIMA et al., 2001; BASSO et al, 2011). Altas temperaturas podem acarretar inibição temporária da divisão celular, agregação de proteínas, alteração na função de homeostase, defeitos na estrutura e organelas, entre outros (RICHTER et al., 2010). Com o aumento da temperatura no processo fermentativo, a velocidade da fermentação aumenta. Neste contexto, a toxidez do etanol afeta a levedura levando a formação de produtos secundários (LIMA et al., 2001).

O etanol gerado durante o processo fermentativo pode agir negativamente sobre a membrana celular, alterando seu mecanismo de transporte ou até mesmo sua inativação. Enzimas também podem perder sua função afetando o seu crescimento celular (CANILHA et al., 2012).

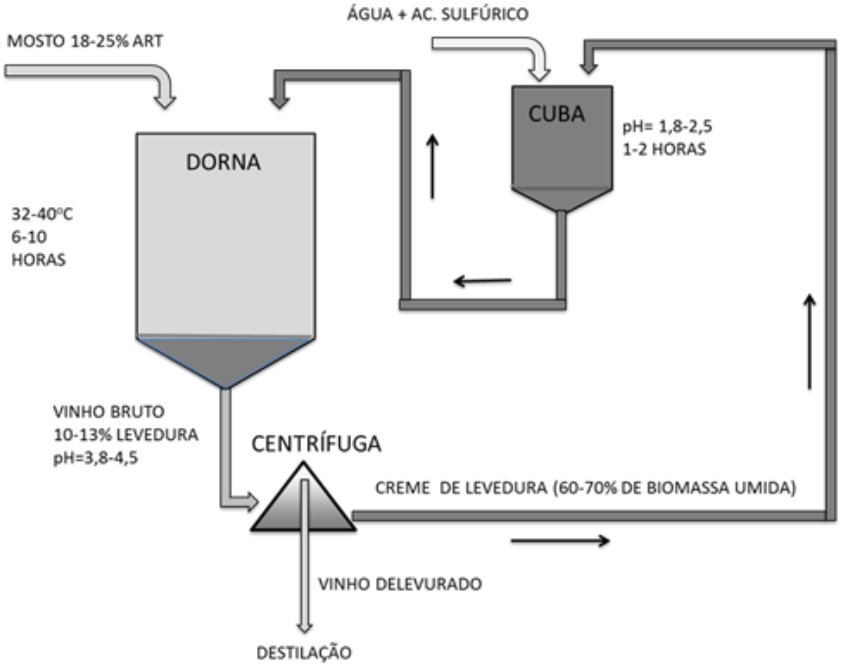

Figura 2 - Esquema do processo fermentativo tipo batelada alimentada com tratamento ácido e recirculação do fermento. O mosto é adicionado ao pé-de-cuba já contido na dorna, iniciando-se a fermentação que é finalizada após 6-10 horas. As células de levedura são coletadas por centrifugação, tratadas com ácido e reutilizadas em fermentação subsequente (BASSO et al., 2015, no prelo)

.

2.3.3 Inibidores fermentativos

No processo de fermentação do hidrolisado, sabe-se que compostos tóxicos prejudiciais ao micro-organismo fermentador são formados durante a etapa de pré-tratamento (VELMURUGAN; MUTHUKUMAN, 2011), cuja natureza e concentração dependerá da biomassa utilizada e o método de processamento empregado (SUN; CHENG, 2002). A quantidade de inibidores formados aliado ao seu efeito sob a espécie utilizada para a fermentação dependerá da adaptação da mesma ao meio e o tipo de fermentação empregado.

Ácidos alifáticos (por exemplo, ácido acético), compostos furanos (como, furfural e HMF) e compostos fenólicos são considerados os principais compostos tóxicos formados na degradação do material lignocelulósico (SAMSOM, 1955; PALMQVIST, HAHN-HÃGERDAL, 2000). Inibidores tais como furfural e ácido acético são formados afetando negativamente tal procedimento.

Segundo Jonsson et al. (2013), o ácido acético é formado pela hidrólise do grupo acetil que está presente na fração hemicelulose. O furfural é formado pela degradação das pentoses (D-xilose e L-arabinose) e o HMF, pela degradação das hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) (Figura 3).

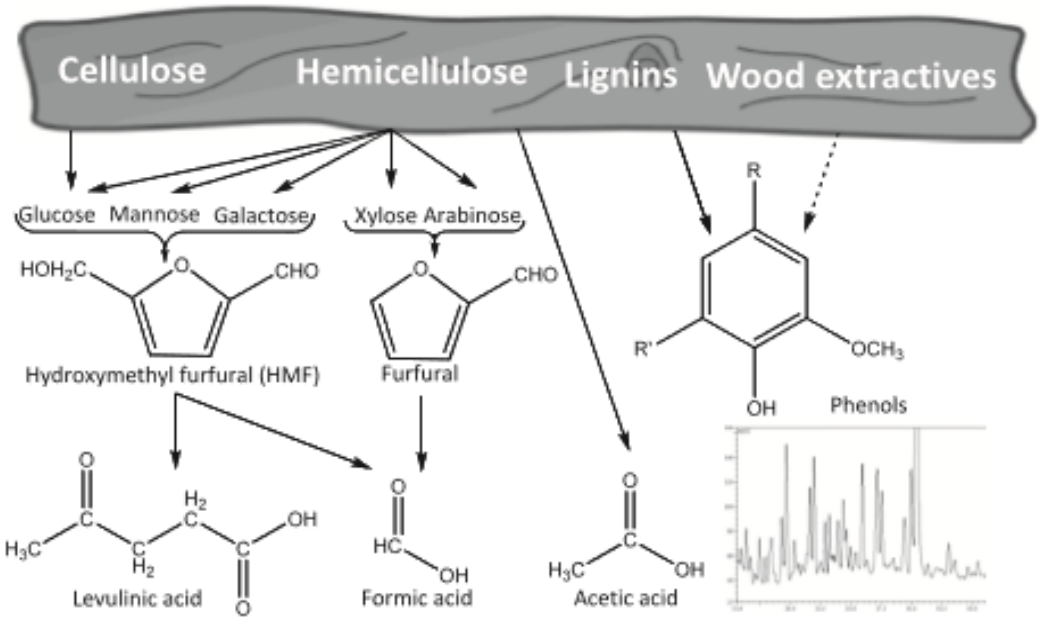

Figura 3 - Esquema indicando as principais vias de formação de inibidores (JONSSON et al., 2013)

Durante a fermentação, a forma não dissociada do ácido acético contido no hidrolisado atravessa a membrana celular do micro-organismo fermentador, o qual apresenta um pH mais alto, resultando em sua dissociação e consequente queda no valor do pH do citoplasma. Para manter o pH intracelular, é necessário o bombeamento dos prótons para fora da célula por meio do consumo de ATP o qual seria utilizado para o seu crescimento. Desta forma, é requerido maiores quantidades de ATP para manutenção deste transporte e uma alteração na morfologia celular é observada (VERDUYN et al., 1992).

O furfural e o HMF são aldeídos quimicamente reativos. Durante a fermentação, a presença do furfural mesmo que em baixas concentrações (0,05 g/L) podem afetar a viabilidade das células e sua taxa de crescimento específico (ALLEN et al., 2010). Este efeito é justificado pois enzimas glicolíticas são sensíveis a presença desse composto (PALMQVIST et al., 1999; HORVÁTH et al., 2003). A linhagem *S. cerevisiae* pode reduzir o furfural em álcool furfurilico (PALMQVIST et al., 1999). Algumas linhagens podem ter a capacidade de reduzir o HMF a 5-hidroximetilfurfurilico evitando assim que a fermentação seja inibida na presença deste inibidor (PETERSSON et al., 2006)

Dependendo das concentrações de furfural e HMF e da levedura utilizada, estes promovem a inibição da velocidade específica de crescimento do micro-organismo e

consequentemente leva a diminuição na síntese de biomassa e produção de etanol (ALMEIDA et al., 2007).

Durante a degradação da lignina, compostos fenólicos são formados os quais podem afetar a integridade da membrana plasmática da levedura resultando na perda de sua função como barreira seletiva e inativação de enzimas essenciais (HEIPIEPER et al., 1994).

É valido ressaltar que além dos efeitos individuais desses inibidores, não podemos desconsiderar o efeito sinérgico destes, o qual afeta negativamente a levedura durante o processo fermentativo (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988).

Existem tratamentos tais como detoxificação química, física e bioquímica que amenizam esses efeitos, no entanto, leva a um aumento no custo e geração de resíduos (LIU et al., 2009). Uma alternativa é o desenvolvimento de processos que reduza a formação desses compostos e a seleção de linhagens que apresentam maior tolerância a esses inibidores.

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

A espécie mais empregada na fermentação alcoolica é a S. cerevisiae, independente se a produção é feita exclusivamente do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração) ou obtido a partir do aproveitamento de biomassas lignocelulósicas (etanol de segunda geração)

Este são organismos eucariotos, com parede rígida, unicelulares, os quais se desenvolvem em uma ampla faixa de temperatura, na qual o intervalo ótimo situa-se entre 26 a 35 ºC. Seu pH interno concentra na faixa de 5,8 a 6,9, variando somente quando o pH externo for inferior a 2 ou superior a 7 (PELCZAR JR et al., 1997)

A reprodução assexuada em *S. cerevisiae* é por brotamento, onde o núcleo da célula divide-se por constrição. Parte do núcleo entra no broto juntamente com outras organelas e novo material da parede celular é secretado e a nova célula formada, na maioria dos casos, se separa da célula-mãe.

A reprodução sexuada também ocorre entre *S. cerevisiae*. As células haploides possuem em seu núcleo um conjunto de 16 cromossomos enquanto os diploides apresentam 2 conjuntos desses cromossomos (MADIGAN, 2010). As células vegetativas, de uma levedura típica, são diploides e esporos são produzidos como o resultado da meiose e, em consequência, geram células haploides.

Células de *S. cerevisiae* na presença de nutrientes adequados se reproduzem rapidamente por mitose assexuada, entretanto na sua ausência podem ser induzidas a entrar em meiose durante a qual há formação de esporos (STELKENS et al., 2014). A esporulação é uma

resposta a insuficiência de nutrientes o qual permite que uma célula diploide de origem a esporos haploides. Podemos citar como condições necessárias para a esporulação: deficiência de açúcar, oxigênio, água, temperatura e pH adequados, ausência de álcool e CO_2 (FOWELL, 1954).

S. cerevisiae é um organismo sexual o qual apresenta três tipos de células (a, α e a/α), formando até 4 esporos envolto por uma estrutura denominada asco. Para que ocorra o processo de acasalamento entre os haploides, os genes reguladores "a" e "α" secretam hormônios peptídicos, fator a e fator α, o qual induz o acasalamento (FOWELL, 1954).

O cromossomo de *S. cerevisiae* apresenta uma região denominada lócus MAT (do inglês, mating type) onde apenas um desses genes pode ser inserido determinando o seu tipo de acasalamento. As células haploides "a" somente cruzam com células haploides "α" e vice-versa. A partir da fusão das células opostas ocorre o processo de diploidização, isto é, formação do zigoto (Figura 4) (LODISH et al, 2013).

As leveduras podem ser diferenciadas em homotálicas e heterotálicas. Nas espécies homotálicas, o haploide pode mudar seu mating type durante a formação de uma colônia e assim ocorrer o cruzamento com as células da mesma colônia que não tiveram seu mating type alterado. As heterotálicas, ao se multiplicarem sempre vão dar origem ao mesmo mating type (HERSKOWITZ; OSHIMA,1981).

A linhagem PE-2, assim como outras isoladas de destilarias de etanol, são diplóides é heterotálicas (STAMBUK et al, 1998; ARGUESO et al, 2009).

O processo de hibridação tem sido utilizado para criar novas linhagens industriais, no entanto algumas cepas são incapazes de esporular.

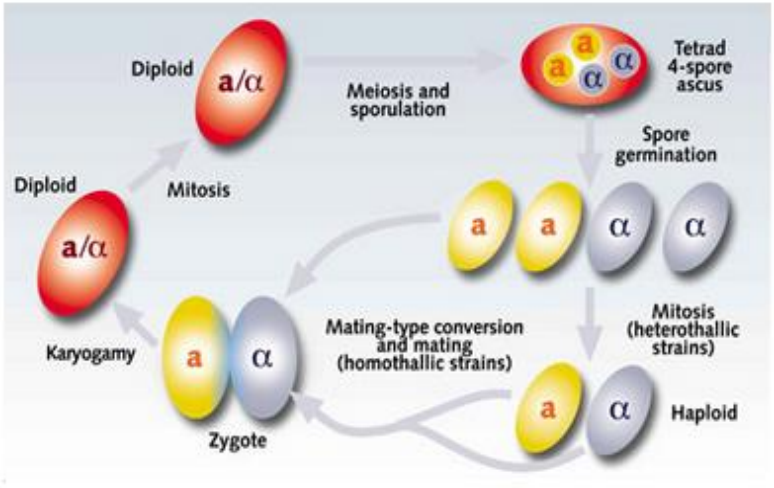

Figura 4 - Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*

A hibridação pode gerar diversidade genética e consequentemente linhagens aprimoradas. Após a esporulação, pode ser feito dois tipos de cruzamento para obter células diploides: cruzamento massal ou direcionado.

O cruzamento massal pode ser feito com apenas uma cepa ou mais, sem identificação dos haploides. Desta forma, não é possível identificar se o diploide formado foi a partir do cruzamento de duas linhagens ou entre a mesma linhagem.

O contrário ocorre no cruzamento direcionado, pois cada linhagem é esporulada individualmente e o “mating type” é realizado para identificar qual é o tipo celular (“a” ou “α”). Após o cruzamento, os núcleos se fundem e o zigoto (2n) é formado e este passa a produzir células diploides (FOWELL, 1954). O cruzamento pode ser feito inter ou intra linhagens.

A principal vantagem do cruzamento direcionado é que os haploides parentais podem ser totalmente fenotipados antes de realizar o cruzamento o qual aumenta a chance de produzir um hibrido com as características desejadas (LINDEGREN, 1949).

Há evidencias crescentes de que a hibridação ajuda a adaptação e especiação pois confere vantagens distintas para o organismo gerado. A heterose (também chamado vigor híbrido) é a tendência de um indivíduo híbrido para mostrar qualidades superiores àqueles de qualquer um dos progenitores (GIBSON; LITI, 2015).

2.4.1 Condições estressantes para a levedura

Em condições estressantes ocorre queda na viabilidade e vitalidade das leveduras, assim como na produtividade do etanol, aumento na formação de glicerol, e diminuição nos conteúdos celulares de glicogênio e trealose (BASSO; AMORIM, 1998; ALVES, 2000;). Os carboidratos de reserva, trealose e glicogênio, podem representar até 30% da matéria seca da levedura. A trealose, dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, é responsável pela manutenção de células vegetativas e esporos viáveis. A função protetora da trealose é resultado da relação entre sua localização e mobilização celular. É acumulada no citoplasma, exercendo influência na atividade de água do citosol contribuindo para a latência celular e aumentando a resistência ao estresse hídrico (PARROU et al., 1997; SINGER; LINDQUIST, 1998; ZHAO; BAI, 2009).

Os teores de trealose e glicogênio sofrem oscilações durante a fermentação, podendo terminar o processo com teores maiores ou menores em referência ao teor inicial. Os teores destas reservas são drasticamente reduzidos na primeira hora de fermentação, mas recompostos até o final da fermentação. É altamente desejável altos teores de trealose ao final da fermentação para conferir à levedura maior tolerância ao tratamento ácido, ocasião na qual tais reservas são mobilizadas para garantir a sobrevivência da levedura. (BASSO; AMORIN, 1988, 1989).

Portanto, leveduras que apresentem alto teor de trealose e que se mantem viáveis durante o processo de reciclo celular são de extrema importância para o processo fermentativo industrial brasileiro.

2.5 Evolução adaptativa

No pré-tratamento térmico do bagaço, inibidores tais como aldeídos, ácidos e fenóis são gerados levando a um efeito estressante para a levedura. Portanto linhagens que tolerem esse substrato serão úteis para a fermentação de etanol de segunda geração. Uma alternativa para a formação de fenótipos desejáveis é a evolução adaptativa das linhagens que consiste em uma evolução pelo crescimento contínuo sob uma pressão seletiva apropriada (SAUER, 2001).

A evolução permite a geração de indivíduos mais aptos ao meio em que estão submetidos. Mutantes com tolerância a múltiplos estresses foram obtidos a partir da evolução adaptativa (ÇAKAR, 2005), apresentando características de tolerância maior do que a linhagem controle.

Linhagens de leveduras podem ser submetidas a uma pressão seletiva crescente, forçando a obtenção do fenótipo desejado, contando com a ocorrência de variações genéticas, mutações e seleção natural. Este processo decorre por gerações, durante as quais eventos de

mutação selecionam as células mais bem adaptadas ao ambiente de estresse empregado propagando o seu material genético para as gerações seguintes.

A evolução adaptativa pelo método de transferências em série do inoculo exige maior capacidade de adaptação do micro-organismo, pois ao mesmo tempo em que os nutrientes estão sendo consumidos, produtos tóxicos estão sendo formados (DRAGOSITS et al., 2013).

O número de gerações para que ocorra o processo de mutação é desconhecido pois diferentes fatores podem interferir nesse processo, entre eles podemos destacar o tipo de micro-organismo utilizado bem como a pressão seletiva imposta. Segundo Sauer (2001), em condições estressantes a taxa de mutação é maior.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo geral a seleção de linhagens tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

As seguintes estratégias foram empregadas:

1. Imposição de condições estressantes determinadas pelos inibidores de interesse sobre culturas puras da linhagem industrial SA-1, visando a evolução de variantes mais tolerantes.
2. Avaliação da biodiversidade de linhagens indígenas oriundas de destilarias brasileiras.
3. Hibridação das linhagens mais tolerantes mediante cruzamentos massal e direcionado, nas busca de híbridos com tolerância aumentada em relação aos inibidores de interesse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas na Escola Superior de Agricultura 'Luíz de Queiroz' da Universidade de São Paulo.

A seleção de linhagens tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico de bagaço foi conduzida em duas etapas. Na primeira etapa (Figura 4), mediante imposição de condições estressantes sobre culturas da linhagem SA-1 durante gerações sucessivas, buscou-se por variantes evoluídos com maior tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço. Paralelamente buscou-se a identificação de linhagens indígenas (isoladas de destilarias brasileiras) com atributos de tolerância aos inibidores acima mencionados.

Na segunda etapa (Figura 5), duas linhagens que se destacaram na etapa anterior foram submetidas ao processo de hibridação entre si, sendo que a diversidade genética gerada foi avaliada na busca de híbridos com tolerância aprimorada em relação aos inibidores do hidrolisado de bagaço.

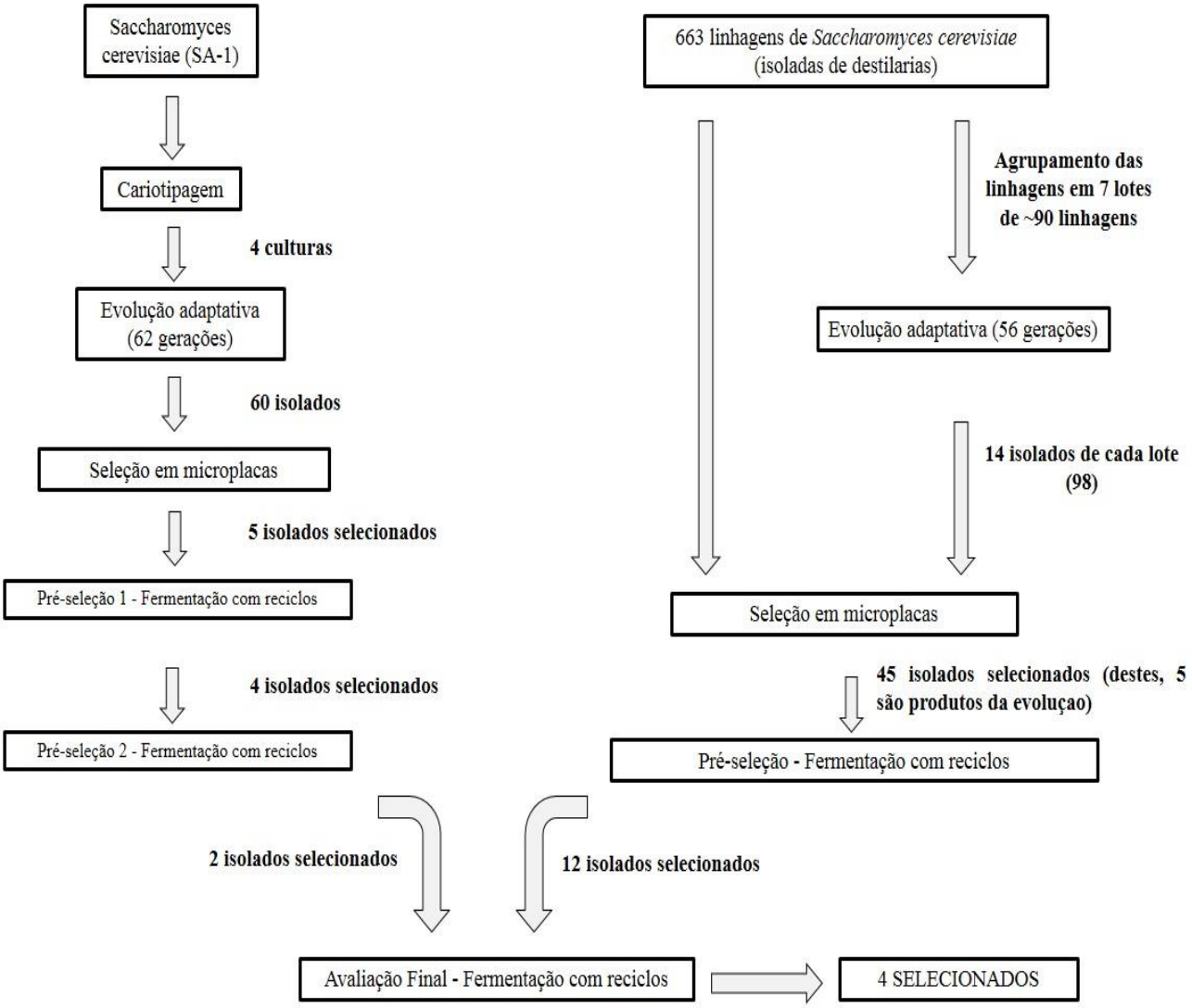

Figura 5 - Fluxograma da primeira etapa utilizadas para selecionar linhagens tolerantes aos inibidores presente no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar e as principais metodologias utilizadas

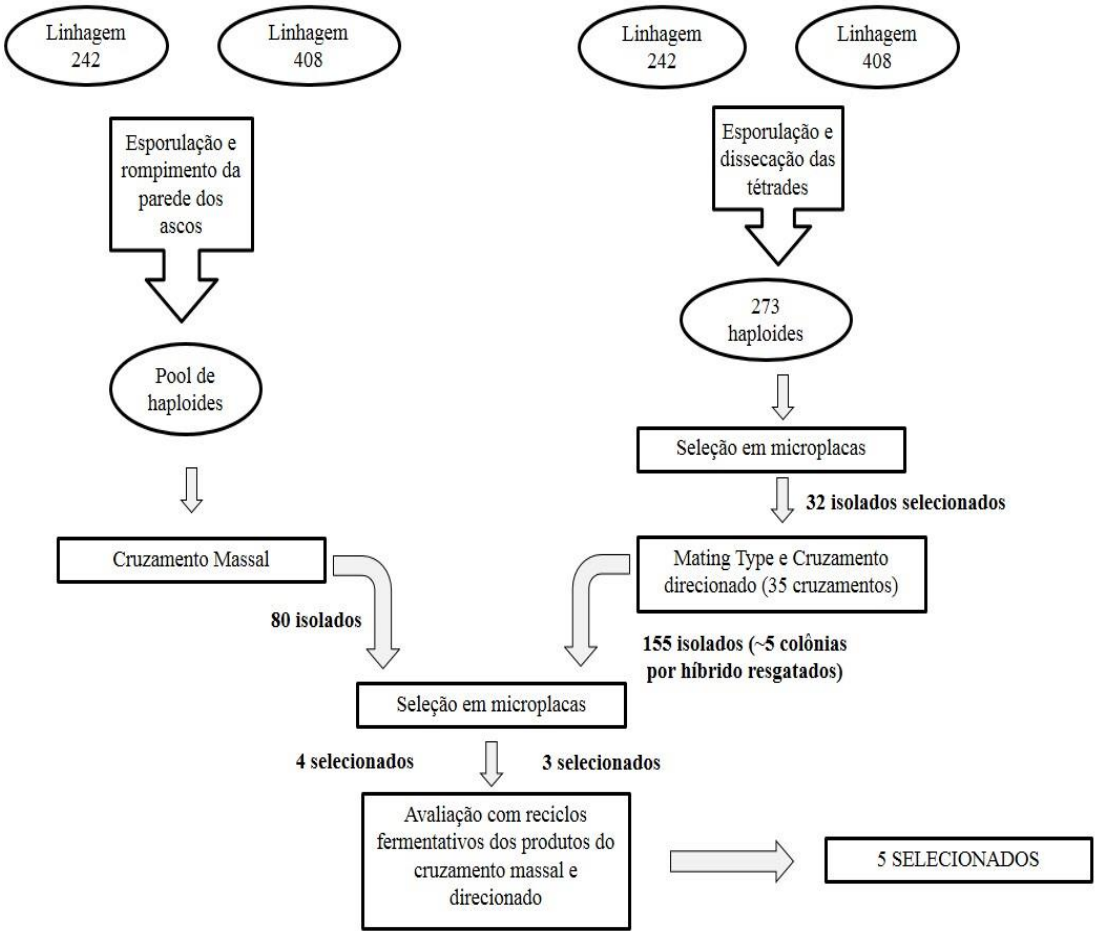

Figura 6 - Segunda etapa empregada para seleção de linhagens tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar e as principais metodologias utilizadas

4.1 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram avaliadas 663 linhagens isoladas de destilarias brasileiras, as quais estão armazenadas em glicerol 30% (p/v) a -80°C.

As linhagens utilizadas como referência neste trabalho foram PE-2, SA-1 e de panificação (ITA). As duas primeiras por serem reconhecidas pela tolerância aos estresses industrial na produção de etanol e a última por ainda ser utilizada como “starter” nos processos fermentativos, porém sem capacidade de implantação em processos industriais (BASSO et al., 2008).

4.2 Reativação das linhagens

As linhagens foram reativadas pela transferência de 100 µL da cultura estoque em 600µl de YEPD liquido estéril (2% de glicose; 1% de peptona; 1% de extrato de levedura) seguido de incubação a 30°C por 24 horas.

4.3 Propagação das linhagens

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

4.4 Condução da fermentação

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em tubos de fundo cônico (Falcon) de 50 mL de capacidade, nos quais foram adicionadas as biomassas das leveduras propagadas nas quantidades apropriadas para cada ensaio. As fermentações se iniciavam pela adição do mosto e incubação na temperatura desejada, ao final das quais o material era centrifugado (4.000 rpm/15minutos), separando-se o vinho da levedura. A massa de levedura era pesada e reutilizada em fermentação subsequente, perfazendo-se de 5 a 7 ciclos fermentativos.

4.5 Avaliação do crescimento em microplacas

Para a avaliação do crescimento (estimado em triplicata) foram utilizados microplacas de 96 poços, contendo 20 µL do cultivo (inóculo, obtido pela reativação das linhagens/isolados) juntamente com 90 µL do substrato, seguido de incubação a 30°C em leitor multifuncional de microplacas (Tecan, modelo Infinite M200). As leituras de Densidade Ótica (DO 600nm) foram coletadas a cada 2 horas por um período de 24horas e com agitações prévias de 10 minutos antes das leituras.

4.6 Cariotipagem

A linhagem SA-1 foi reativada em tubo contendo 3 ml do meio YEPD líquido por 48 horas a 30°C e plaqueada em YEPD sólido (2% de ágar). Após incubação por um período de 72 horas a 30°C, 15 colônias da linhagem foram isoladas e cariotipadas.

Para tal foi utilizado o protocolo desenvolvido por Blondin e Vézinhet (1988), com algumas modificações descritas por Basso et al., (2008). Foram suspensas 2-4 mg de biomassa úmida de cada colônia, individualmente, em 30µl de solução de enzima lítica e 40 µl de agarose 1,3% a 60°C contidos em molde. Os blocos obtidos após gelificação da agarose foram incubados como recomendado (BLONDIN; VÉZINHET, 1988) e submetido à Eletroforese de

Campo Pulsado a 14°C, modalidade CHEF, utilizando equipamento BioRad, modelo DRIII, programado para 6 V/cm por 9 horas com pulsos de 5s, seguido de 6v/cm por 8 horas com pulsos de 60 segundos, ambos os blocos com configuração angular de 120°. Após coloração com brometo de etídio, o gel foi fotografado pela iluminação ao UV, obtendo-se assim perfis de bandeamento dos cromossomos intactos.

A partir dessa análise, foram escolhidas colônias para compor 4 diferentes culturas (tratamentos): 3 culturas obtidas de colônias apresentando o perfil eletroforético dominante e 1 cultura obtida de colônia com perfil subdominante.

4.7 Evolução adaptativa

As 4 culturas obtidas da linhagem SA-1 foram submetidas a uma evolução adaptativa no transcorrer de 62 gerações, estimadas pela biomassa formada (DO a 600nm) durante as transferências dos cultivos.

Foram conduzidas 9 transferências (inoculação de 100 µl do cultivo anterior em 13 mL de meio). Os meios empregados (pH 4,62) foram obtidos pela diluição do melaço de cana e acréscimos de inibidores, sendo que durante as 9 transferências as leveduras experimentaram teores crescentes de ART (6 a 24% m/v), de ácido acético (0,6 a 2,4 g/L) e de furfural (0,8 a 4 g/L). A partir da segunda transferência foi acrescentado etanol para resultar em teor inicial de 5% (v/v). As fermentações foram conduzidas a 30°C, sendo que o tempo de incubação foi estabelecido como sendo o suficiente para o consumo total dos açúcares (até a ausência de produção de CO_2). Após a evolução adaptativa cada uma das culturas foi novamente plaqueada em YEPD sólido, sendo que 15 colônias isoladas ao acaso de cada cultura evoluída foram resgatadas assepticamente, resultando em 60 isolados e nomeados utilizando as letras SA para identificar a linhagem parental SA-1 seguido da identificação da colônia (C) escolhida para a evolução assim da colônia evoluída. Após crescimento em 600µl de YEPD líquido, estes isolados foram armazenados com glicerol 30% (p/v) a -80°C.

4.7.1 Avaliação do crescimento dos produtos da evolução adaptativa em ensaio com microplacas

Os 60 isolados evoluídos, juntamente com as colônias que lhes deram origem e a referência SA-1 foram reativados conforme descrito no subitem 4.3 e avaliados quanto ao crescimento em microplaca segundo subitem 4.7. O meio empregado foi constituído de hidrolisado de bagaço acrescido de melaço de cana resultando em 13,4% de ART (sendo 20%

deste valor oriundo do hidrolisado, sem considerar a xilose), 0,81 g/L de ácido acético, 0,13 g/L de furfural, 0,35 g/L de 0,036 hidroximetilfurfural (HMF) e 4% (v/v) de etanol.

4.8 Pré-seleção 1 - mediante ensaios de fermentação com reciclo de células

Os isolados exibindo os maiores crescimentos no ensaio anterior, juntamente com as culturas que lhes deram origem, foram submetidas a fermentações com reciclo de células, simulando até certo ponto o processo industrial. Para tal foram conduzidos 5 ciclos fermentativos empregando-se 3 g de biomassa úmida de levedura alimentadas com 28 mL de mosto de melaço (pH 4,8), contendo 15% de ART, 1,2 g/L de ácido acético, 2g/L de furfural e 2% de etanol. Nos 3 últimos ciclos os teores de ácido acético e furfural foram dobrados. As temperaturas de fermentação foram de 28ºC (nos 3 primeiros ciclos) e 32ºC nos ciclos subsequentes. Estes procedimentos não foram pré-estabelecidos e sim decididos e aplicados no transcorrer do experimento, buscando incrementar as condições de estresse para destacar diferenças fenotípicas entre as linhagens.

4.8.1 Pré-seleção 2 - mediante ensaios de fermentação com reciclo de células

As 4 linhagens com melhores perfis de tolerância principalmente quanto à viabilidade obtidos na etapa anterior juntamente com as culturas que lhe deram origem foram submetidas a uma avaliação, em triplicata, mediante fermentações com reuso de células. Para tal foram conduzidos 5 ciclos fermentativos, em triplicata, empregando-se 3 g de biomassa úmida de levedura alimentadas com 28 mL de mosto de melaço (pH 4,8), contendo 2,4 g/L de ácido acético e 4g/L de furfural. Para o primeiro ciclo, o ART do mosto foi de 15,6% e nos demais ciclos 17%. As temperaturas de fermentação foram de 32ºC (primeiro ciclo) e 28ºC nos ciclos subsequentes.

As 2 linhagens com melhores perfis de tolerância, principalmente quanto à viabilidade celular, foram reservadas para uma última avaliação (em triplicata) mediante fermentações com re-utilização das células e em condições mais próximas da fermentação industrial (conforme item descrito adiante no item 4.8).

4.9 Avaliação das linhagens isoladas de destilarias brasileiras

Duas abordagens foram empregadas para a seleção de linhagens tolerantes aos inibidores de interesse. Numa delas as 663 linhagens foram individualmente avaliadas em ensaio com microplaca (conforme descrito a seguir), enquanto em outra abordagem as

linhagens foram agrupadas em 7 lotes, cada qual contendo cerca de 90 linhagens. A seguir, as linhagens agrupadas nos lotes foram submetidas a uma pressão seletiva com o objetivo de selecionar indivíduos mais tolerantes aos inibidores.

4.9.1 Pressão seletiva sobre as linhagens

A pressão seletiva foi exercida no transcorrer de aproximadamente 56 gerações, estimadas pela biomassa formada (DO a 600nm), mediante 8 transferências (inoculação de 0,5mL do cultivo anterior em 31,5 mL de meio seletivo com ação inibitória crescente, conforme Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações dos inibidores dos meios (pH 4,8) empregados em cada transferência no transcorrer da pressão seletiva aplicada às linhagens.

Transferência	ART (%)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Etanol (%v/v)
1º	13,26	2,68	0,23	0,12	0
2º	13,26	2,91	0,357	0,12	0,4
3º	13,26	3,144	0,484	0,12	0,8
4º	13,26	3,376	0,611	0,12	1,2
5º	13,26	3,608	0,738	0,12	1,6
6º	13,26	3,84	0,865	0,12	2,0
7º	13,26	4,072	0,992	0,12	2,4
8º	13,26	4,304	1,119	0,12	2,8

As fermentações se processaram a 30°C, sendo o tempo de incubação foi variável para permitir o consumo total dos açúcares (ausência de produção de CO_2).

Após a evolução, cada lote foi individualmente plaqueado em YEPD sólido e 14 colônias de cada lote (total de 98) foram isoladas, propagadas em 600 µl de YEPD líquido e estocadas em glicerol 30% a -80°C. Os isolados foram nomeados utilizando a letra L e o número correspondente ao lote pertencente e a letras col seguido de número para diferenciar a colônia evoluída que foi isolada.

4.9.2 Avaliação dos isolados evoluídos e das linhagens oriundas de destilarias mediante crescimento em microplacas

As 663 linhagens oriundas de destilarias brasileiras e os 98 isolados resultantes do processo de evolução adaptativa, juntamente com as referências (PE-2, SA-1 e ITA), foram reativados como descrito no subitem 4.3 e avaliados quanto ao crescimento em microplaca segundo subitem 4.7. Foi empregado substrato constituído por hidrolisado de bagaço acrescido de melaço resultando em teores de 13,26% de ART (sendo 15% deste valor oriundo do

hidrolisado), 4,3 g/L de ácido acético, 1,12 g/L de furfural, 0,12 g/L de HMF e 2,8% (v/v) de álcool.

4.9.3 Pré-seleção mediante ensaios com reciclos fermentativos

Das linhagens/isolados da etapa anterior, 45 que apresentaram desempenho superior ou igual às referências SA-1 e PE-2 foram novamente avaliadas em fermentações a 30°C simulando o processo industrial com 7 reciclos fermentativos. Para tal as leveduras (1g de biomassa úmida) foram alimentadas com 9 mL de substrato constituído de hidrolisado acrescido de melaço resultando em 15,4% de ART (sendo 20% deste valor oriundo do hidrolisado), 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF.

4.10 Avaliação final (referente à primeira etapa de seleção, figura 5)

As linhagens que apresentaram desempenho superior às referências, tanto oriundas da evolução adaptativa da SA-1 (subitem 4.6.4), como aquelas obtidas da pré-seleção das linhagens isoladas das destilarias (subitem 4.7.3), foram submetidas a uma última avaliação, em triplicata, mediante fermentações com reuso de células, buscando simular o processo industrial, inclusive com preparo de pé-de-cuba e tratamento ácido (pH 2,5 por 1 hora).

Para tal, 3 g de biomassa úmida de levedura foram alimentadas com 28 mL de mosto (adicionado em 3 parcelas iguais espaçadas de 2 horas). As fermentações se processaram a 30ºC, sendo que o pé-de-cuba foi formulado simulando uma concentração de 70% de fermento na centrífuga (como no processo industrial), exigindo um retorno de vinho da fermentação anterior e diluição com água para resultar em teores de levedura ao redor de 10% (m/v) ao final das fermentações.

Os mostos empregados foram formulados a base de hidrolisado de bagaço acrescidos de melaço, sendo que detalhes de sua composição assim como da condução das fermentações estão descritos nas legendas dos gráficos correspondentes (no item Resultados e Discussão).

4.11 Seleção mediante hibridação de linhagens (segunda etapa da seleção -Figura 6)

A segunda etapa de seleção foi baseada no processo de hibridação, o qual consiste no cruzamento de linhagens haploides visando gerar diversidade genética. Para tal, as 2 linhagens mais tolerantes obtidas na etapa anterior foram empregadas como fornecedoras de atributos fisiológicos, na busca de híbridos com perfil de tolerância superior aos parentais.

4.11.1 Dissecação das tétrades

As linhagens 242 e 408 (destacadas na etapa anterior de seleção) foram estriadas individualmente em placas com meio para esporulação (1% de rafinose, 2% de acetato de potássio, 2% de ágar, pH 6,8) e incubadas por aproximadamente 7 dias.

Uma porção das células esporuladas foi adicionada em um tubo do tipo eppendorf contento uma solução para digestão dos ascos composta por 4µL da enzima zimolase, 4µL de beta-mercaptoetanol, 400µL de tampão de micromanipulação (1M sorbitol; 10mM TRIS pH 7,5; 10mM Na_2PO_4; 10mM EDTA; completado para 100 mL) e encubada a temperatura ambiente até ocorrer a digestão dos ascos.

Após a digestão dos ascos, (observada ao microscópio óptico), o material foi estriado em placa de petri contendo meio de micromanipulação (2% de glicose, 2% de ágar, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de peptona). As tétrades foram dissecadas com auxílio de um micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO) e os haploides resgatados foram encubados por 48 horas a 30ºC. Os haploides foram resgatados em 600µl de YEPD líquido, crescidos por 48 horas a 30ºC e armazenados em glicerol 30% (p/v) em freezer a - 80°C. Cada haploide foi identificado por numeração juntamente com o número da linhagem parental.

4.11.2 Cruzamento direcionado

Para realizar o cruzamento direcionado intra- e entre as linhagens, todos os haploides resgatados juntamente com a referência SA-1 e as linhagens parentais foram avaliados quanto ao crescimento em microplacas como descrito no subitem 4.7 em substrato constituído de hidrolisado acrescido de melaço resultando em 15,4% de ART (sendo 20% deste valor oriundo do hidrolisado), 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF. Os haploides que apresentaram maior crescimento quando comparado às linhagens parentais e a referência SA-1 foram selecionados.

Para a identificação do tipo sexual (α ou a), os haplóides foram estriados em meio YEPD e misturados com igual porção da linhagem testadora. Após incubação a 30ºC por aproximadamente 2 horas, a formação dos zigotos era observada ao microscópio ótico.

Os haploides com diferentes reações sexuais foram cruzados e os zigotos individualizados conforme protocolo de Mortimer et al. (1994), com o auxílio de um microscópio micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO) e incubados a 30ºC por 48hs. Após esse período, os zigotos foram resgatados, crescidos em 600µL de YEPD a 30ºC por 24hs e armazenados em glicerol 30% a -80ºC.

4.11.3 Cruzamento Massal

Com o intuito de gerar possíveis cruzamentos intra e entre linhagens, os haploides oriundos das linhagens parentais foram transferidos para um erlenmeyer de 100mL contendo 50ml de YEPD líquido e propagados a 30ºC por 48h. Uma alíquota desse material foi estriada em placa de petri contendo YEPD sólido, sendo que 80 células (supostamente diploides) foram resgatadas mediante micromanipulação, crescidas em 600µL de YEPD líquido (30ºC por 24hs) e armazenadadas sob glicerol um ultrafreezer, conforme anteriormente descrito.

4.11.4 Avaliação em microplaca dos isolados gerados durante o cruzamento massal e direcionado

Os diploides gerados, juntamente com as referências SA-1 e as linhagens parentais foram reativados como descrito no subitem 4.3 e avaliados quanto ao crescimento em microplaca segundo subitem 4.7 em substrato constituído de hidrolisado acrescido de melaço resultando em 15,4% de ART (sendo 20% deste valor oriundo do hidrolisado), 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF.

4.12 Avaliação mediante ensaios com reciclos fermentativos dos produtos dos cruzamentos massal e direcionado

As linhagens/isolados que apresentaram os melhores desempenhos no ensaio com microplacas, foram submetidas a uma avaliação, em triplicata, mediante fermentações com reuso de células, buscando simular o processo industrial, inclusive com preparo de pé-de-cuba e tratamento ácido (pH 2,5 por 1 hora).

Para tal, 3 g de biomassa úmida de levedura foram alimentadas com 28 mL de mosto (adicionado em 3 parcelas iguais espaçadas de 2 horas). As fermentações se processaram a 30ºC, e o pé-de-cuba foi formulado simulando uma concentração de 70% de fermento na centrífuga resultando em teores de levedura ao redor de 10% (m/v) ao final das fermentações.

Foram realizados 5 ciclos fermentativos e as fermentações foram conduzidas utilizando substrato constituído de hidrolisado acrescido de melaço resultando em 18,7% de ART (sendo 20% deste valor oriundo do hidrolisado), 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF.

4.13 Determinação do teor de etanol

O teor de etanol dos vinhos delevurados foi dosado mediante destilação de amostra (10 ml do vinho) em microdestilador Kjeldahl seguida de densimetria digital (ANTON PAAR – DMA48) para a estimativa do teor de etanol (% v/v.). O valor fornecido pelo aparelho é multiplicado por 5 para compensar a diluição ocorrida durante a destilação.segundo protocolo de Zago et al. (1996).

4.14 Determinação de biomassa

Após cada ciclo fermentativo, os vinhos eram separados do fermento por meiode centrifugação e pesados. Para estimar a biomassa úmida, era realizada a diferença entre o peso do tubo com a biomassa e o tubo vazio pesado inicialmente.

4.15 Estimativa de viabilidade

A viabilidade foi determinada através de microscopia óptica, em objetiva de 40x, utilizando câmara de Neubauer, através de coloração diferencial (corante de eritrosina). Células viáveis, não são coradas devido a sua atividade fisiológica alta e não viáveis, são coradas de rosa (OLIVEIRA et al., 1996). A viabilidade foi expressa em porcentagem, em função da proporção de células vivas pelo total de células (viáveis e não viáveis).

4.16 Quantificação de açucares residuais

As concentrações de açucares residuais (glicose, frutose, sacarose) e glicerol foram determinadas mediante cromatografia iônica de alta eficiência (HPAEC), usando cromatrófago iônico DIONEX (modelo DX-300) equipado com coluna CarboPac PA-1 4 x 250 mm e detector de amperometria de pulso, utilizando como fase móvel NaOH 100 mM a um fluxo de 0,9 ml/min (BASSO et al., 2008).

4.17 Determinação da trealose

A trealose foi extraída a partir de 200 mg de massa úmida da levedura (massa centrifugada) pelo método de extração seletiva com ácido tricloroacético a 0ºC (TREVELYAN; HARRISON, 1956). Tal biomassa foi lavada com agua destilada gelada e precipitada mediante centrifugação em tubo de fundo cônico (3500 rpm por 10 minutos) e a extração foi feita utilizando-se 2 mL de ácido tricloroacético a 0,5 M em banho de gelo durante 20 minutos e com agitações casuais. Após centrifugação, coletou-se o extrato sobrenadante, o qual foi

armazenado em tubo eppendorf a -20ºC até momento da análise. A quantificação foi realizada mediante cromatografia liquida de alta eficiência utilizando o cromatógrafo iônico DIONEX (modelo DX-300) equipado com coluna Carbopack PA1 e detector de amperometria de pulso com eletrodo de ouro, utilizando como fase móvel NAOH (100 $mmol.L^{-1}$) sob fluxo $1ml.min^{-1}$ conforme descrito por Basso et al., (2008).

4.18 Extração e quantificação de glicogênio

O método de Becker modificado de acordo com Rocha-Leão et al. (1984) foi utilizado para determinar a dosagem de glicogênio. Para a extração, 200 mg de biomassa de cada levedura foi suspensa e posteriormente transferida para tubos de ensaio de rosca. Para cada tubo, foi adicionado 5 mL de água destilada gelada seguido de agitação em vortex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3500 r.p.m por 6 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de Na_2CO_3 0,25 M em cada tudo e estocados a -20ºC até serem analisados. O processo de quantificação do glicogênio foi mediante hidrolise enzimática com amiloglicosidade e dosagem colorimétrica da glicose liberada após reação com glicose-oxidase e peroxidase, efetuando-se as leituras a 500ηm.

4.19 Determinação da velocidade de fermentação

A velocidade de fermentação foi estimada por meio de perda de peso (CO_2). Após a primeira alimentação, os tubos eram pesados perfazendo-se a pesagem a cada duas horas.

4.20 Análises estatísticas

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cariotipagem eletroforética da linhagem parental (SA-1).

Dentre as leveduras selecionadas pela técnica de cariotipagem a partir de processos industrias de produção de etanol podemos citar BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1. Entretanto, essas linhagens podem sofrer adaptações no ambiente em que se encontram e rearranjos cromossômicos podem ser observados. Linhagens produtoras de vinho mostram que após 55 gerações de crescimento mitótico são suficientes para o surgimento de rearranjos cromossômicos (LONGO; VÉZINHET, 1993). Em processos de produção de etanol no Brasil verificou-se o aparecimento de rearranjos cromossômicos no transcorrer da safra em várias destilarias (LOPES, 2002, BASSO et al., 2008), e em alguns casos foi verificado que tais rearranjos cromossômicos estavam associados à adaptações às condições estressantes específicas da destilaria em questão (AMORIM; LOPES, 2013).

Estima-se que a cada ciclo fermentativo no processo industrial ocorra um aumento na biomassa de cerca de 5-10%, sendo possível, a grosso modo, calcular que no transcorrer da safra (250 dias com 2 ciclos fermentativos diários) a levedura (caso permaneça no processo) possa propagar por cerca de 50 gerações. Em outras palavras, a levedura tem o potencial de duplicar a biomassa a cada 10 ciclos fermentativos num período de 5 dias.

A linhagem SA-1 foi plaqueada e 15 colônias foram cariotipadas, com o intuito de verificar a homogeneidade da cultura mediante o bandeamento eletroforético dos DNAs cromossômicos intactos. É sabido que a instabilidade genética destas linhagens permite o surgimento de variantes, por vezes acompanhados de rearranjos cromossômicos, dentre os quais seria possível a existência de indivíduos com atributos fisiológicos desejáveis para a fermentação industrial (LONGO; VÉZINHET, 1993; BASSO et al., 2008; ARGUESO et al., 2009).

A diferença dos perfis eletroforéticos pode ser fruto da recombinação entre cromossomos homólogos que apresentam diferentes tamanhos. Rearranjos cromossômicos dentro de uma mesma linhagem podem ser verificados onde fragmentos cromossômicos foram deletados, translocados e duplicados por diferentes processos (FIERRO; MARTIN, 1999). Em alguns casos, essas modificações estruturais podem conferir vantagens adaptativas a estas linhagens.

A cariotipagem (Figura 7) revelou a presença de 3 perfis eletroforéticos distintos, sendo um deles dominante (colônias 1 a 13) e 2 subdominantes (colônias 14 e 15). Foram escolhidas

as colônias 2, 9, 10 e 14 para se conduzir os ensaios de evolução adaptativa, portanto incluindo colônias com perfis eletroforéticos semelhantes e distintos.

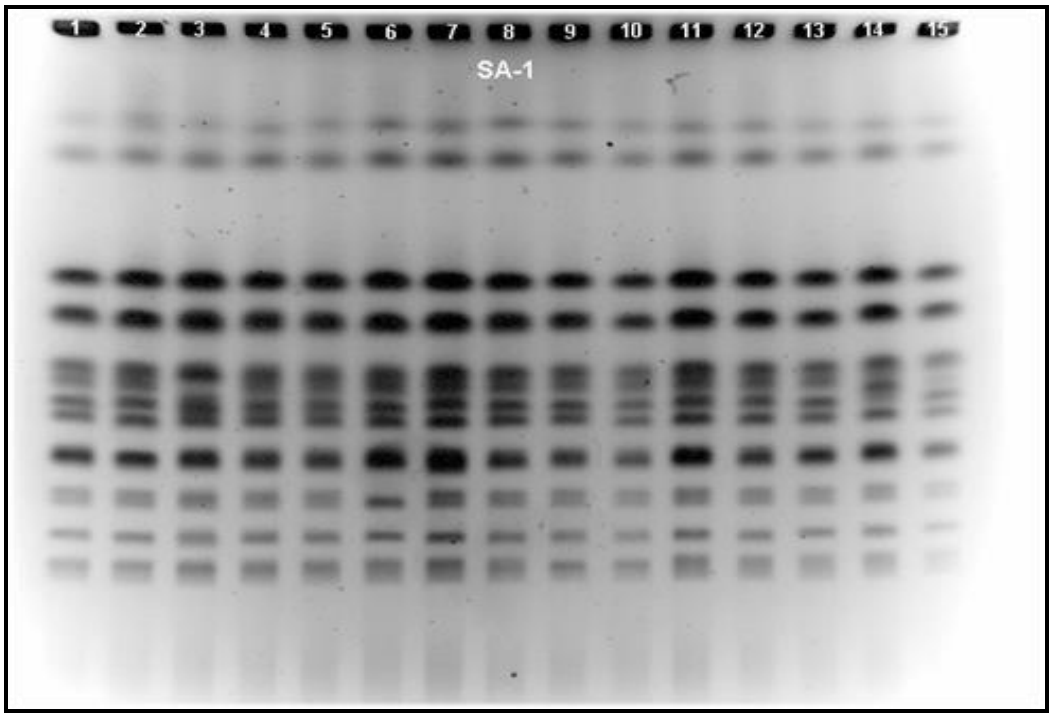

Figura 7 –Perfis eletroforéticos de 15 colônias de uma cultura da linhagem SA-1, mostrando 3 diferentes rearranjos cromossômicos. Perfis 1 a 13 (perfil dominante) e perfis 14 e 15 (dois perfis subdominantes)

5.2 Evolução adaptativa

A obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço é um dos desafios para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

A evolução adaptativa tem sido empregada por diferentes autores como uma técnica favorável à obtenção de estirpes tolerantes a múltiplos estresses. Por este processo, Stanley et al. (2010) alcançaram resultados satisfatórios quando utilizaram o etanol como pressão seletiva durante o processo adaptativo para obter linhagens tolerantes uma vez que o aumento da concentração de etanol durante a fermentação acarreta queda de viabilidade e consequentemente redução no rendimento.

Heer e Sauer (2008) submeteram a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (TMB3400) a uma evolução direcionada. Primeiro eles identificaram o principal fator de toxicidade em quatro diferentes hidrolisados e com base no resultado empregaram o furfural como pressão seletiva. Os isolados obtidos foram capazes de crescer em altas concentrações de furfural ou hidrolisados

quando comparados com a estirpe parental e exibiram características melhoradas de bioconversão em condições industrialmente relevantes.

Como observado por Ding et al. (2012), a maioria das estirpes podem tolerar um único inibidor e linhagens que possam ser tolerantes aos inibidores combinados são urgentemente necessárias.

Neste trabalho, os cultivos oriundos da linhagem SA-1 foram submetidos a uma evolução adaptativa empregando-se meio estressante contendo etanol, ácido acético e furfural, inibidores que estarão presentes na fermentação do hidrolisado de bagaço.

Os 60 isolados obtidos, após a evolução adaptativa no transcorrer de 62 gerações, foram avaliados pelo crescimento a 30ºC (DO_{600nm}) em ensaio de microplaca, em triplicata, empregando-se meio a base de melaço de cana e hidrolisado de bagaço acrescidos de inibidores (Figura 8).

Observou-se que os isolados da cultura original de SA-1 (colônias 2, 9, 10 e 14) apresentaram o mesmo crescimento, tanto entre si como em relação à cultura original. Observou-se também pequena variabilidade quanto ao crescimento dos isolados evoluídos, quer devido ao pequeno número de isolados avaliados ou pela homogeneidade fenotípica dos variantes frente aos estresses aplicados.

Mesmo assim, 5 isolados foram selecionados com perfis de tolerância iguais ou levemente superiores aos parentais e foram reservados para próxima avaliação em fermentação com reciclo de células.

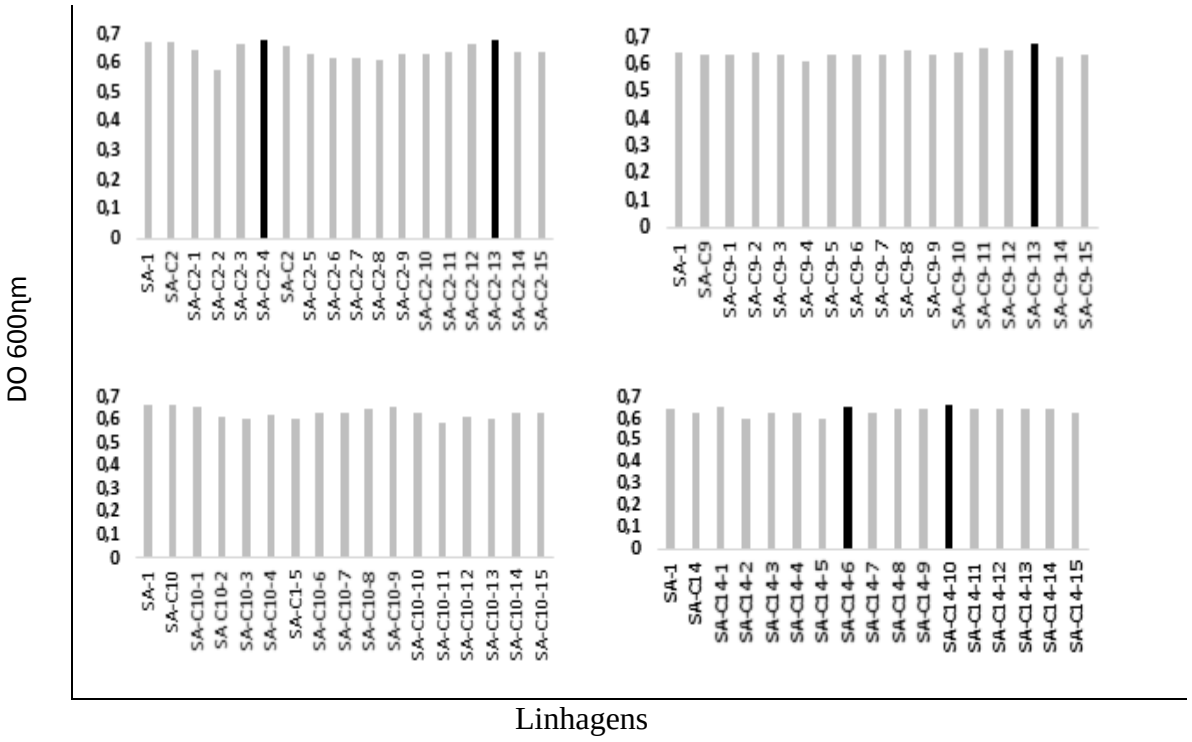

Figura 8 – DO_{24h} (600nm) dos isolados oriundos da evolução adaptativa da linhagem SA-1 em meio (pH4,8) constituído de hidrolisado e melaço (13,4% de ART, 0,81 g/L de ácido acético, 0,13 g/L de furfural, 0,35 g/L de HMF e 4%). As linhagens em destaque foram as selecionadas para a etapa posterior

5.3 Pré-seleção 1- Ensaio fermentativo com reciclo de células

Os isolados da etapa anterior, juntamente com as culturas que lhes deram origem, foram submetidos a fermentações com reuso de células, durante 5 ciclos fermentativos empregando-se mosto com 15% de ART. Com o intuito de destacar diferenças de tolerâncias entre os isolados, as condições estressantes foram aumentadas ao longo dos reciclos. Assim os teores de ácido acético e furfural foram dobrados a partir do 3º ciclo fermentativo, enquanto a temperatura foi aumentada em 2ºC nos 2 últimos ciclos.

A partir do 3º ciclo o crescimento em biomassa foi reduzido (Figura 9), enquanto os teores de etanol se elevaram (Figura 10) para todos os isolados, e com pouca diferença entre os mesmos. Estes dados são coerentes com o fato de que fatores estressantes alteram a estequiometria da fermentação, sendo que o açúcar não utilizado na formação de biomassa é desviado para maior produção de etanol (BASSO; AMORIM, 1988).

Adicionalmente, o furfural afeta severamente o crescimento celular durante a fermentação, atuando sinergisticamente com o etanol (PALMQVIST et al., 1999; TOFIGHI et al., 2010). Por outro lado, incrementos na temperatura assim como na concentração de etanol alteram a permeabilidade da membrana plasmática da levedura, facilitando a entrada de íons

H^+ (MADEIRA et al., 2010). Mediante a atividade de ATPase de membrana a levedura busca a expulsão dos prótons evitando a acidificação do citoplasma, porém com dispêndio de energia (ATP). Em tal condição a energia de manutenção das células é aumentada, reduzindo a quantidade de ATP disponível para a formação de biomassa, resultando em redução no crescimento e incremento a produção de etanol. (PAMPULHA, 1989; GUTIERREZ et al., 1991). Na condição de ausência de açúcar no meio, as reservas (trealose e glicogênio) são fermentadas para propiciar o ATP necessário à manutenção do pH intracelular.

Os efeitos drásticos dos reciclos fermentativos comprometem a viabilidade das leveduras ao final de cada ciclo fermentativo (Figura 11). Percebe-se que ao dobrar os teores de ácido acético e furfural a partir do 3º ciclo, as quedas de viabilidade se intensificaram, porém, com menor magnitude quando do aumento da temperatura. Tais quedas de viabilidade foram bem variáveis em relação aos diferentes isolados, mostrando que a estratégia adotada, de intensificar os estresses durante os reciclos, permitiu a identificação de isolados com tolerância diferenciada. Quatro linhagens se destacaram (SA-C2-4, SA-C9, SA-C14-6, SA-C14-10) com perfis de tolerância superiores à referência (SA-1) e às linhagens que lhes deram origem, e foram reservadas para avaliação posterior.

A Figura 11 confirma o fato que os reciclos fermentativos intensificam o estresse sobre a levedura. O processo industrial brasileiro com reuso de células difere enormemente daqueles nos quais é desejável e necessário intenso crescimento da levedura, como a produção de etanol de cereais (milho, trigo, etc.) e outros nos quais não se pratica o reciclo de células. A tolerância das leveduras aos reciclos fermentativos se constitui no principal atributo de uma linhagem industrial (BASSO et al., 2011), e, no presente trabalho, a viabilidade da levedura ao final dos reciclos fermentativos se constituiu no parâmetro de maior significado na seleção das linhagens pretendidas. Isto porque não existe correlação entre o teor de etanol e a tolerância da levedura aos estresses a que está submetida ao ser avaliada durante alguns ciclos fermentativos: ao contrário linhagens respondem ao estresse aumentando a produção de etanol (BASSO et al., 1988), pois em tais condições a produção de biomassa é severamente afetada.

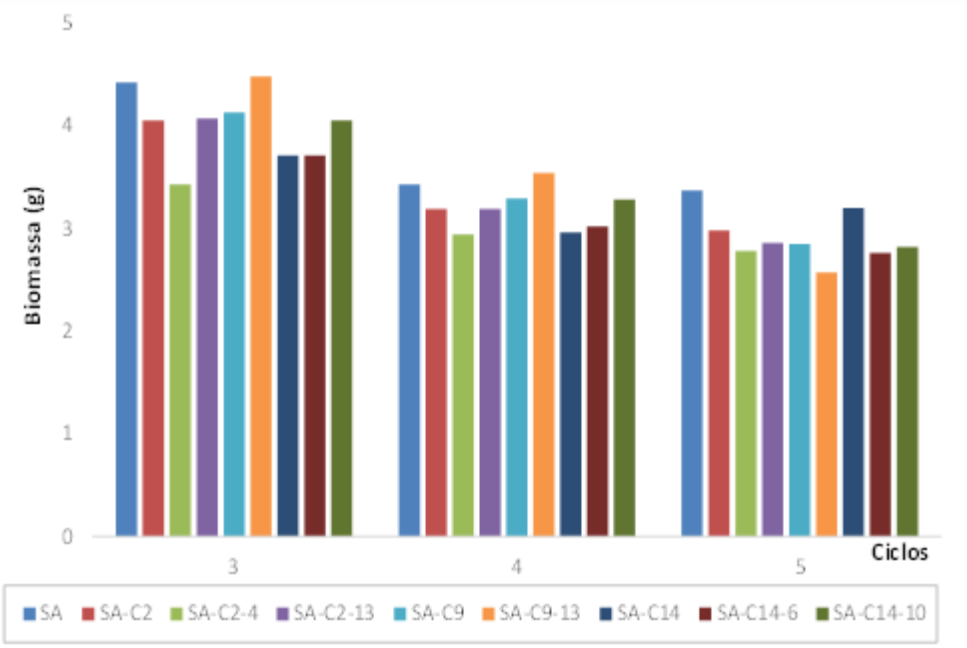

Figura 9 – Biomassa úmida (g) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em meio de melaço (15% de ART) acrescido de 1,2 g/L de ácido acético, 2g/L de furfural e 2% de etanol. Nos 3 últimos ciclos os teores de ácido acético e furfural foram dobrados. As temperaturas de fermentação foram de 28ºC (nos 3 primeiros ciclos) e 32ºC nos ciclos subsequentes

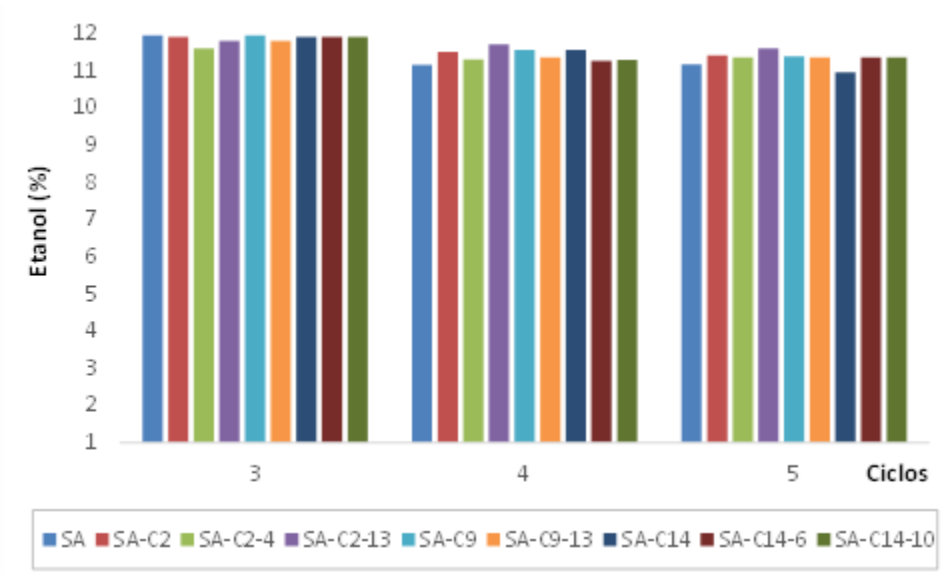

Figura 10 – Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em meio de melaço (15% de ART) acrescido de 1,2 g/L de ácido acético, 2g/L de furfural e 2% de etanol. Nos 3 últimos ciclos os teores de ácido acético e furfural foram dobrados. As temperaturas de fermentação foram de 28ºC (nos 3 primeiros ciclos) e 32ºC nos ciclos subsequentes

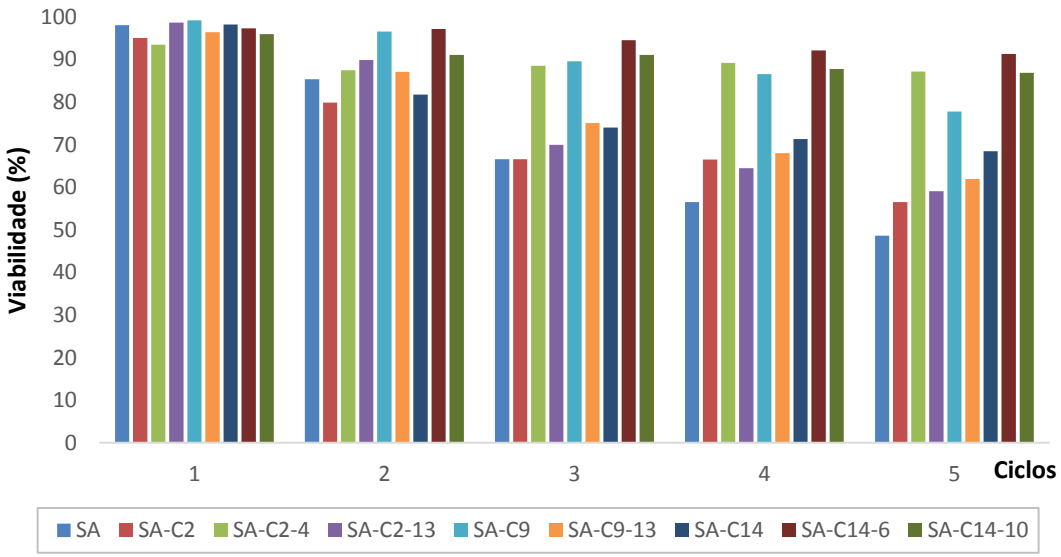

Figura 11 - Viabilidades celulares (%)das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em meio de melaço (15% de ART) acrescido de 1,2 g/L de ácido acético, 2g/L de furfural e 2% de etanol. Nos 3 últimos ciclos os teores de ácido acético e furfural foram dobrados. As temperaturas de fermentação foram de 28ºC (nos 3 primeiros ciclos) e 32ºC nos ciclos subsequentes

5.4 Pré-seleção 2 - mediante ensaios de fermentação com reciclo de células

As linhagens selecionadas no ensaio anterior, juntamente com as culturas originais foram submetidas a novo ensaio fermentativo, em triplicata, com o intuito de confirmar e filtrar com maior rigor, as linhagens com as maiores tolerâncias. Manteve-se os teores de inibidores elevados (2,4 g/L de acetato e 4g/L de furfural, pois que exerceram um efeito seletivo sobre as linhagens no ensaio anterior) e se incrementou os teores de ART, impondo estresses osmótico e etanólico.

Os resultados demonstram nenhum efeito discriminatório dos isolados ao se considerar tanto a formação de biomassa como a produção de etanol (Figuras 12 e 13). No entanto nota-se que ao se elevar o teor de ART, a partir do 2º ciclo, houve tendência de decréscimo na formação de biomassa, provavelmente devido aos estresses osmótico e etanólico aplicados simultaneamente. Tais fatores estressantes foram preponderantes para todas as leveduras, tanto assim que mesmo em temperaturas mais amenas (30ºC, aplicadas a partir do 2º ciclo), não resultou em acréscimos na produção de biomassa. Sabe-se que *Saccharomyces cerevisiae* produz maiores quantidades de biomassa quando fermentando em temperaturas mais amenas.

Novamente, como no ensaio anterior, a viabilidade se mostrou o parâmetro mais afetado (Figura 14). Embora com pouco destaque evidenciado pela significância estatística, foi possível

observar viabilidades mais elevadas para as linhagens SA-C9 e SA-C14-6, reservadas para a última avaliação.

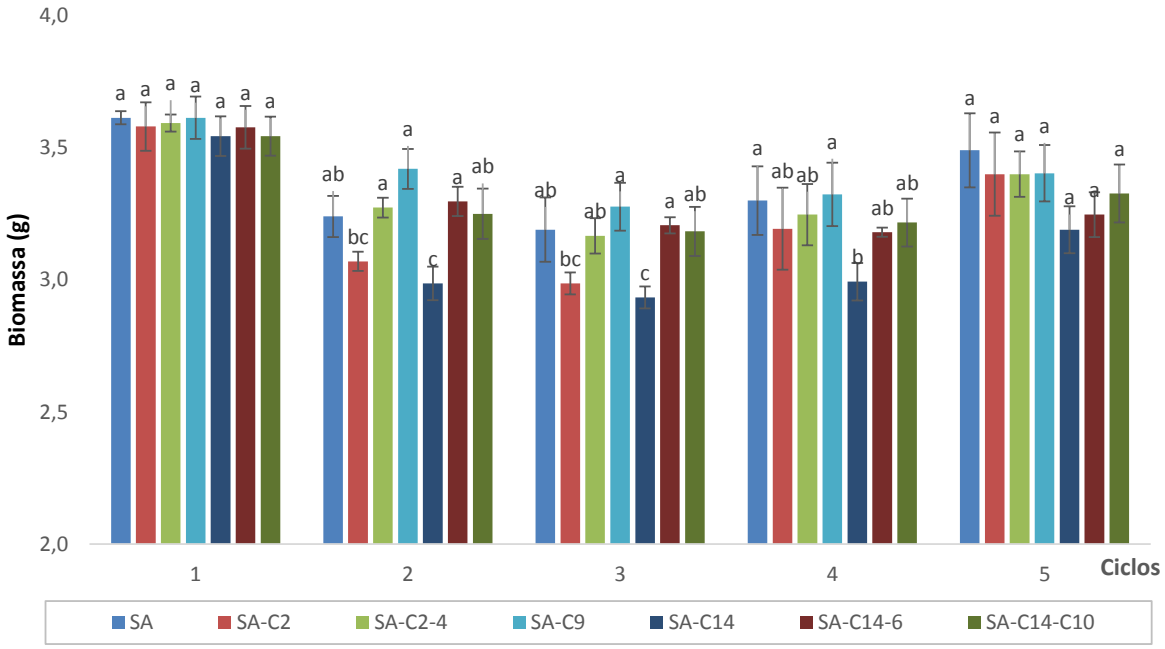

Figura 12 – Biomassa úmida (g) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em mosto de melaço (pH 4,8), contendo 2,4 g/L de ácido acético e 4g/L de furfural. Para o primeiro ciclo, o ART do mosto foi de 15,6% e nos demais 17%. O primeiro ciclo ocorreu a 32ºC e os ciclos subsequentes a 28ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

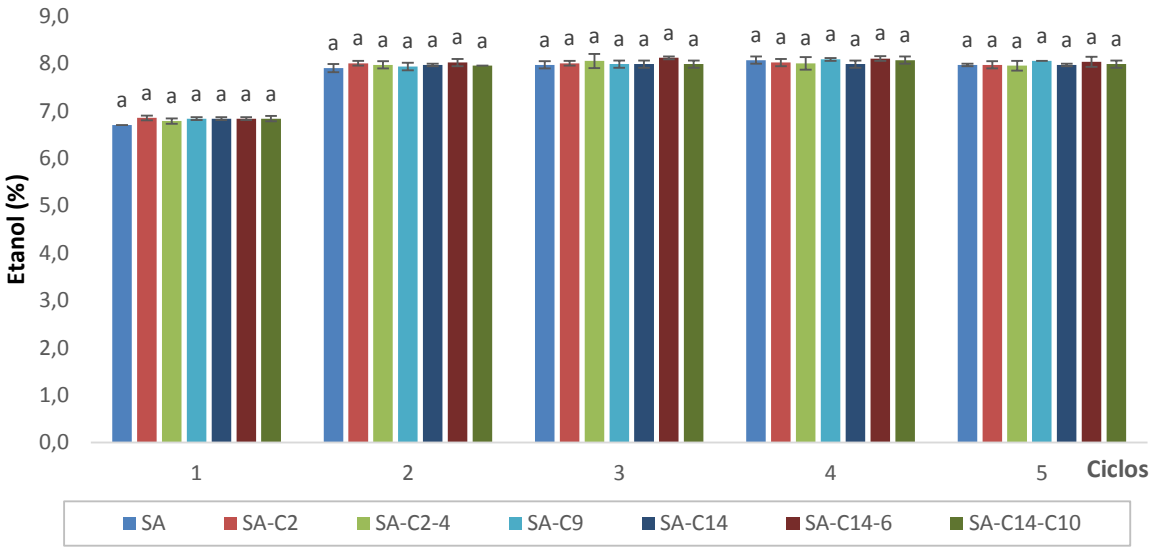

Figura 13 – Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em mosto de melaço (pH 4,8), contendo 2,4 g/L de ácido acético e 4g/L de furfural. Para o primeiro ciclo, o ART do mosto foi de 15,6% e nos demais 17%. O primeiro ciclo ocorreu a 32ºC e os ciclos subsequentes a 28ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

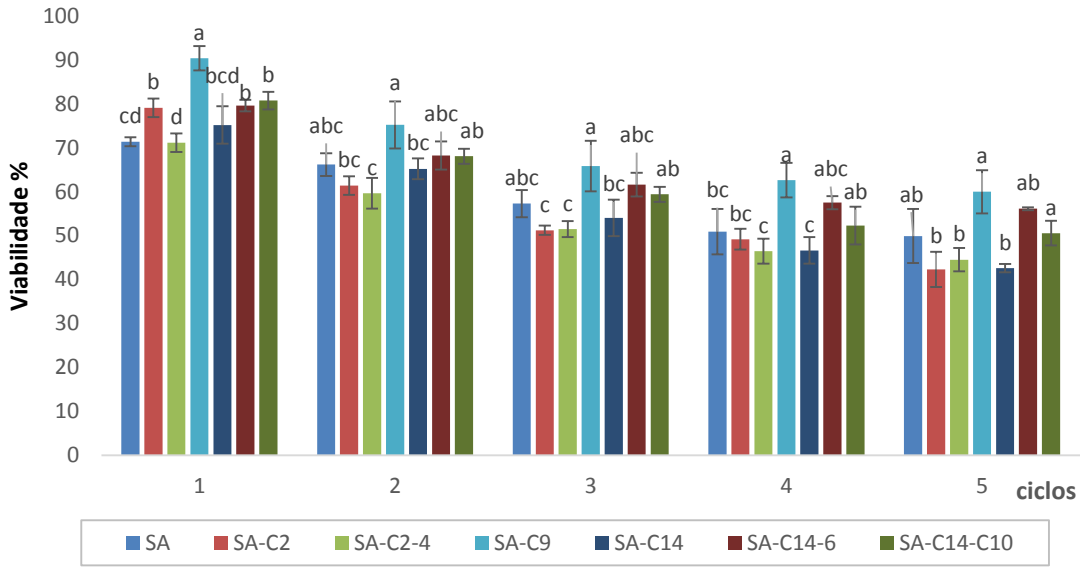

Figura 14 - Viabilidade celular (%)das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em mosto de melaço (pH 4,8), contendo 2,4 g/L de ácido acético e 4g/L de furfural. Para o primeiro ciclo, o ART do mosto foi de 15,6% e nos demais 17%. O primeiro ciclo ocorreu a 32ºC e os ciclos subsequentes a 28ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

5.5 Pressão seletiva aplicada às linhagens isoladas de destilarias e seleção dos produtos da evolução em microplacas.

O total de 663 linhagens, previamente isoladas de destilarias, foram submetidas à uma pressão seletiva, exercida durante 62 gerações. Para tal as mesmas foram divididas em lotes, com aproximadamente 100 linhagens por lote, e submetidas a cultivos repetitivos, empregando-se meio estressante com os inibidores de interesse.

Após a seleção/evolução, 98 isolados (14 colônias obtidas de cada lote) foram submetidas a uma avaliação de crescimento em microplacas em meio contendo os inibidores. Os dados de DO_{600nm} após 24 horas de crescimento estão dispostos na Figura 15, demonstrando grande variabilidade nos produtos da seleção/evolução, permitindo a seleção de 5 isolados evoluídos com crescimentos iguais ou superiores às referências, os quais foram reservados para ensaios posteriores.

A evolução adaptativa é uma técnica de grande valia para gerar descendentes com fenótipos desejáveis, ao submeter uma população à pressão contínua em cultivos seriados ou contínuos em biorreatores. Desse modo aumenta-se, periodicamente, o número de células adaptadas ao meio em relação ao número total de células na cultura, favorecendo as linhagens mais adaptadas a dominarem na população (SAUER, 2001). Tal expediente foi empregado com sucesso na obtenção de variantes com melhores atributos de natureza complexa e poligênica

como utilização de diferentes substratos, tolerância a estresses (ÇAKAR et al. 2011), incluindo compostos inibitórios como furfural e HMF (LIU et al., 2005), ácido acético (WRIGHT et al., 2011) e etanol (STANLEY et al., 2010).

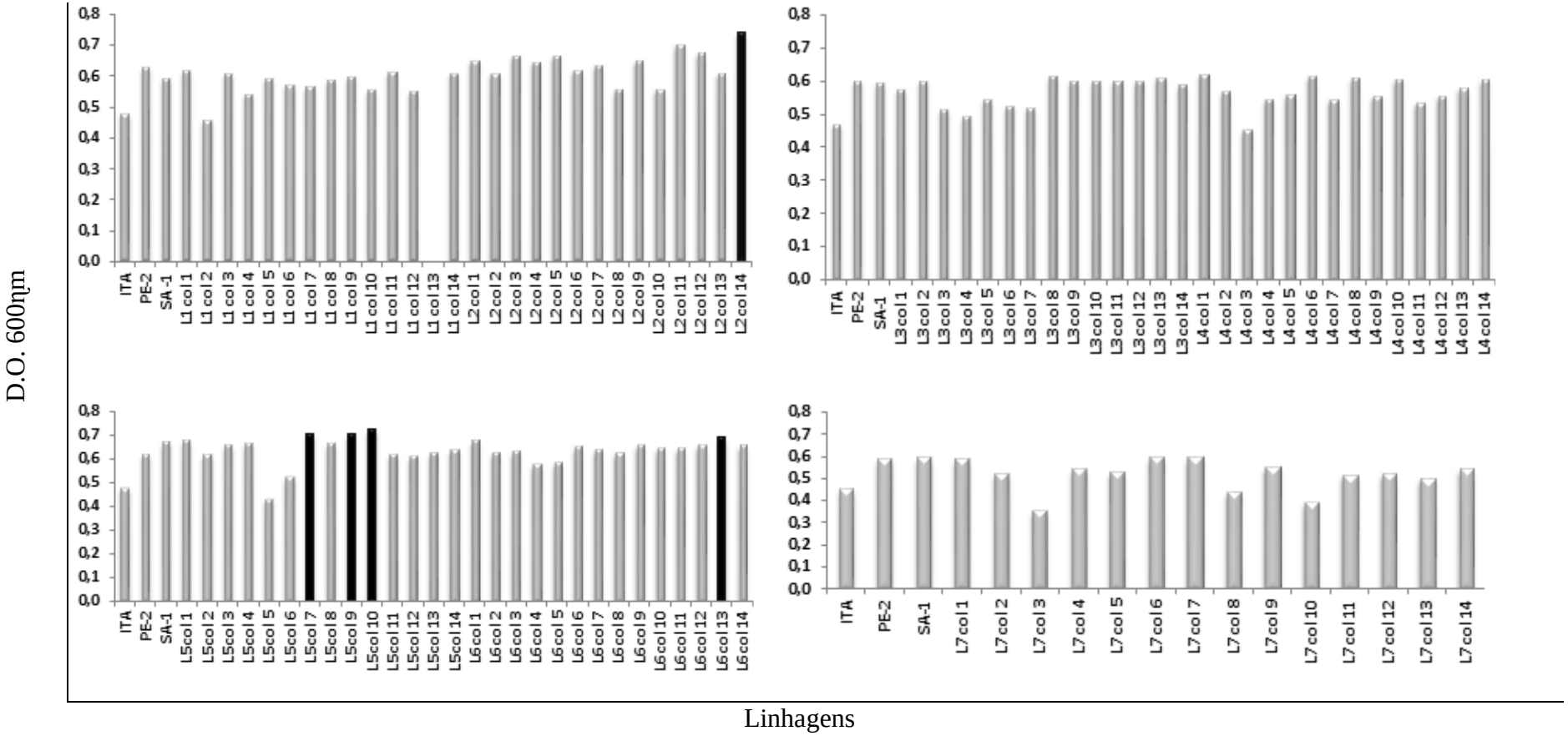

Figura 15 - DO_{24h} (600nm) dos isolados oriundos da evolução adaptativa das linhagens isoladas de destilarias em meio (pH 4,8) constituído de hidrolisado e melaço (13,26% de ART, 4,3 g/L de ácido acético, 1,12 g/L de furfural, 0,12 g/L de HMF e 2,8% (v/v) de álcool) e as referências PE-2, SA-1 e ITA As linhagens em destaque foram as selecionadas

5.5 Avaliação individualizada das linhagens oriundas de destilarias mediante crescimento em microplacas

As 663 linhagens foram individualmente avaliadas quanto ao crescimento por 24 horas em microplacas (DO_{600nm}), em triplicata, como anteriormente mencionado. Os dados obtidos (Figuras 16 a 19) evidenciam grande variabilidade entre tais linhagens indígenas. Permite também dar segurança à metodologia empregando-se microplacas na diferenciação de linhagens, pois já foi documentado que a linhagem de panificação (ITA), ao contrário das linhagens PE-2 e SA-1, não exibem tolerância suficiente para a implantação em fermentações industriais (BASSO et al., 2008). Em todas figuras apresentadas a linhagem ITA apresentou crescimento menor que as linhagens SA-1 e PE-2. Os resultados igualmente demonstram a superioridade da linhagem SA-1 em comparação com a PE-2, quanto à tolerância a um substrato a base de hidrolisado de bagaço.

Nesta etapa foi possível descartar, independentemente do crescimento apresentado, as linhagens floculantes, fenômeno visível a olho nú ao observar as microplacas. Tal característica, frequente em linhagens indígenas coletadas em destilarias, é inadequada à fermentação industrial, causando dificuldade de operação na centrífuga, sedimentação rápida e aumento no tempo de fermentação (BASSO et al., 2008).

Mediante tal protocolo foi possível selecionar 40 linhagens com parâmetros próximos ou superiores às melhores linhagens referências.

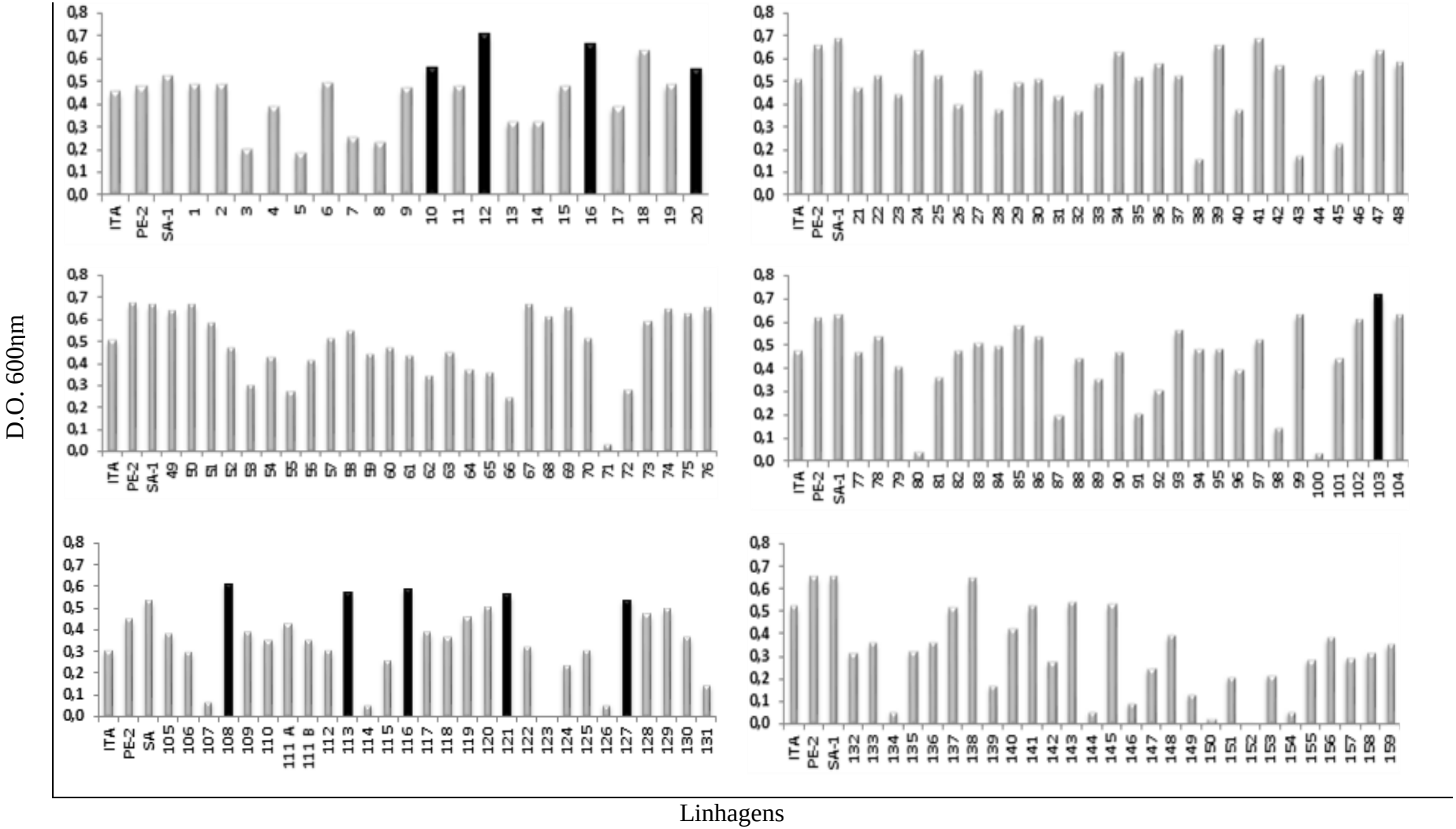

Figura 16 - DO_{24h} (600nm) das linhagens isoladas de destilarias em meio (pH4,8) constituído de hidrolisado e melaço (13,26% de ART, 4,3 g/L de ácido acético, 1,12 g/L de furfural, 0,12 g/L de HMF e 2,8% (v/v) de álcool) e as referências PE-2, SA-1 e ITA As linhagens em destaque foram as selecionadas

(continua)

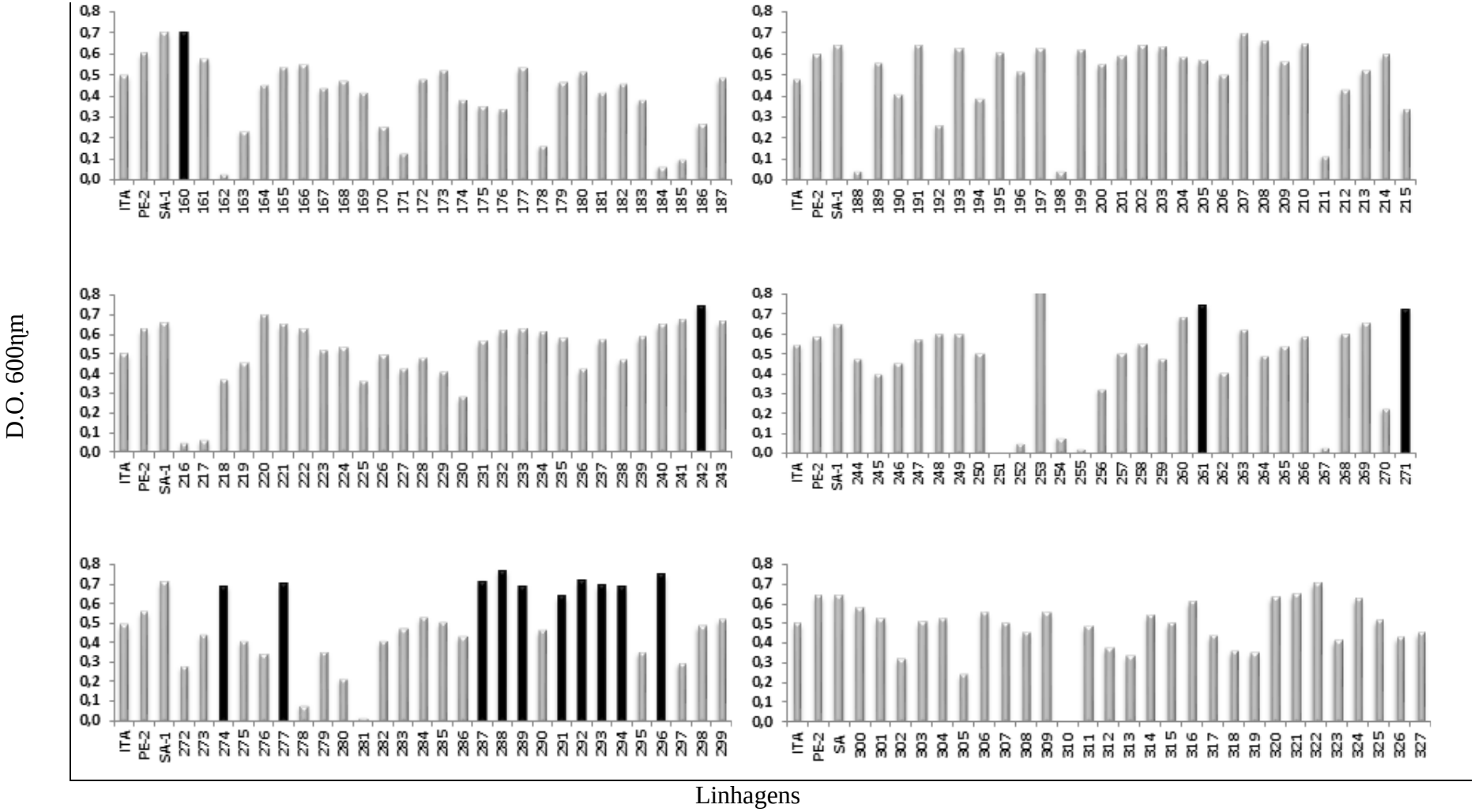

Figura 17 - DO_{24h} (600nm) das linhagens isoladas de destilarias em meio (pH4,8) constituído de hidrolisado e melaço (13,26% de ART, 4,3 g/L de ácido acético, 1,12 g/L de furfural, 0,12 g/L de HMF e 2,8% (v/v) de álcool) e as referências PE-2, SA-1 e ITA As linhagens em destaque foram as selecionadas

(continuação)

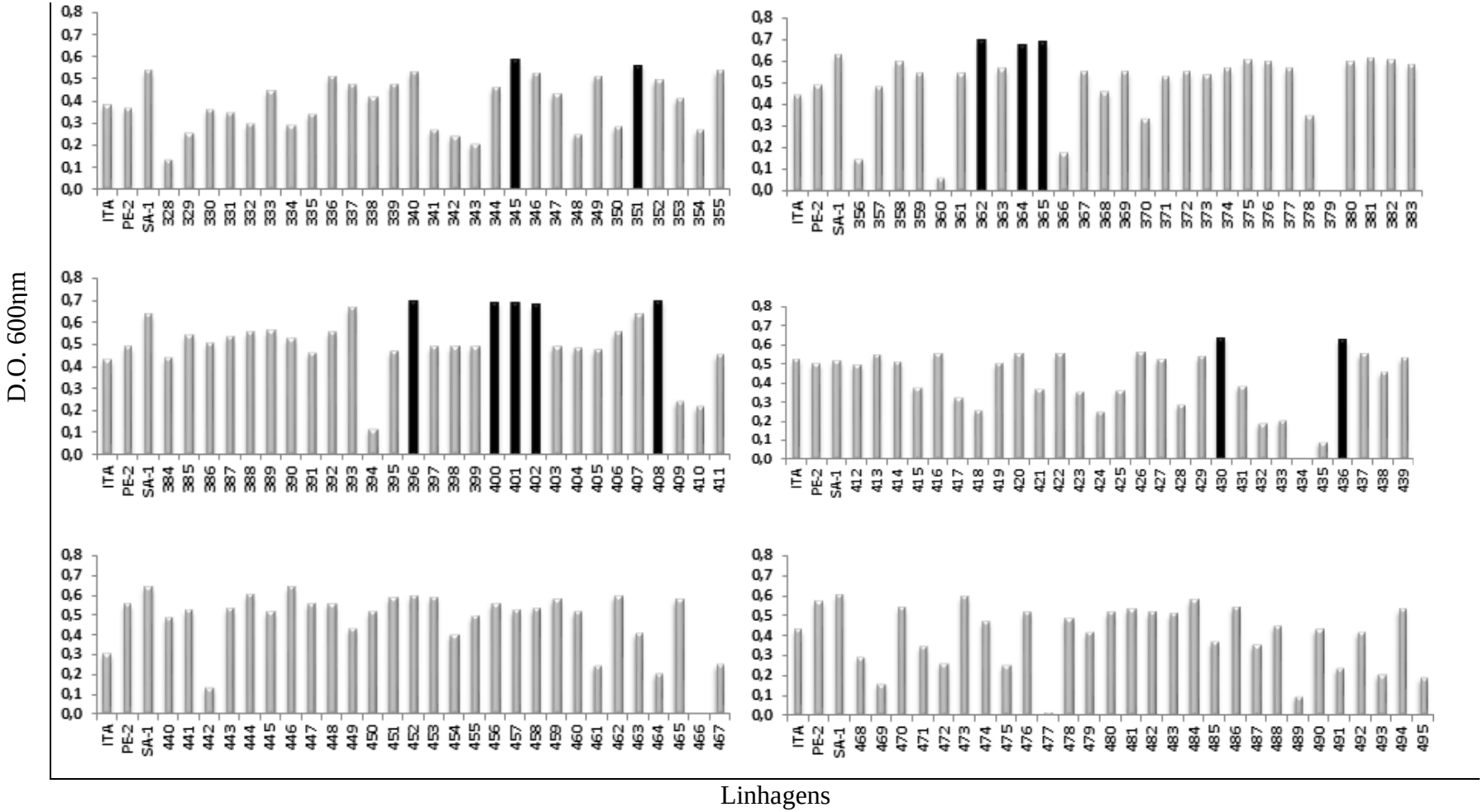

Figura 18 - DO_{24h} (600nm) das linhagens isoladas de destilarias em meio (pH4,8) constituído de hidrolisado e melaço (13,26% de ART, 4,3 g/L de ácido acético, 1,12 g/L de furfural, 0,12 g/L de HMF e 2,8% (v/v) de álcool) e as referências PE-2, SA-1 e ITA As linhagens em destaque foram as selecionadas

(continuação)

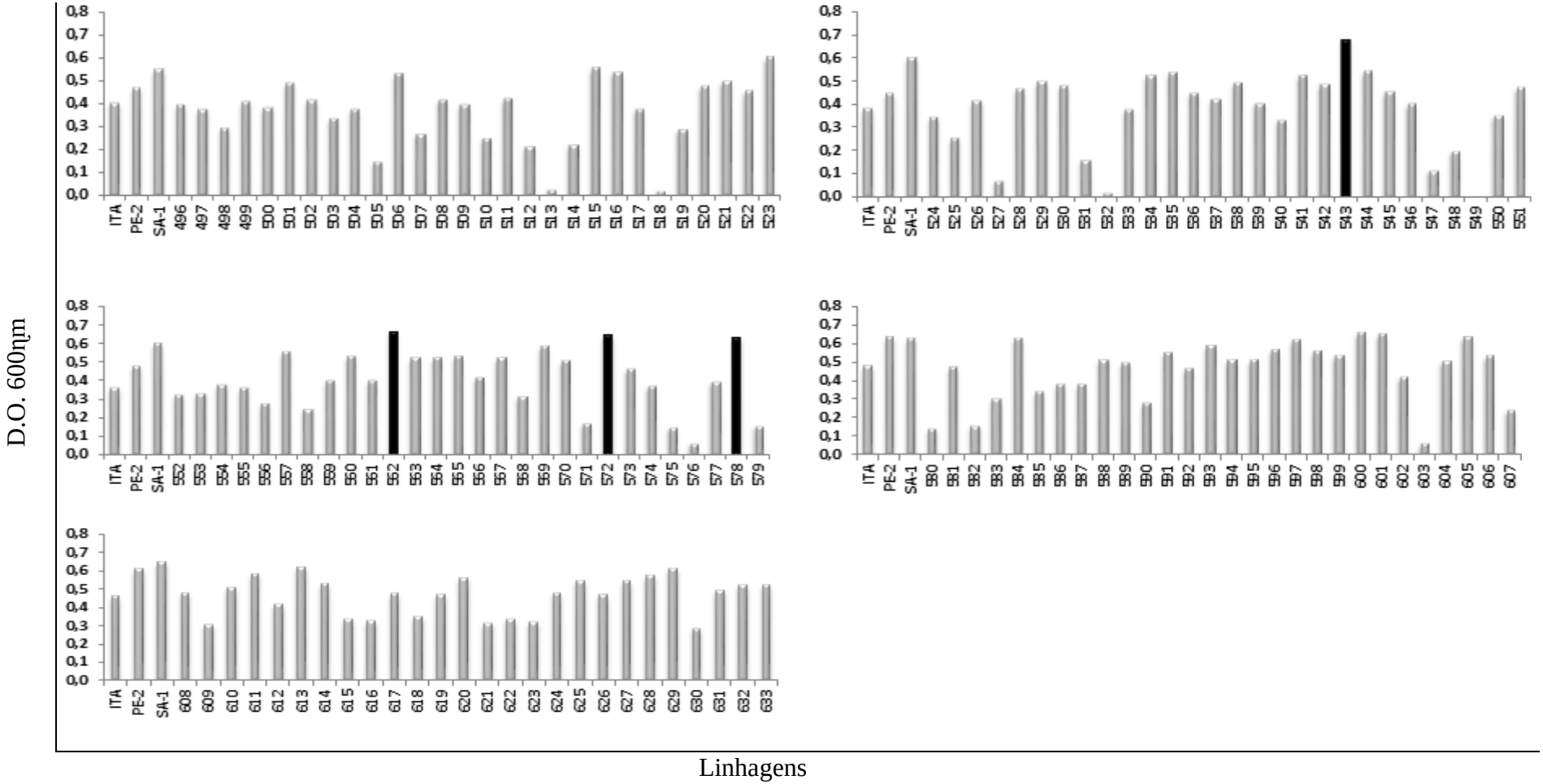

Figura 19 - DO_{24h} (600nm) das linhagens isoladas de destilarias em meio (pH4,8) constituído de hidrolisado e melaço (13,26% de ART, 4,3 g/L de ácido acético, 1,12 g/L de furfural, 0,12 g/L de HMF e 2,8% (v/v) de álcool) e as referências PE-2, SA-1 e ITA As linhagens em destaque foram as selecionadas

(conclusão)

5.6 Pré-seleção por meio de ensaios com reciclos fermentativos

A partir dos ensaios em microplacas foram selecionados 5 isolados oriundos da evolução adaptativa e 40 linhagens oriundas de destilarias, totalizando 45 linhagens as quais foram submetidas à fermentações com reuso de células, durante 7 ciclos fermentativos a 30°C em duplicata, empregando-se substrato constituído por hidrolisado e melaço.

Os resultados demonstram que ao longo dos reciclos a formação de biomassa (Figura 20 e 21) foram semelhantes para a maioria das linhagens. As linhagens que apresentaram maior crescimento quando comparados a referência SA-1 foram as cepas 12, 103, 108, 121, 242, 294, 572 e os produtos da evolução adaptativa L5col7 e L6col13.

Por exceção da linhagem 364, os teores de etanol (Figura 22 e 23) foram iguais para todas as linhagens durante os ciclos fermentativos.

Quanto a viabilidade celular apresentada nas Figuras 24 e 25, as linhagens demonstraram comportamento distintos. Ao final do sétimo ciclo percebe-se poucas linhagens com valores de viabilidade superiores a 80%. Dentre estas linhagens podemos destacar as cepas 12, 103, 242, 261, 274, 277, 288, 289, 291, 293, 294, 362, 365, 408, 430 e o produto da evolução adaptativa L5col10.

Verifica-se que a linhagem 364 exibiu redução drástica no mencionado parâmetro e como mencionado anteriormente, apresentou o menor teor de etanol.

Vale a pena ressaltar que apesar das linhagens 12 e 288 apresentarem viabilidade acima de 80% no último ciclo fermentativo (7º ciclo), estas apresentaram características de floculação (capacidade de se agregar espontaneamente e formar massas multicelulares). Tal comportamento foi confirmado durante a análise de viabilidade pela observação de cadeias ou cachos devido a não separação das células após a divisão.

Para a etapa posterior, foram selecionadas 12 linhagens que apresentaram viabilidade acima de 80% e a linhagem 572, que apesar da viabilidade estar próxima a 70%, a mesma apresentou o maior ganho de biomassa, sendo que durante as análises de viabilidade sua célula apresentava-se em tamanho maior quando comparada as outras linhagens e por tais características foi também selecionada.

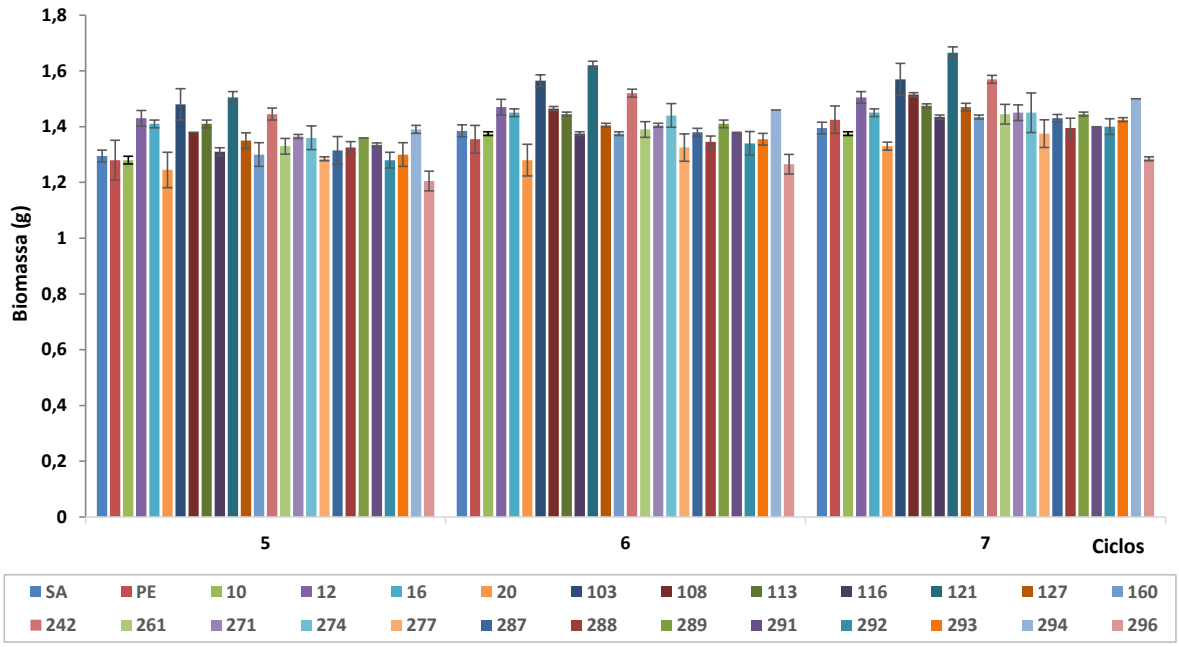

Figura 20 – Produção de biomassa úmida (g) das linhagens ao final do quinto, sexto e sétimo ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,4% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) a 30ºC

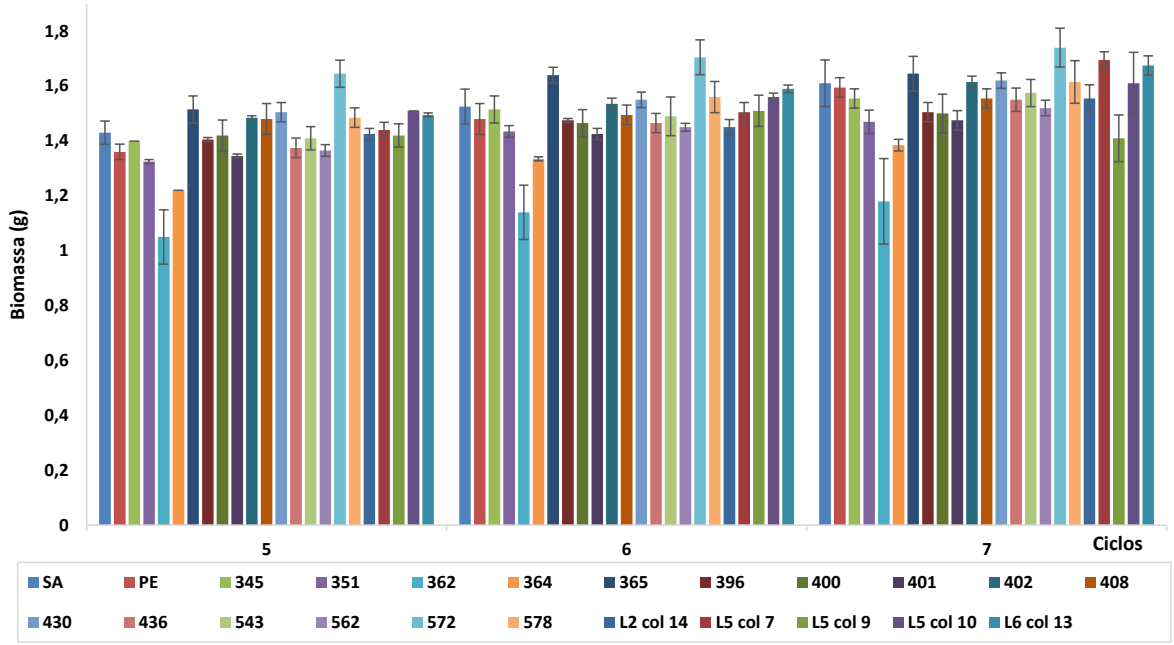

Figura 21 – Produção de biomassa úmida (g) das linhagens ao final do quinto, sexto e sétimo ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,4% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) a 30ºC

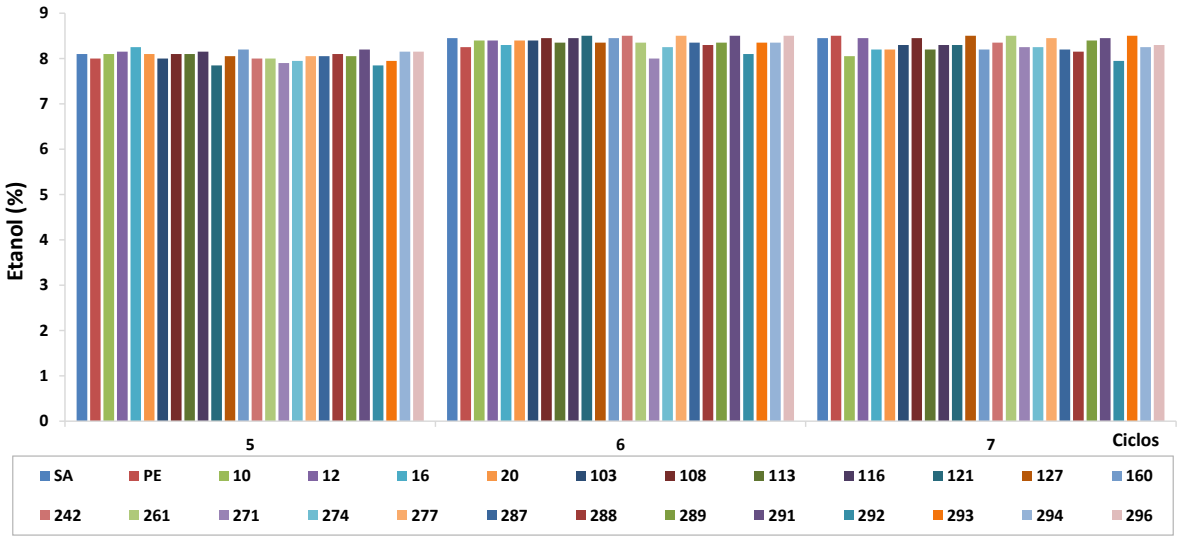

Figura 22 – Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final do quinto, sexto e sétimo ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,4% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) a 30ºC

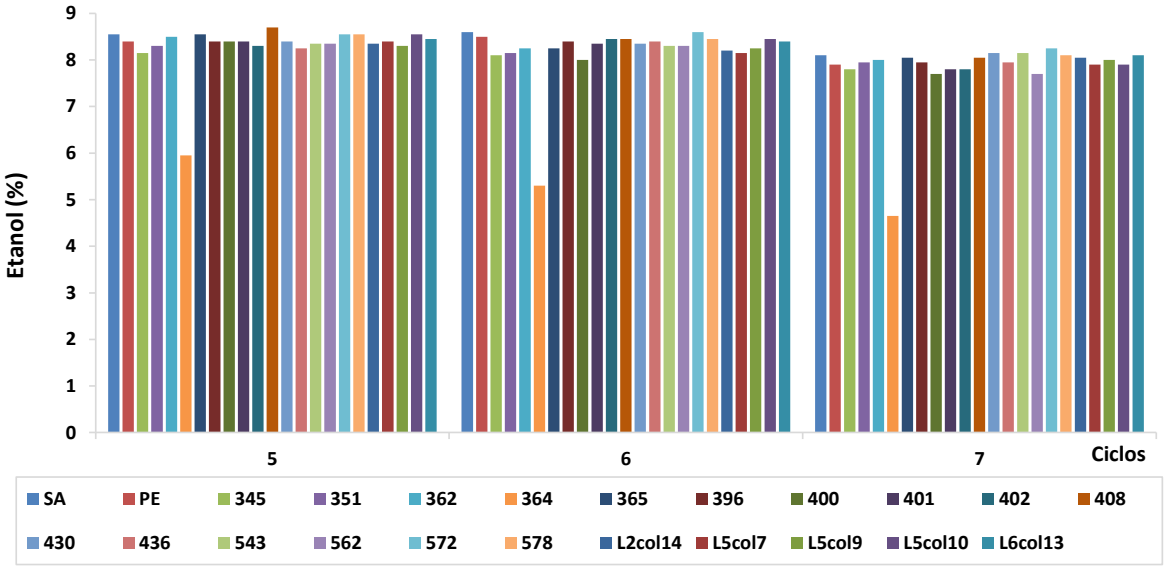

Figura 23 – Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final do quinto, sexto e sétimo ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,4% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) a 30ºC

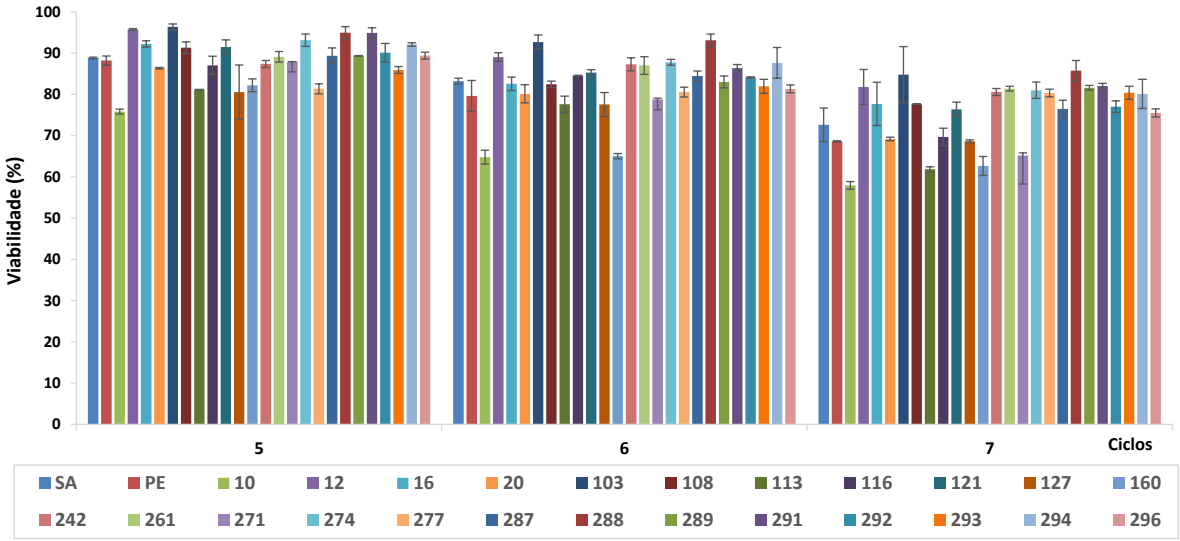

Figura 24 - Viabilidade celular (%)das linhagens ao final do quinto, sexto e sétimo ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,4% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) a 30ºC

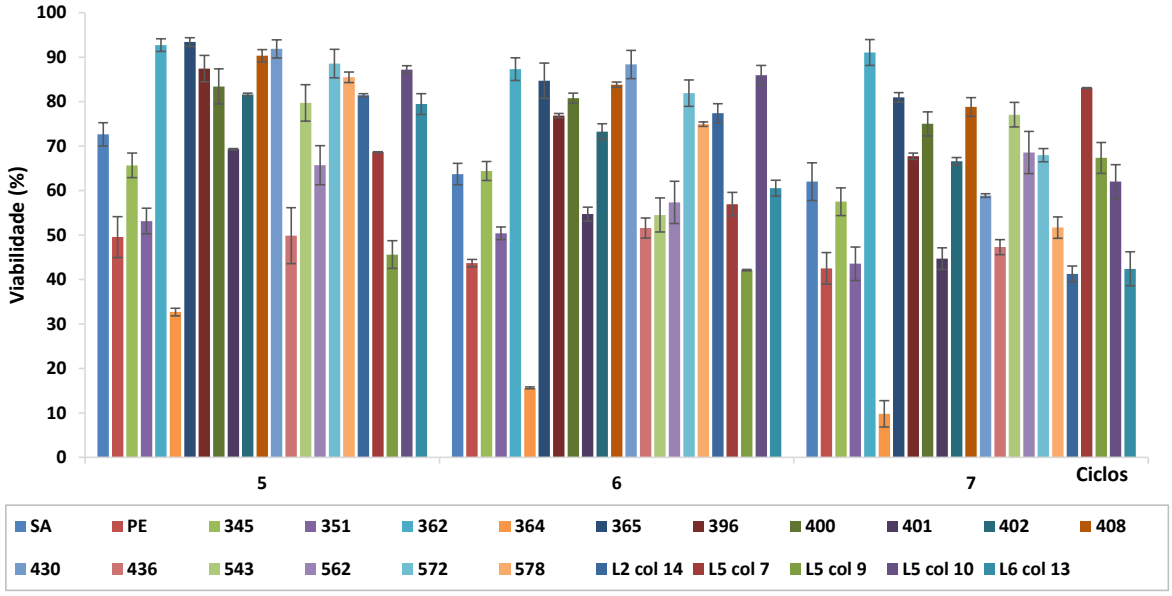

Figura 25 - Viabilidade celular (%)das linhagens ao final do quinto, sexto e sétimo ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15,4% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) a 30ºC

5.7 Avaliação final

Nesta última avaliação, o experimento foi conduzido para simular tanto quanto possível o processo industrial, inclusive com preparo de pé-de-cuba e tratamento ácido. Portanto, as linhagens que apresentaram desempenho superior às referências, tanto oriundas da evolução adaptativa da SA-1 (2 linhagens), como aquelas obtidas da pré-seleção de linhagens isoladas da indústria (12 linhagens), foram avaliadas, em triplicata, mediante fermentações com reuso de células. As 14 linhagens foram avaliadas em dois lotes, separadamente.

Os dados sobre o ganho de biomassa apresentados pela Figura 26 (primeiro lote) demonstram acúmulo progressivo de biomassa a cada ciclo. A produção de biomassa foi consideravelmente superior para a cepa 572 a qual apresentou diferenças significativas a partir do segundo ciclo quando comparado a todas as linhagens avaliadas. Em relação a referência SA-1 as que apresentaram maior crescimento foram as cepas 572, 242, 103 e 408 respectivamente. Por outro lado, a produção de biomassa apresentada pelo segundo lote (Figura 27) não revela grandes ganhos no decorrer dos ciclos.

De modo geral, analisando os valores do teor de etanol nas duas fermentações (Figuras 28 e 29), as linhagens se comportaram de forma análoga, não apresentando diferenças significativas. Nos últimos dois ciclos, no primeiro lote, foram observados maiores teores de etanol produzidos por todas as linhagens avaliadas (Figura 28). Todavia, isto ocorreu devido a concentração de ART do mosto fornecido, que foi maior para estes ciclos, porém as respostas foram idênticas para todas as linhagens.

Considerando os dados de viabilidade do primeiro lote (Figura 30), percebe-se estabilidade nos valores obtidos até o terceiro ciclo, sendo que todas as linhagens apresentaram viabilidade acima de 90%. Este comportamento possivelmente foi decorrente do uso de um substrato com baixas concentrações de inibidores, insuficientes para distinguir as linhagens em relação à referência (SA-1).

Optou-se por fazer o tratamento ácido nos quarto e quinto ciclos, buscando intensificar a ação tóxica do ácido acético, o que resultou numa queda de viabilidade de pequena monta, mas já discriminando as linhagens (Figura 30), e como anteriormente observado, com pouco poder discriminatório quanto à biomassa e especialmente em relação à formação de etanol.

O substrato utilizado no sexto e sétimo ciclos, do primeiro lote, teve concentrações maiores de inibidores (principalmente do ácido acético) e também de açúcares visando

impor uma condição ainda mais estressante para as linhagens. A forma não dissociada do ácido acético atravessa a membrana celular da levedura que apresenta valores mais alto de pH no seu interior, resultando em sua dissociação e consequente queda no valor do pH. Para manter o pH intracelular, é necessário o bombeamento dos prótons para fora da célula por meio do consumo de ATP o qual seria utilizado para a manutenção celular de levedura (VERDUYN et al., 1992). As condições estressantes impostas nos 2 últimos ciclos permitiram destacar as tolerâncias mais elevadas das cepas 242 e 408 em relação à referência (SA-1) conforme se denota pelos valores de viabilidades da Figura 30.

Quanto à viabilidade celular do segundo lote, apresentada pela Figura 31, nota-se quedas acentuadas por parte das linhagens avaliadas no decorrer dos ciclos fermentativos. Este declínio, mais rápido, ocorreu porque desde o primeiro ciclo fermentativo o substrato empregado possuía maiores concentrações de inibidores e açúcares (o mesmo utilizado nos dois últimos ciclos da fermentação do primeiro lote). No quarto e quinto ciclos foram realizados tratamento ácido, e verifica-se mais uma vez que tal expediente intensificou o efeito tóxico do ácido acético, ocasionando queda de viabilidade. Importante salientar que os dados de formação de biomassa e etanol não foram sensíveis o suficiente para refletir, de imediato, os efeitos nefastos das condições estressantes impostas, possivelmente (como já demonstrado em outros ensaios) exigindo uma extensão dos reciclos fermentativos. Ao contrário, os dados de viabilidade são aqueles que mais rapidamente respondem aos estresses aplicados, e no presente estudo este parâmetro foi monitorado para sugerir intensificação ou redução nas magnitudes dos estresses aplicados ao longo dos reciclos. Assim, pela Figura 31, tem-se que as linhagens 365 e 430 se destacaram entre as demais pela elevada tolerância.

É importante mencionar que na fermentação industrial, é extremamente difícil promover os ciclos fermentativos em condições fisiológicas idênticas e repetitivas. Assim, em relação ao mosto (formulado mediante a medida o Brix), nem sempre se obtém os mesmos teores de açúcares, o que impacta em diferentes teores de etanol ao final da fermentação. Da mesma forma, dependendo da temperatura ambiente e da eficiência do sistema de refrigeração (variável, dependendo da temperatura ambiente e do próprio equipamento), tem-se variações grandes de um ciclo para outro. Ademais, no período de chuvas, paradas são frequentes e a levedura é mantida dias sem alimentação. Estas condições são de extrema importância, pois definem a capacidade de implantação da linhagem de levedura no processo. No presente estudo, estas variações foram

deliberadamente introduzidas nos ensaios com reciclo de célula, para permitir a identificação de linhagens com capacidade de suportar os variados estresses aplicados.

É possível destacar no segundo lote, no quinto ciclo fermentativo, que as linhagens 365 e 430 foram as que apresentaram maior viabilidade, com diferenças significativas em relação à linhagem industrial SA-1.

As concentrações de açúcares residuais no terceiro ciclo fermentativo (resultados não apresentados) estavam no limite de detecção da metodologia (valores menores que 0,10%); no entanto a linhagem 572 apresentou valores ao redor de 0,41%, sendo que, mesmo assim, pouco afetou os teores finais de etanol. Da mesma forma os teores de glicerol, no mesmo ciclo, ficaram entre 0,33 e 0,43%, para todas as linhagens ao longo dos reciclos (dados não apresentados). Quanto à velocidade de fermentação, avaliada pela perda de peso (CO_2) a cada hora, não foi igualmente observada diferenças entre as linhagens. Assim como os teores de etanol, e até certo ponto da biomassa formada, os parâmetros anteriormente mencionados não foram sensíveis o suficiente para destacar diferenças fisiológicas entre as linhagens, permitindo concluir que a maior parte dos isolados se mostrou como leveduras eficientes na condução da fermentação.

A diferença maior foi quanto à viabilidade, que diga-se de passagem, é o parâmetro determinante para a implantação de uma linhagem em processos com reciclo de células. A capacidade de uma linhagem em sobreviver às condições de estresse estão ainda longe de serem compreendidas. No entanto, os carboidratos de reserva (glicogênio e trealose), contribuem de modo significativo para incremento na tolerância a vários tipos de estresses e leveduras que acumulam maiores quantidades destas reservas se mostram mais tolerantes (LILLIE; PRINGLE, 1980; BASSO et al., 1996; BASSO et al., 2008).

Os teores destas reservas sofrem drástica redução nas primeiras horas de fermentação, sendo repostas até o final da fermentação, ocasião em que os teores finais podem ser superiores ou inferiores aos iniciais, podendo resultar em oscilações no rendimento em etanol ao longo dos reciclos (BASSO; AMORIM, 19889, 1989). É desejável que a levedura apresente elevados teores de reservas ao final da fermentação, pois a capacita a melhor resistir o efeito estressante do tratamento ácido.

Como já mencionado, os ácidos fracos (como o acético no presente caso) se tornam protonados em ambientes ácidos (como no substrato empregado no presente experimento, assim como pelo próprio tratamento ácido do fermento), permitindo que os mesmos adentrem a célula e causem uma acidificação do citoplasma celular. A expulsão

destes prótons liberados no interior da célula exige a ação da ATPase de membrana, que consumindo ATP (oriundo da fermentação, quer do açúcar exógeno se existente ou das reservas endógenas – glicogênio e trealose) evita a acidificação do citoplasma e morte da célula. Portanto linhagens com maiores conteúdos de reserva de carboidrato tem mais recursos para gerar o ATP necessário, mormente quando os níveis externos de açúcar são baixos (como na ocasião do tratamento ácido).

Por outro, outros fatores condicionam a tolerância da levedura ao conjunto de fatores estressantes utilizados no presente experimento. Etanol, acidez e elevada temperatura, atuam de modo sinergístico, para alterar a fluidez da membrana, tornando-a mais permeável aos H^+ (mesmo na forma de ácidos orgânicos fracos protonizados). Portanto uma membrana com composição favorável a resultar em fluidez adequada, exigirá menor contribuição das reservas para efetuar a exclusão dos prótons. Neste caso o menor consumo das reservas durante o período de estresse permitiria um maior teor das mesmas. Os resultados apresentados nas Figuras 32 e 33, demonstram que a maioria das linhagens mais tolerantes aos estresses impostos, e portanto, apresentando as maiores viabilidades celulares, apresentaram os maiores teores das mencionadas reservas ao final dos reciclos fermentativos.

Mesmo assim, linhagens com altos conteúdos de trealose, necessariamente não estarão eficientemente protegidas, a menos que esta reserva esteja distribuída em ambos os lados da membrana plasmática (MANSURE et al., 1994). Esta distribuição da trealose é facilitada pelo transportar modulado pelo gene AGT1, que está em várias cópias no genoma de linhagens tolerantes aos vários estresses industriais (STAMBUK et al., 1998).

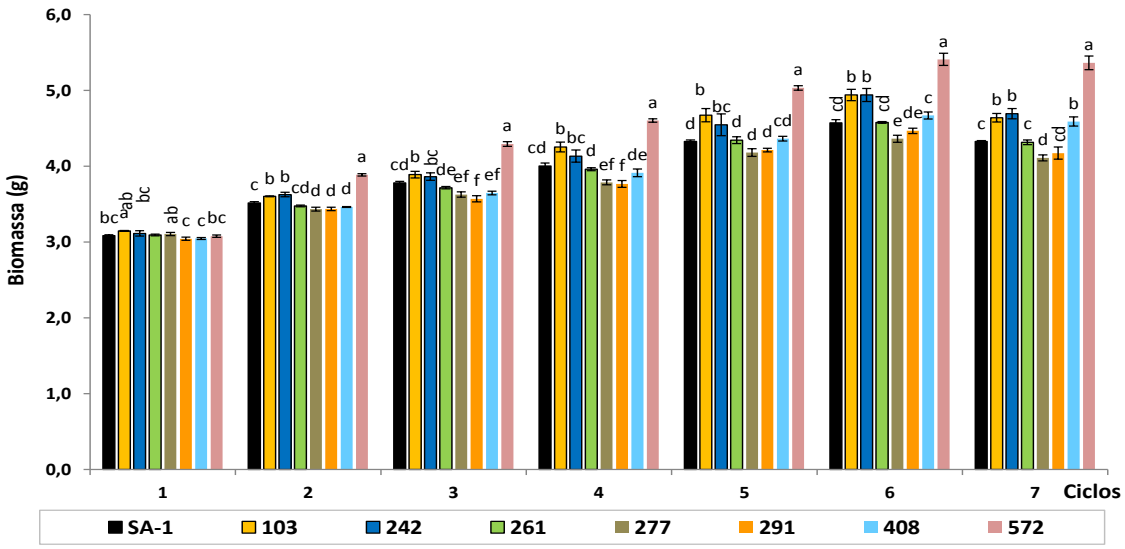

Figura 26 – Biomassa úmida (g) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo à 30ºC. Para os cinco primeiros ciclos o substrato foi constituído de hidrolisado e melaço (16% de ART, 2,1 g/L de ácido acético, 0,18 g/L de furfural e 0,09 g/L de HMF) os demais foi composto hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,7 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

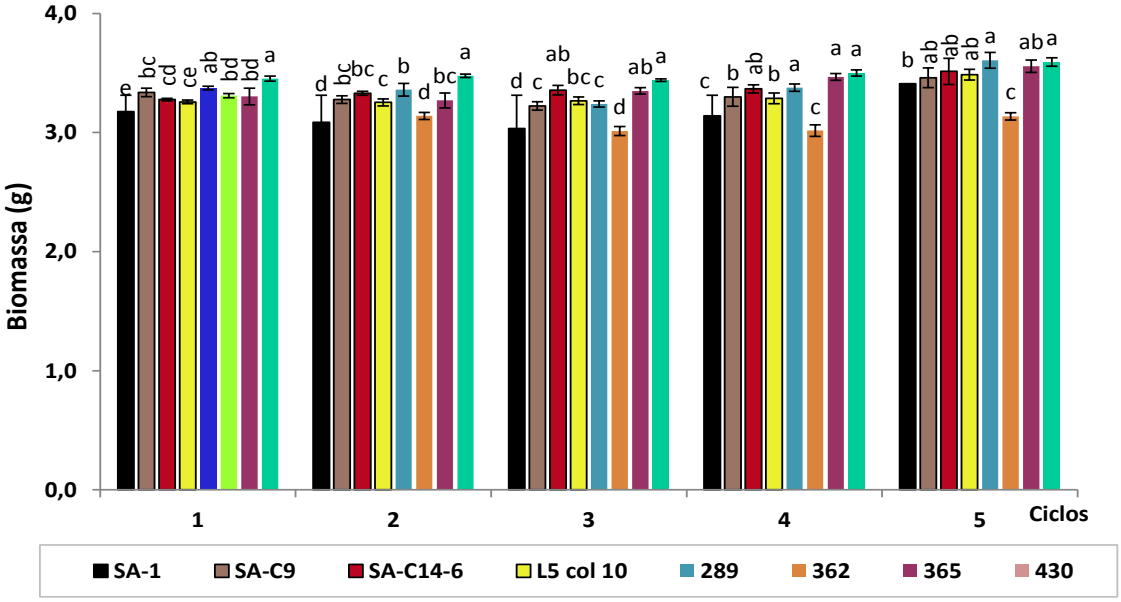

Figura 27 – Biomassa úmida (g) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF) à 30ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

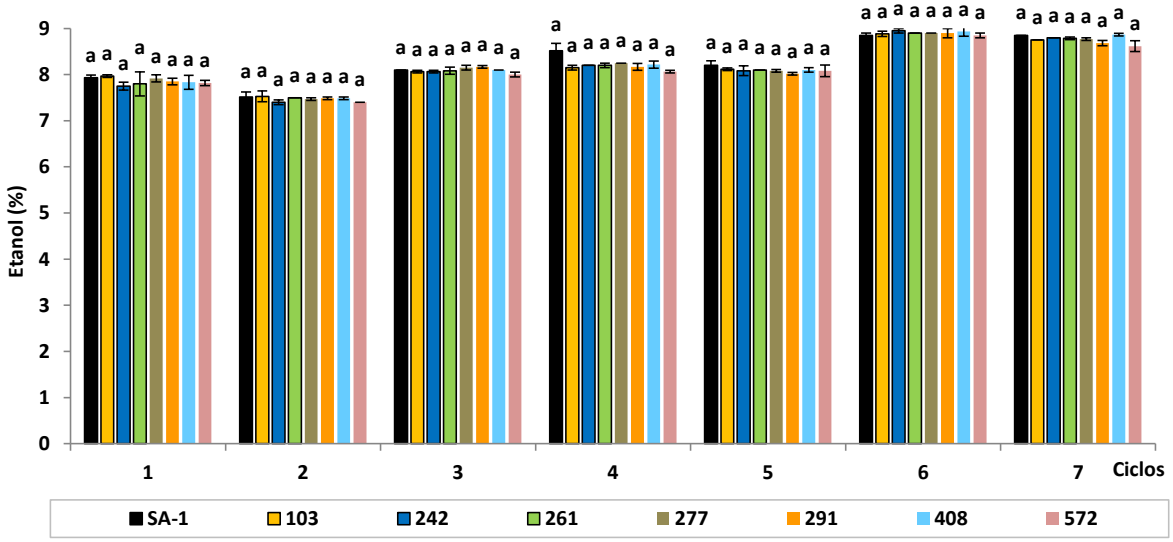

Figura 28 – Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo à 30ºC. Para os cinco primeiros ciclos o substrato foi constituído de hidrolisado e melaço (16% de ART, 2,1 g/L de ácido acético, 0,18 g/L de furfural e 0,09 g/L de HMF) os demais foi composto hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,7 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

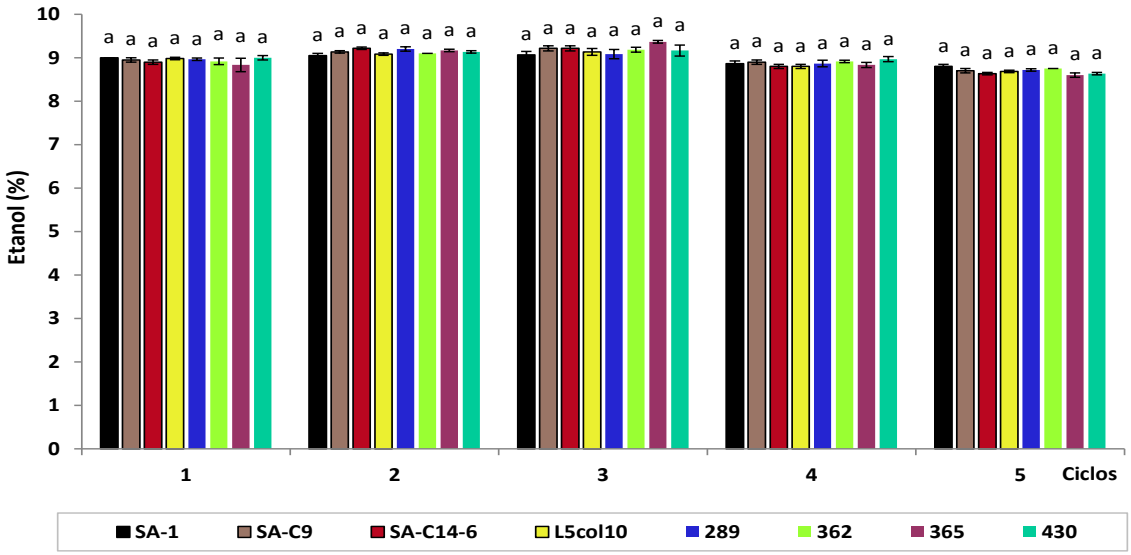

Figura 29 - Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF) à 30ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

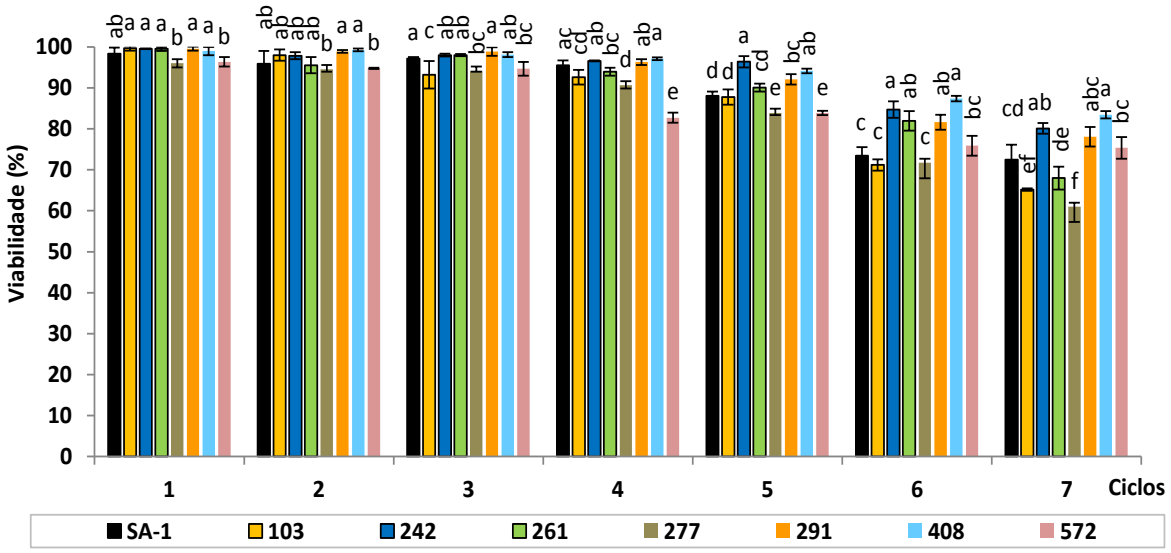

Figura 30 - Viabilidade celular (%) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo à 30ºC. Para os cinco primeiros ciclos o substrato foi constituído de hidrolisado e melaço (16% de ART, 2,1 g/L de ácido acético, 0,18 g/L de furfural e 0,09 g/L de HMF) os demais foi composto hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,7 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF). Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

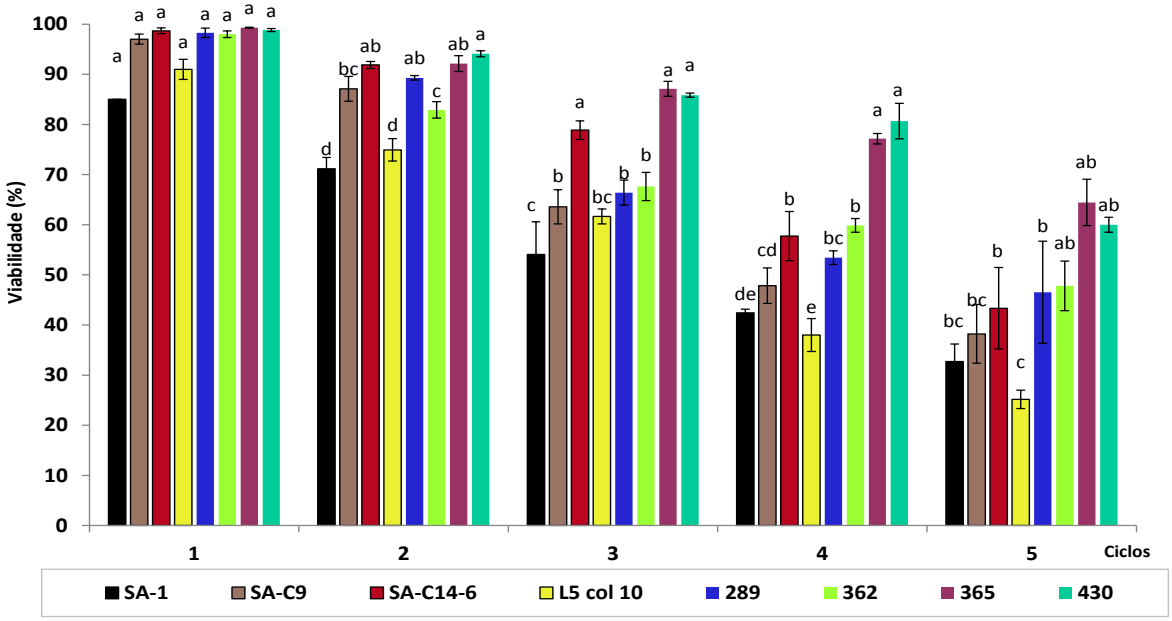

Figura 31 - Viabilidade celular (%)das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF) à 30ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

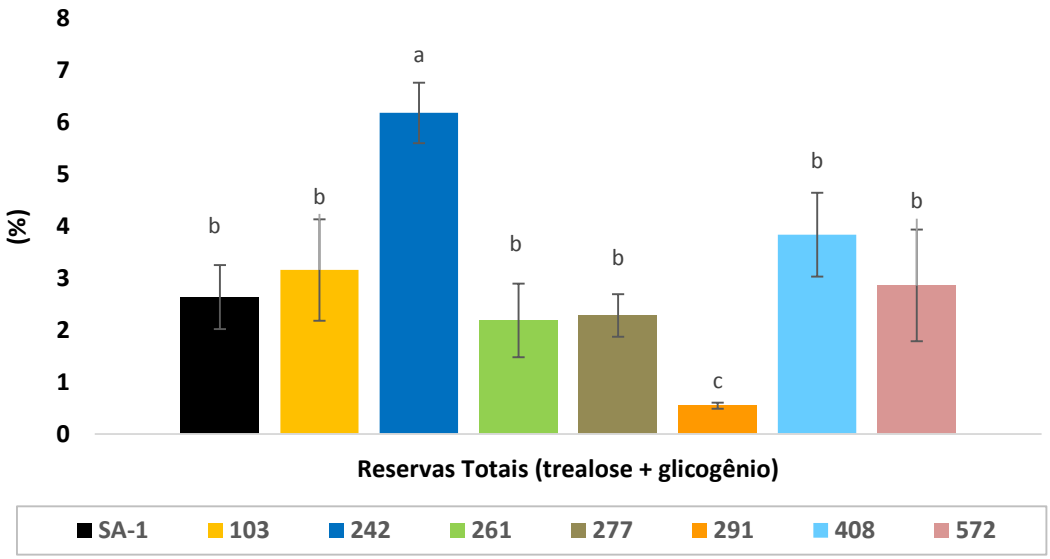

Figura 32 – Teores celulares de reservas totais (trealose + glicogênio - % na matéria seca) das linhagens ao final do último ciclo fermentativo. Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância

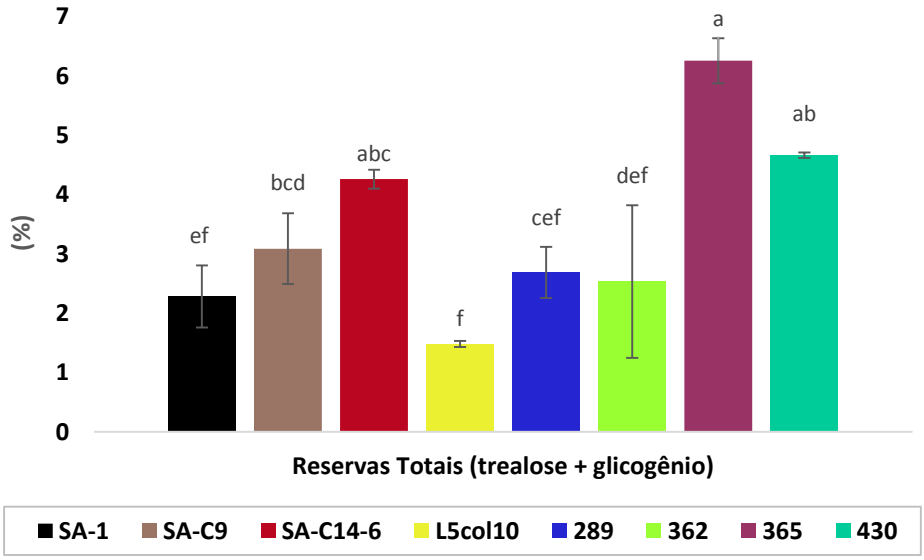

Figura 33 – Teores celulares de reservas totais (trealose + glicogênio - % na matéria seca) das linhagens ao final do último ciclo fermentativo. Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância

5.8 Obtenção e seleção dos haploides

Células de *S. cerevisiae* na ausência de nutriente podem ser induzidas a entrar em meiose durante a qual há formação de esporos (STELKENS et al, 2014). Os haploides gerados apresentam diferenças fenotípicas e genotípicas, e, mediante hibridação esta variabilidade genética pode resultar em atributos desejáveis num híbrido. As linhagens 242 e 408 que se mostraram tolerantes aos compostos tóxicos na etapa anterior, foram submetidas ao processo de hibridação com o intuito de explorar seu material genético. Para tal, as linhagens foram esporuladas e 149 haploides oriundos da cepa 242 e 124 da cepa 408 foram submetidos a um "screening" avaliando o crescimento da biomassa (DO600ηm) empregando-se substrato a base de hidrolisado e melaço, permitindo a seleção de 32 haploides (18 referentes a linhagem 242 e 14 referentes a linhagem 408) que apresentaram valores superiores ou próximos as linhagens parentais referenciadas na respectiva placa (Figura 34 e 35).

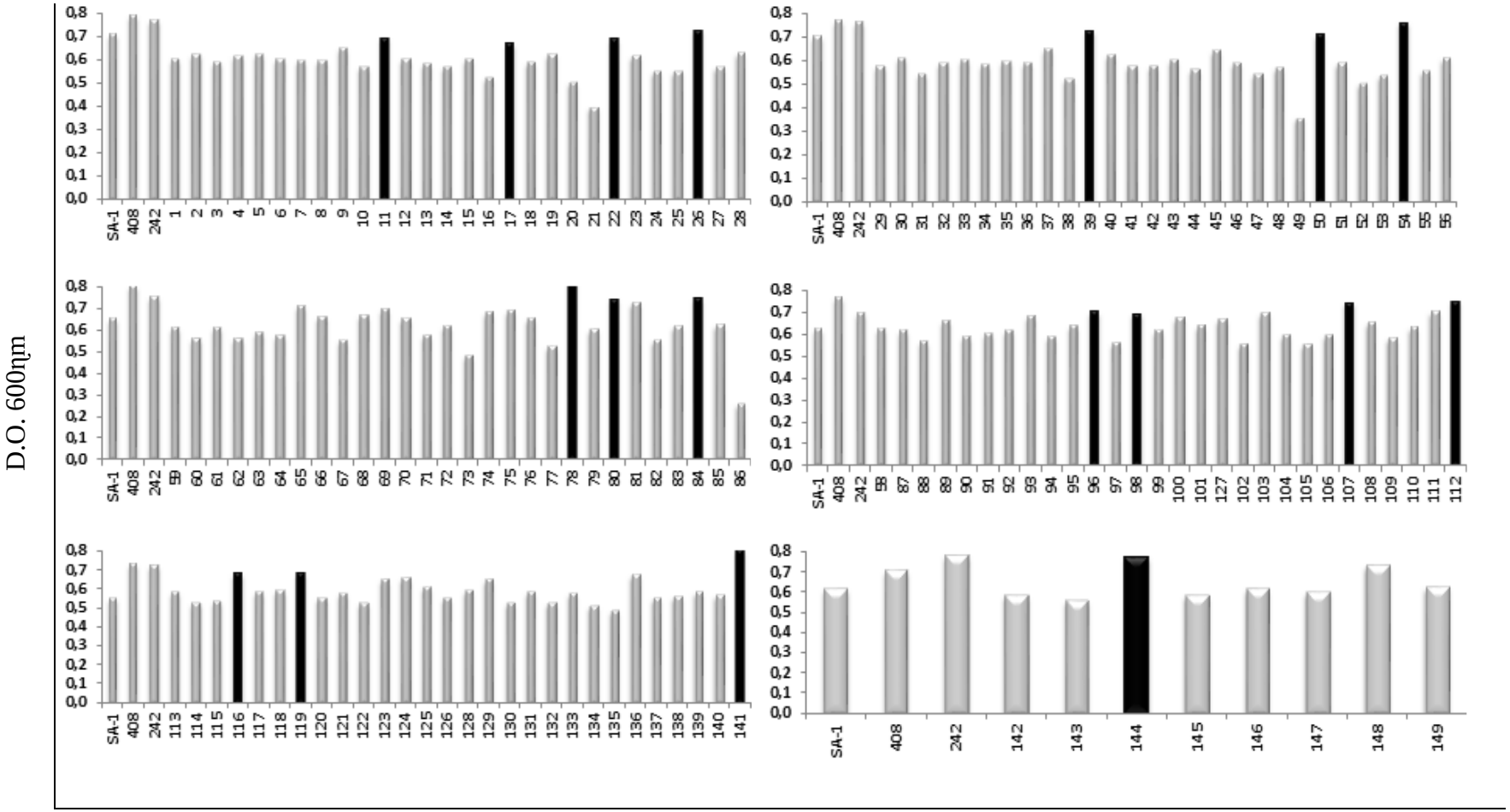

Figura 34 - DO_{24h} (600nm) dos haploides oriundos da linhagem 242 em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF). Barras negras correspondem aos haploides selecionados

(continua)

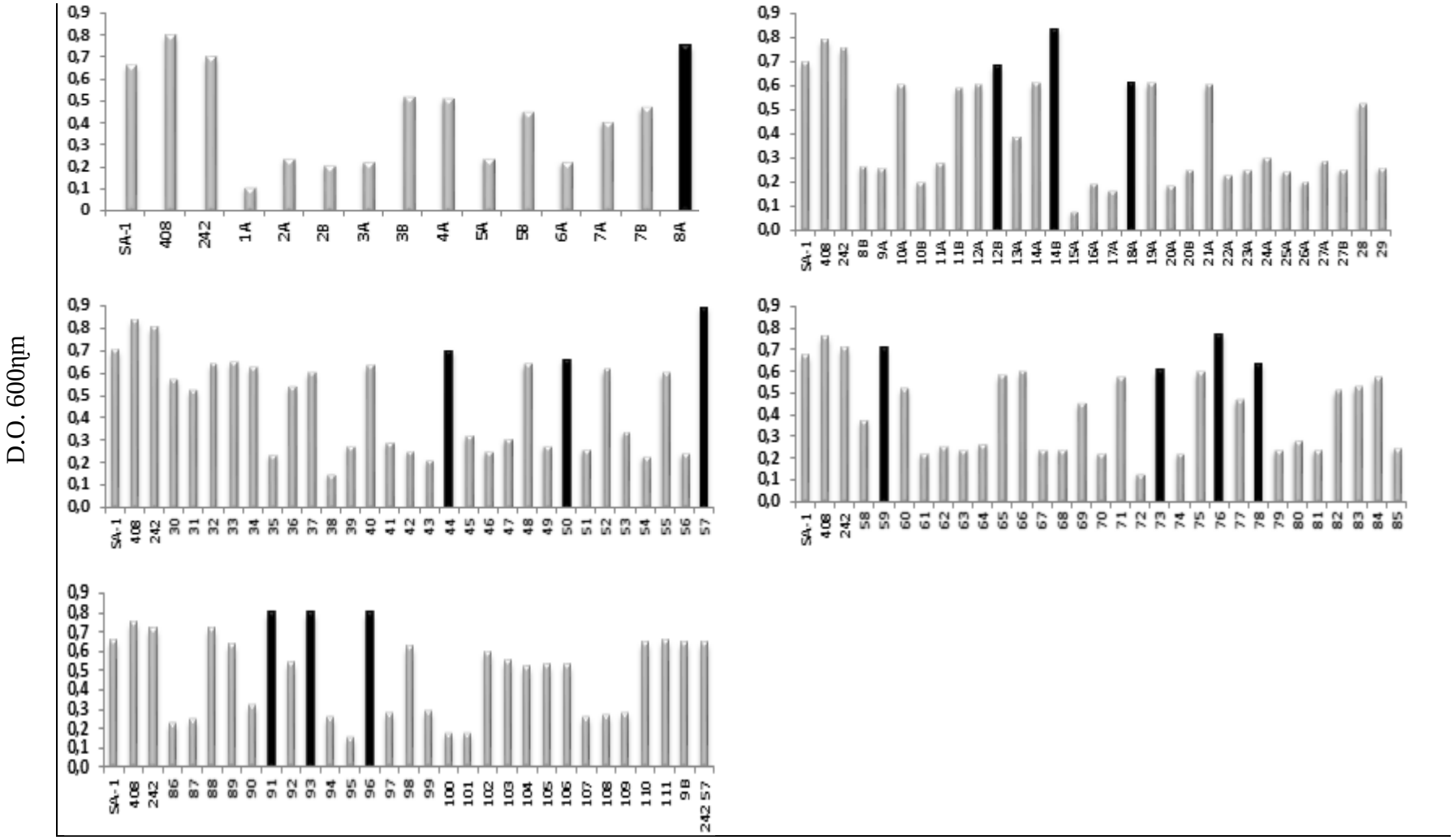

Figura 35 - DO_{24h} (600nm) dos haploides oriundos da linhagem 408 em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF). Barras negras correspondem aos haploides selecionados

(conclusão)

5.9 Cruzamento direcionado

Os haploides selecionados a partir do resultado de crescimento em microplacas das linhagens 242 e 408 tiveram o “mating type” determinado segundo a reação sexual (MAT a e MAT α). Para que ocorra o processo de acasalamento entre os haploides, os genes reguladores “a” e “α” os quais estão presentes em uma região denominada lócus MAT secretam hormônios peptídicos, fator a e fator α, o qual induz o acasalamento. O cruzamento pode ocorrer entre os haploides que possuem tipo de cruzamento oposto e assim gerar diplóides heterozigotos (FOWELL, 1996).

Os cruzamentos foram realizados intra e inter-linhagens diante micromanipulação resultando em 35 cruzamentos e aproximadamente cinco isolados de cada cruzamento foram resgatados (totalizando 155 híbridos). A relação e identificação dos híbridos obtidos mediante cruzamento direcionado, indicando a origem dos haploides e as especificações dos cruzamentos estão apresentadas no anexo x.

Os produtos do cruzamento direcionado foram submetidos a uma avaliação de crescimento (DO_{600nm}) em substrato constituído por hidrolisado e melaço. Os dados de DO_{600nm} após 24 horas de crescimento estão dispostos na Figura 36. Podemos observar pela figura que a maioria dos híbridos gerados apresentaram crescimentos superiores a linhagem referência SA-1. Em relação as linhagens que lhes deram origem, os crescimentos foram semelhantes e/ou superiores por parte da maioria dos isolados.

3 isolados com perfis de tolerância superiores aos parentais (destacados em preto na figura), foram selecionados e reservados para próxima avaliação em fermentação com reciclo de células.

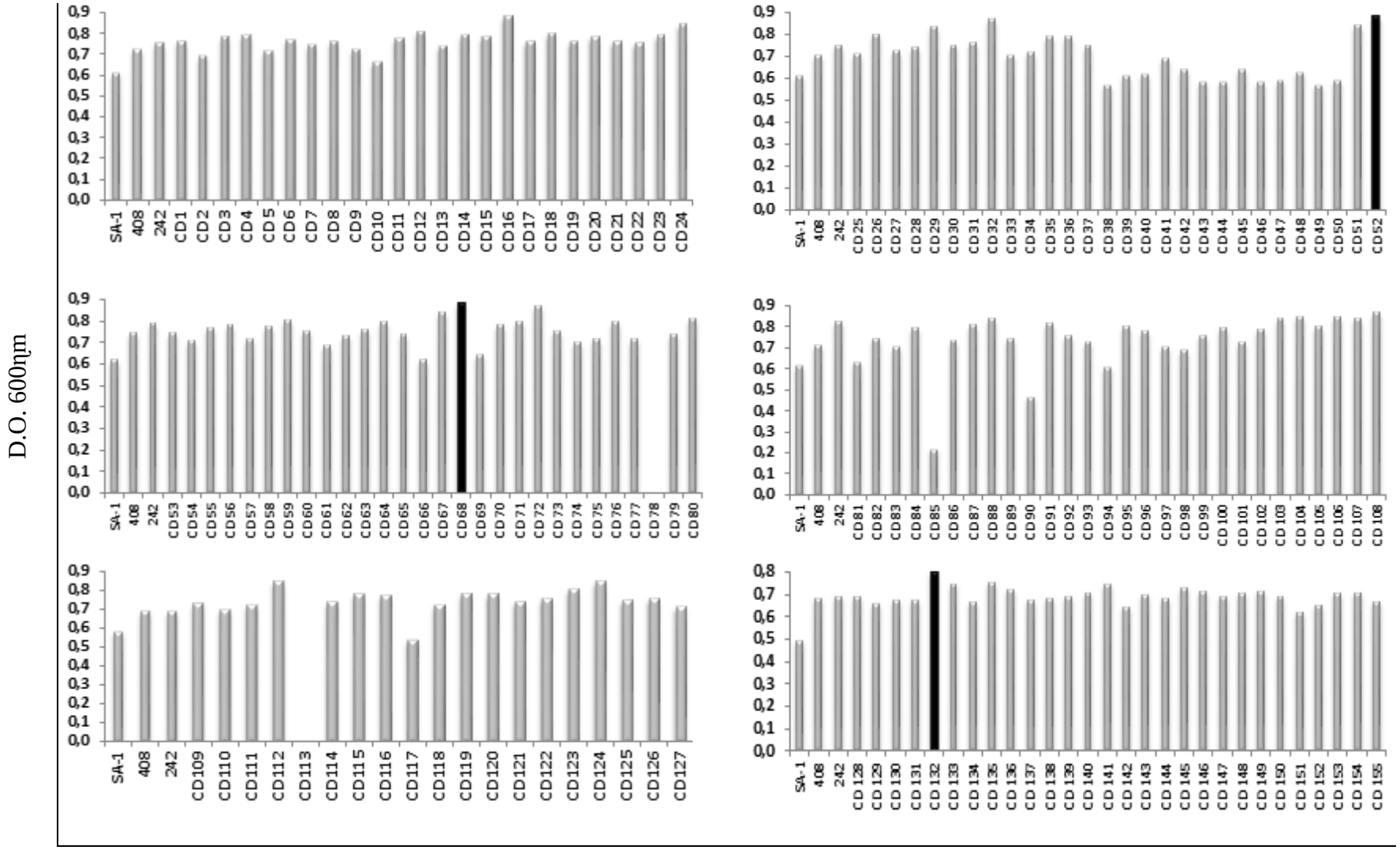

Figura 36 - DO_{24h} (600nm) dos isolados oriundos do cruzamento direcionado entre as linhagens 242 e 408 em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF). Barras negras correspondem aos haploides selecionados

5.10 Cruzamento Massal

Cruzamentos massais ou aleatórios consistem na mistura de um grande número de células haploides, muitas vezes de diferentes estirpes progenitoras as quais deixa-se cruzar aleatoriamente. Está técnica pode ser empregada para as estirpes homotálicas, como também para heterotálicas (STEENSELS et al, 2014).

Os haploides oriundos das linhagens 242 e 408 foram submetidos a um cruzamento aleatório e 80 isolados foram resgatados e submetidas a uma avaliação de crescimento (DO_{600nm}) em substrato contendo hidrolisado e melaço. Os dados de DO_{600nm} após 24 horas de crescimento estão dispostos na Figura 37. Observa-se que todos os híbridos gerados pelo cruzamento massal apresentaram crescimentos superiores a referência SA-1. Em comparação as linhagens que lhe deram origem, podemos verificar crescimentos semelhantes como também superiores.

4 isolados com perfis de tolerância superiores aos parentais (destacados em preto na figura), foram selecionados e reservados para próxima avaliação em fermentação com reciclo de células.

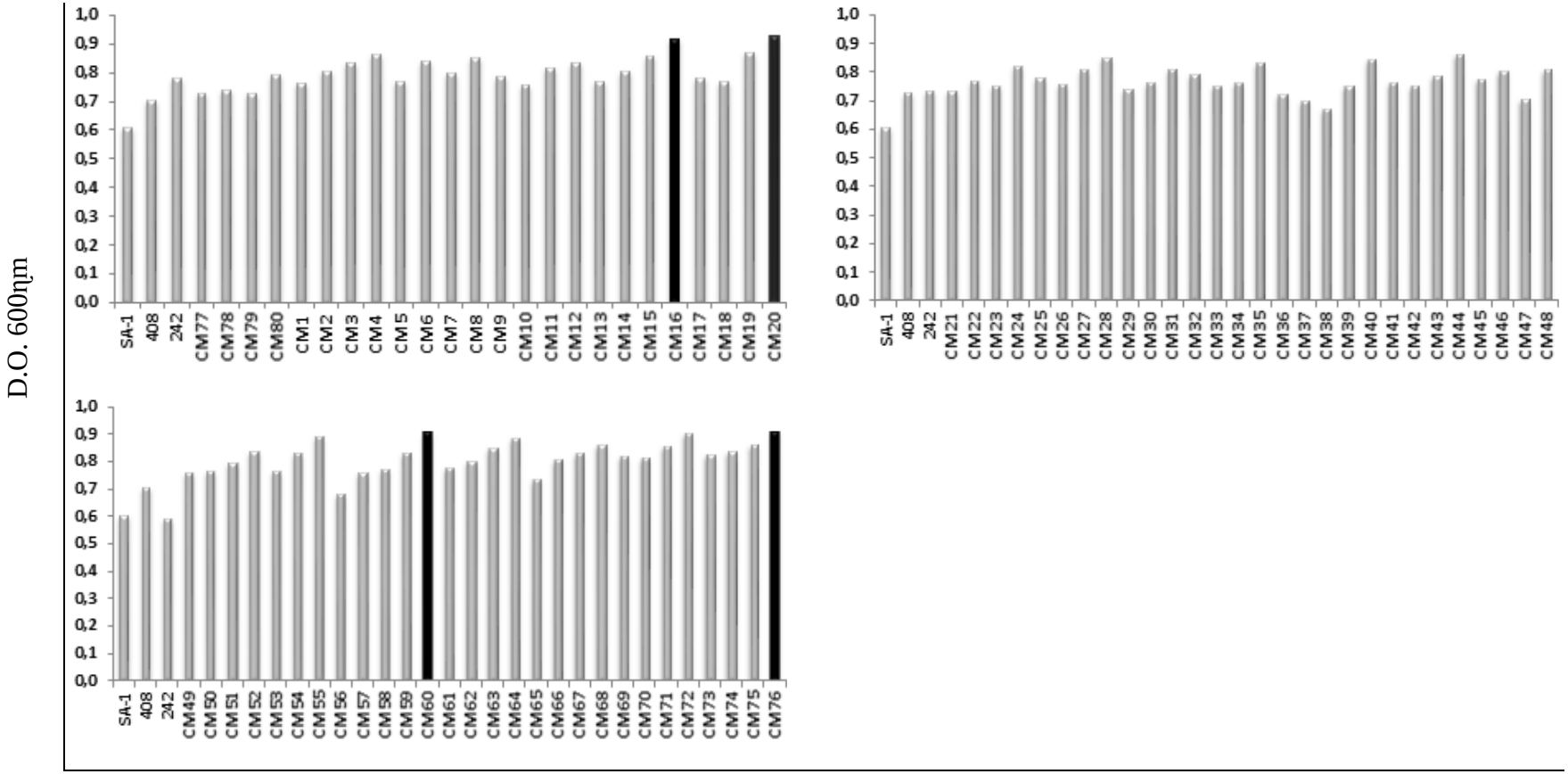

Figura 37 - DO_{24h} (600nm) dos isolados oriundos do cruzamento massal entre as linhagens 242 e 408 em substrato constituído de hidrolisado e melaço (15% de ART, 4,17 g/L de ácido acético, 0,25 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF). Barras negras correspondem aos haploides selecionados

5.11 Ensaio fermentativo com os isolados selecionados a partir dos cruzamentos massal e direcionado

Quatro isolados do cruzamento massal (CM16, CM20, CM60 e CM76) e 3 do cruzamento direcionado (CD52, CD68 e CD132) que apresentaram os maiores crescimentos quando comparados as linhagens que lhe deram origem referenciadas na respectiva placa, foram submetidos a um ensaio fermentativo com reciclo de células, simulando o processo industrial, na busca de linhagens com tolerância apropriada. Para tal, foram conduzidos 5 ciclos fermentativos empregando hidrolisado e melaço como substrato.

Apesar da discreta diferença entre o crescimento da biomassa (Figura 38) das linhagens avaliadas, a linhagem 408 (referência) foi a que apresentou menor ganho. A linhagem CD132 apresentou maior acúmulo de biomassa nos ciclos 4 e 5, apresentando resultados significativamente maiores que as outras linhagens testadas.

Em relação ao teor de etanol (Figura 39) não houve diferenças significativas entre as mesmas, nos diferentes ciclos fermentativos. As concentrações de açúcares residuais foram no limite de detecção da metodologia empregada, enquanto os teores de glicerol (na faixa de 0,35 e 0,41%) não mostraram diferenças entre as linhagens. Da mesma forma, não se observou diferenças entre as linhagens em relação à velocidade de fermentação (dados não apresentados).

Pelo parâmetro viabilidade (Figura 40) podemos destacar as linhagens CD52, CD68, CD132, CM20 e CM76 que apresentaram diferenças significativas em relação às linhagens que lhes deram origem, apresentando os maiores valores de viabilidade celular (92,3%, 91,7%, 88,8%, 87,4% e 86,1%, respectivamente) confirmando que a técnica de hibridação pode gerar híbridos mais tolerantes que os parentais. Vale a pena ressaltar que os híbridos CD52, CD68 e CD132, oriundos do cruzamento direcionado, foram os que apresentaram maior adaptabilidade ao meio testado, pois apresentaram melhor viabilidade 92,3%, 91,7% e 89,5%, respectivamente. Os 3 híbridos foram obtidos de haploides oriundos de um único parental. Ou seja, para gerar o isolado CD52 foi feito cruzamento entre os haploides 78 e 73 (oriundos da linhagem 408) e o isolado CD68 entre os haploides 78 e 59, também oriundo da linhagem 408. O isolado CD132 foi originado pelo cruzamento dos haploides 119 e 107, oriundo da linhagem 242 (anexo N).

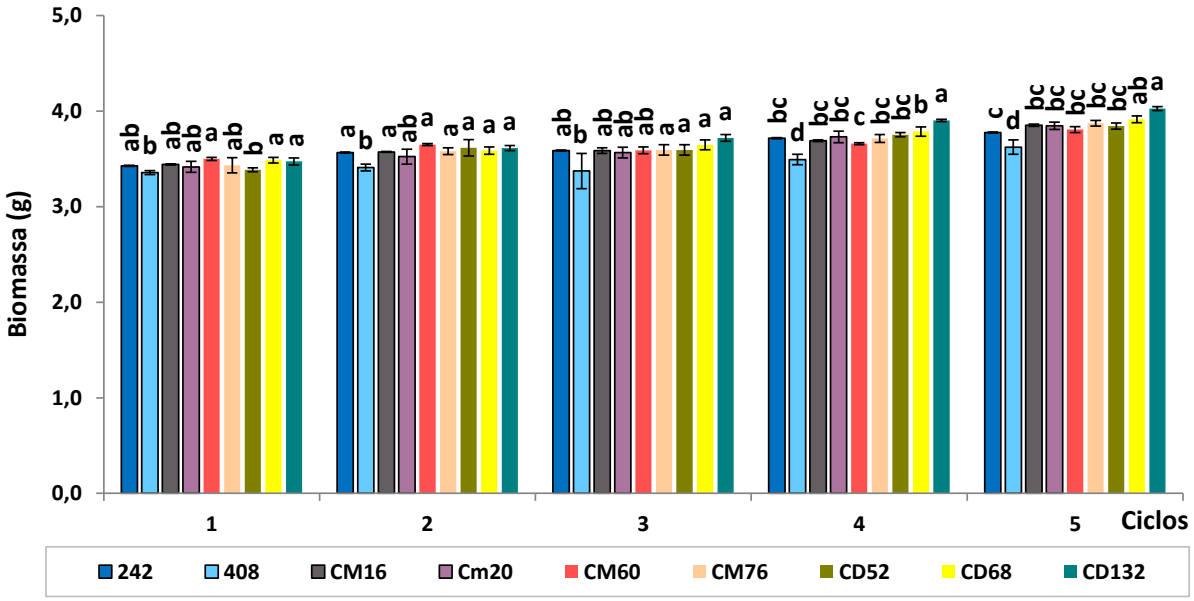

Figura 38 – Biomassa úmida (g) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF) à 30ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

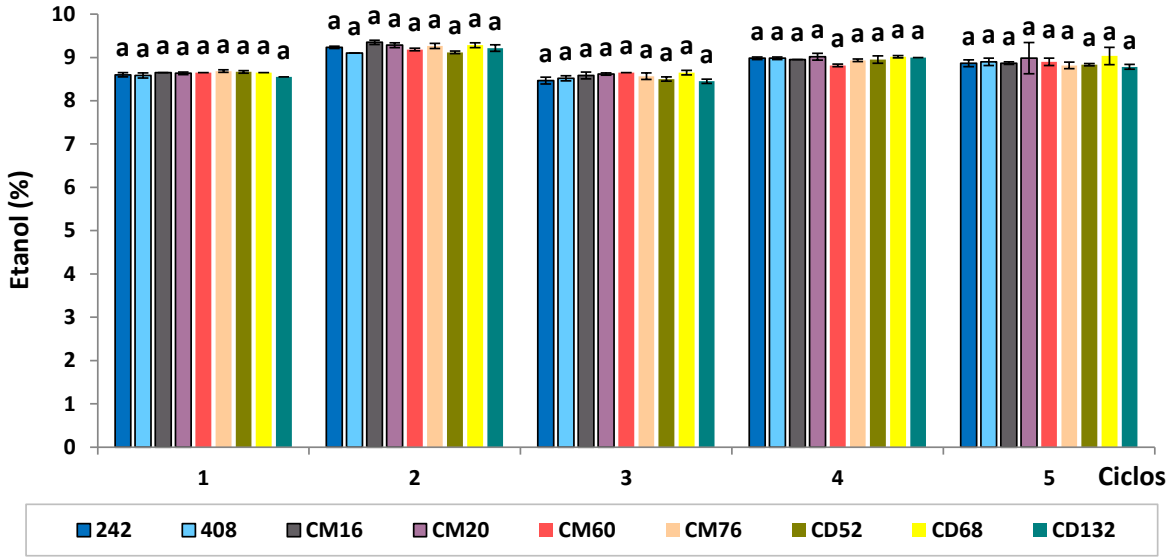

Figura 39 – Teor de etanol (% v/v) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF) à 30ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância

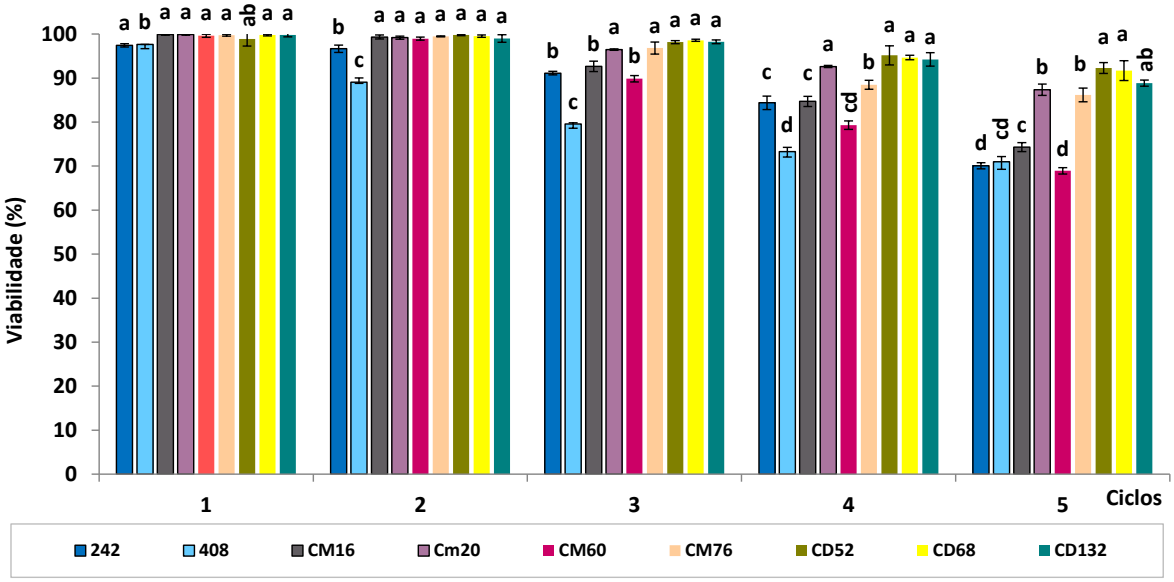

Figura 40 - Viabilidade celular (%) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo em substrato constituído de hidrolisado e melaço (18,7% de ART, 6,07 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural e 0,07 g/L de HMF) à 30ºC. Médias com letras iguais dentro de um mesmo ciclo não diferem ao nível de 5% de significância. Viabilidades celulares (%) das linhagens ao final de cada ciclo fermentativo

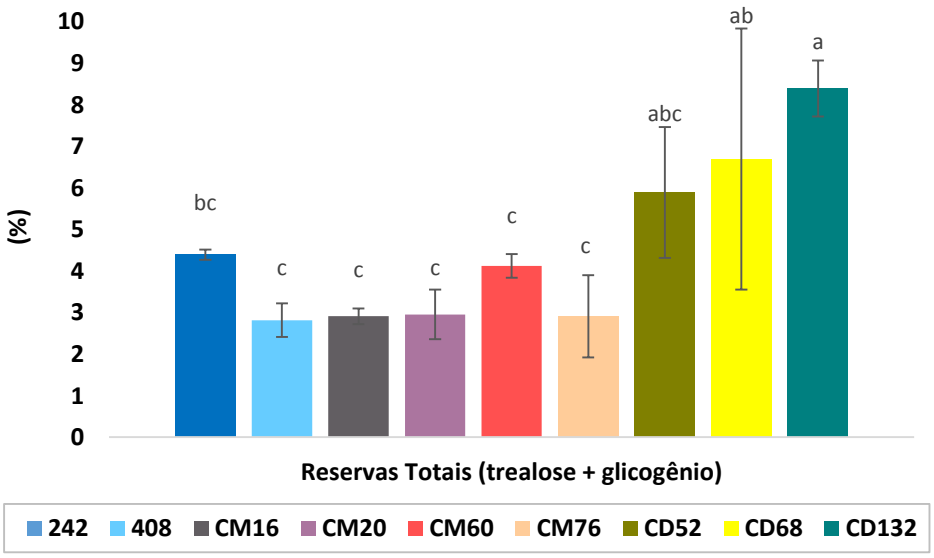

Figura 41 – Teores celulares de reservas totais (trealose + glicogênio - % na matéria seca) das linhagens ao final do último ciclo fermentativo. Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Os resultados obtidos no presente trabalhou permitiu destacar pelo menos 4 linhagens (242, 365, 408 e 430) mais adaptadas ao processo fermentativo com reuso de células empregando hidrolisado e melaço como substrato quando comparadas a referência SA-1. Destas, duas linhagens (242 e 408) foram submetidas aos cruzamentos massal e direcionado gerando linhagens que se mostram superiores aos parentais no mesmo substrato.

Alexandrino (2012) alcançou resultados satisfatórios ao realizar cruzamento direcionado entre as linhagens PE-2 e CAT-1. A linhagem obtida apresentou maior teor de trealose quando comparado as linhagens parentais. Entretanto, em relação a viabilidade, o hibrido gerado se mostrou inferior a referência PE-2.

É de grande importância obter linhagens que apresentem alta viabilidade ao transcorrer do processo de reciclagem de células. Neste trabalho as linhagens CD52, CD68 e CD132 obtidas mediante cruzamento direcionado apresentaram alto teores de reservas totais (trealose e glicogênio) como também alta viabilidade, comprovando sua superioridade entre as linhagens avaliadas.

As considerações apresentadas em relação ao ensaio anterior com reciclos fermentativos são válidas para a discussão dos presentes dados.

Os atributos apresentados pelos isolados obtidos mediante hibridação sugerem que estas linhagens estão adaptadas ao substrato proposto para geração de etanol de segunda geração (hidrolisado e melaço).

6 CONCLUSÕES

A imposição de condições estressantes sobre as culturas da linhagem SA-1 permitiu a evolução de uma linhagem com maior tolerância aos inibidores de um substrato a base de hidrolisado de bagaço, mantendo elevada viabilidade em reciclos fermentativos.

A biodiversidade de linhagens indígenas encontradas em destilarias brasileiras é uma fonte valiosa na busca de variantes com atributos de tolerância a inibidores presentes num substrato para etanol de segunda geração.

Os processos de hibridação, quer massal ou direcionado, se constituem em importantes ferramentas para a obtenção de leveduras híbridas com melhores perfis de tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço.

As linhagens obtidas são boas candidatas a serem submetidas à modificação genética visando à capacidade de fermentação da xilose para um aproveitamento total dos açúcares presente no hidrolisado.

RFERÊNCIAS

ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; PRIOR, B.A. GPD1, Which Encodes Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, Is Essential for Growth under Osmotic Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Expression Is Regulated by the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.14, n. 6, p. 4135-4144, 1994.

ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de levedura para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa.** 2012. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ALLEN, S.A.; CLARK, W.; McCAFFERY, J.M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P.J.; LIU, Z. L.; GORSICH, S. W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biothecnology for Biofuels**, Sweden, v.3, n. 2, p. 1-10, 2010.

ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester Sussex, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação dos ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

ALVES, D.M.G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de Saccharomyces cerevisiae frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. 2000. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2000.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol, In: SIMPÓSIO MICRORGANISMO EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS, 2013. Brasília: **Anais...** EMBRAPA, 2013. p. 42-59.

ANDREOLLI, C. Convergência de agricultura e energia: I. Produção de Biomassa celulósica para biocombustíveis e Eletricidade**. Economia & Energia**, Belo Horizonte, n. 66, p. 3-14, 2008.

ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; McCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, New York, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

BASSO, L.C.; AMORIM, H. V. **Mobilização e armazenamento dos carboidratos de reserva durante a fermentação alcoólica**. Piracicaba: ESALQ – Departamento de Química/ FERMENTEC, 1988. p. 44-47. (Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica)

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Efeitos de diferentes proporções de mel e caldo sobre a fermentação alcoólica. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ, ESALQ, 1998. p. 83-95.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Estudo dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, no transcorrer da fermentação e durante o reciclo do fermento**. Piracicaba: ESALQ – Departamento de Química/ FERMENTEC, 1989. p. 39-44. (Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica)

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

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

BIODIESELBR. **Programa Brasileiro de álcool.** Publicado em 2006. Disponível em: < http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool/programa-etanol.htm>. Acesso em: 25 fev. 2015.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, New York, v. 22, p. 145-212, 1992

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

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

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

CAKAR, Z.P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; YILMAZ, U. Evolutionary engineering of Saccharomyces cerevisiae for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 12, n.2, p. 171-182, 2011.

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

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

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

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento - **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2015**. Publicado em: 08/2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_51_14_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf > Acesso em: 15 ago. 2015.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira – **Etanol 2 geração**. Publicado em: 2013. Disponível em: < http://www.ctcanavieira.com.br/etanol2g.html > Acesso em: 03 out. 2015.

DING, Z.; SHI, J.; XIAO, J.; GU, W.; ZHENG, C.; WANG, H.J. Catalytic conversion of cellulose to 5-hydroxymethyl furfural using acidic ionic liquids and co-catalyst. Barking **Carbohydrate Polymers**, Barking, n. 2, p. 792-798, 2012.

DRAGOSITS, M.; MOZHAYSKIY, V.; QUINONES-SOTO, S.; PARK, J.; TAGKOPOULOS, I. Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*. **Molecular Systems Biology**, Heidelberg, n. 643, p. 1-13, 2013.

FIERRO, F.; MARTIN, J.F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.25, p. 1-17, 1999.

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

FOWELL, R.R. The hybridization of yeasts**. Journal of Applied Bacteriology,** London, v. 18, n. 1, p. 149-160, 1954.

GIBSON, B.; LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. **Yeast**, Chichester, v. 32, p. 17-27, 2015.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; LUCON, O. How adequate policies can push renewables. **Energy Policy,** Surrey, v. 32, n. 9, p. 1141-1146, 2004.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GUO, Z.P.; ZHANG, L.; DING, Z.Y.; SHI, G.Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, Orlando, v. 13, n. 1, p. 49-59, 2011.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; STIPP, J.M.S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 34, n.2, p. 235-242, 1991.

HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle and long-term. **Biomass and Bioenergy,** Oxford, v. 28, n 4, p. 384–410, 2005.

HAMMER, Ø; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Essex, v.4, p. 1-9, 2001.

HARRISON, J.S. Yeast production. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.10, p. 129-177, 1971.

HASSUANI, S.J.; LEAL, M.R.L.V.; MACEDO, I.C. **Biomass power generation**: sugar cane bagasse and trash. Piracicaba: PNUD-CTC, 2005. 216p.

HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. **Microbial Biotechnology,** Braunschweig, v. 1, n. 6, p. 497-506, 2008.

HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; BONT, J.A.M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents**. Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, p. 409–415, 1994.

HERSKOWTTZ, I; OSHIMA, Y. Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae* mating type and mating type interconversion. In: _____**The molecular biology of the yeast *Saccharomyces:*** Life cicle and Inheriance. New York: Cold Spring Harbor 1981. p. 181-209.

HORVÁTH, I.S.; FRANZEN, C.J.; TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4076–4086, 2003.

HORVÁTH, I.S.; TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Effects of furfural on anaerobic continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae.* **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 75, n. 5, p.540-549, 2001.

HU, X.; XIAO, Y.; NIU, K.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; HU, B. Functional ionic liquids for hydrolysis of lignocellulose. **Carbohydrate Polymers,** Barking, v. 97, n.1, p. 172-176, 2013.

IEA, Energy Technology Essentials **– Biofuel Production**. Publicado em: 01/207. Disponível em: < https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/essentials2.pdf> Acesso em: 20 set. 2015.

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

LEMOS, E.G.M.; STRADIOTTO, N.R. **Bioenergia:** desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo, 2012. Disponível em: < http://www.culturaacademica.com.br/_img/arquivos/Bioenergia-DIGITAL.pdf> Acesso em: 20 maio 2015.

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

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

LIND, L.R; CUSHMAN, J.H.; NICHOLS, R.J.; WYMAN, C.E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, Washington, v. 251, p. 1318-1323, 1991.

LINDEGREN, C.C. Chromosome maps of Saccharomyces**. Hereditas,** Illinois, v**.** 35, p. 338–355**,** 1949.

LIU, Z.L. Genomic adaptation of ethomologenic yeast to biomass conversion inhibitors. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin v.73, p. 27-36, 2006.

LIU, Z.L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics,** Berlin**,** v. 282, n. 3, p. 233-244, 2009.

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

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.DARNELL, J. **Biologia molecular e celular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1244p.

LOMBARDI, G.M.R.; GIROTO, V.S.; LOMBARDI, N.M.R.; PERES, M.M.; SILVA, S.D.A.; ALVES, C.E.S. ABILIO, R.S. Uso da palha de cana de açúcar como fonte de bioenergia versus a sua contribuição nutricional quando mantida no solo. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOENERGIA, 7. 2012. São Paulo: **Anais**…São Paulo, 2012. p. 1-20.

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

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

MACEDO, I.C. **Sugar canes energy:** twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability. São Paulo: União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2005. 230p.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. 12th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MANSURE, J.J.; PANEK, A.D.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 191, n. 2, p. 309-316, 1994.

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

MORRISON, F.B. **Feeds and feeding**. Clinton: Morrison, 1959. 770p.

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

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

NARENDRANATH, V.V.; POWER, R. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.71, n. 5, p. 2239–2243, 2005**.**

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

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J.; HAHN-HAGERDAL, B. Infuence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v. 62, p. 447-454, 1999.

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

PAMPULHA, M.E.F.S. **Efeito do ácido acético na fermentação e nos parâmetros de crescimento em *Saccharomyces cerevisiae*** Lisboa, 1989. 222p. (Tese de Doutorado em Engenharia Agronomica) – Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa), 1989.

PARROU, J.L.; TESTE, M.A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in Saccharomyces cerevisiae: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, New York, v. 143, n. 6, p. 1891-1900, 1997.

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

PETERSSON, A.; ALMEIDA, J.R.A.; MODIG, T.KARHUMAA, K.; HANGERDAL, B. H.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LINDEN, G. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **YEAST**, Chichester, n.23, p. 455-465, 2006.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. Yeast-derived products. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. (Ed.). **Yeast Technology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. cap. 8, p. 369-412.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 253-266, 2010.

ROCHA, G.J.M.; MARTIN, C.; SILVA, V.F.N.; GOMEZ, E.O.; GONCALVES, A.R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, New York, v. 111, p. 447-452, 2012.

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

RUTZ, D.; JANSSEN, R. **Biofuel Technology Handbook**. Publicado em: 2008. Disponível em: < http://www.zetatalk3.com/docs/Biogas/Biofuel_Technology_Handbook_Version2_D5_2008.pdf> Acesso em: 23 set. 2015.

SAMSOM, F.E.; KATZ, A.M.; HARRIS, D.L. Effects of acetate and short-chain fatty acids on metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.54, p.406-423, 1955.

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

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

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

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

STAMBUK, B.U.; PANEK, A.D.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; DE ARAUJO, P.S. Expression of high-affinity trehalose-H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*, **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1379, p. 118-128, 1998.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, Australia, v. 109, n. 1, p. 13-24, Jul 2010.

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.

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

SUN, X.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T. A comparison of power generation and ethanol production using sugarcane bagasse from the perspective of mitigating GHG emissions. **Energy Policy**, Surrey, v. 57, p. 624-629, 2013.

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

TOFIGHI, M.; AZIN, M.; ASSADI, M.M.; ASSADI-RAD, M.H,A.; NEJADSATTARI, T.; FALLAHIAN, M.R. Inhibitory Effect of High Concentrations of Furfural on Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae.* **International Journal of Environmental Research**, Iran, n. 4, v.1, p. 137-142, 2010.

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

ÚNICA – **O Setor sucroenergético: Etanol, Açúcar e Bioeletricidade**. Disponível em: < www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=25497159> Acesso em:12 nov. 2015.

VAN-DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 32, p. 199-224, 1986.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAN, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: Sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, p. 7119-7123, 2011.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, Chichester, v. 8, n.7, p. 501-517, 1992.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

WRIGHT, J.; BELLISSIMI, E.; HULSTER, E.; WAGNER, A.; PRONK, J.T.; VAN MARIS, A.J. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast**, Amsterdam**,** v.11, n. 3 p. 299–306, 2011.

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

YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; ZHENG, C.; LEE, D.H.; LIANG, D.T. In-Depth Investigation of Biomass Pyrolysis Based on Three Major Components: Hemicellulose, Cellulose and Lignin. **Energy & Fuels**, Washington, v. 20, p. 388-393, 2005.

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

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 23-30, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2 – Teor de biomassa úmida centrifugada (g) durante a Pré-seleção 2 (mediante ensaios de fermentação com reciclo de células) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

	Biomassa (g)				
Linhagem	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**
	3,61	3,2	3,12	3,22	3,39
SA-1	3,59	3,19	3,12	3,23	3,43
	3,64	3,33	3,33	3,45	3,65
Média	**3,61**	**3,24**	**3,19**	**3,30**	**3,49**
Desvio padrão	**0,03**	**0,08**	**0,12**	**0,13**	**0,14**
	3,68	3,06	3	3,04	3,22
SA-C2	3,56	3,11	3,02	3,19	3,47
	3,5	3,04	2,94	3,35	3,51
Média	**3,58**	**3,07**	**2,99**	**3,19**	**3,40**
Desvio padrão	**0,09**	**0,04**	**0,04**	**0,16**	**0,16**
	3,63	3,23	3,11	3,38	3,48
SA-C2-4	3,58	3,3	3,24	3,18	3,31
	3,57	3,29	3,15	3,18	3,41
Média	**3,59**	**3,27**	**3,17**	**3,25**	**3,40**
Desvio padrão	**0,03**	**0,04**	**0,07**	**0,12**	**0,09**
	3,69	3,43	3,29	3,33	3,46
SA-C9	3,53	3,34	3,18	3,20	3,28
	3,62	3,49	3,36	3,44	3,47
Média	**3,61**	**3,42**	**3,28**	**3,32**	**3,40**
Desvio padrão	**0,08**	**0,08**	**0,09**	**0,12**	**0,11**
	3,63	3,06	2,98	2,98	3,16
SA-C14	3,5	2,95	2,92	3,07	3,29
	3,5	2,95	2,9	2,93	3,12
Média	**3,54**	**2,99**	**2,93**	**2,99**	**3,19**
Desvio padrão	**0,08**	**0,06**	**0,04**	**0,07**	**0,09**
	3,49	3,24	3,18	3,19	3,33
SA-C14-6	3,65	3,35	3,24	3,16	3,16
	3,59	3,3	3,20	3,19	3,25
Média	**3,58**	**3,30**	**3,21**	**3,18**	**3,25**
Desvio padrão	**0,08**	**0,06**	**0,03**	**0,02**	**0,09**
	3,46	3,14	3,08	3,12	3,24
SA-C14-C10	3,6	3,3	3,21	3,23	3,29
	3,57	3,31	3,26	3,30	3,45
Média	**3,54**	**3,25**	**3,18**	**3,22**	**3,33**
Desvio padrão	**0,07**	**0,10**	**0,09**	**0,09**	**0,11**

ANEXO B

Tabela 3 – Teor de etanol (% v/v) durante a Pré-seleção 2 (mediante ensaios de fermentação com reciclo de células) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

	Etanol (%)				
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**
	6,70	7,95	7,95	8,15	7,95
SA-1	6,70	7,95	7,90	8,00	7,95
	6,70	7,80	8,05	8,05	8,00
Média	**6,70**	**7,90**	**7,97**	**8,07**	**7,97**
Desvio padrão	**0,00**	**0,09**	**0,08**	**0,08**	**0,03**
	6,85	8,05	8,00	8,10	8,05
SA-C2	6,80	7,95	8,05	7,95	7,95
	6,90	8,00	7,95	8,00	7,90
Média	**6,85**	**8,00**	**8,00**	**8,02**	**7,97**
Desvio padrão	**0,05**	**0,05**	**0,05**	**0,08**	**0,08**
	6,75	7,95	7,90	7,90	7,85
SA-C2-4	6,75	7,90	8,20	7,95	8,05
	6,85	8,05	8,05	8,15	7,95
Média	**6,78**	**7,97**	**8,05**	**8,00**	**7,95**
Desvio padrão	**0,06**	**0,08**	**0,15**	**0,13**	**0,10**
	6,80	7,95	8,00	8,05	8,05
SA-C9	6,85	7,85	8,05	8,10	8,05
	6,85	8,00	7,90	8,10	8,05
Média	**6,83**	**7,93**	**7,98**	**8,08**	**8,05**
Desvio padrão	**0,03**	**0,08**	**0,08**	**0,03**	**0,00**
	6,85	8,00	7,90	8,05	7,95
SA-C14	6,85	7,95	8,00	7,90	8,00
	6,80	7,95	8,05	8,00	7,95
Média	**6,83**	**7,97**	**7,98**	**7,98**	**7,97**
Desvio padrão	**0,03**	**0,03**	**0,08**	**0,08**	**0,03**
	6,85	7,95	8,10	8,05	7,95
SA-C14-6	6,85	8,00	8,10	8,15	8,15
	6,80	8,10	8,15	8,10	8,00
Média	**6,83**	**8,02**	**8,12**	**8,10**	**8,03**
Desvio padrão	**0,03**	**0,08**	**0,03**	**0,05**	**0,10**
	6,80	7,95	7,90	8,00	8,00
SA-C14-C10	6,90	7,95	8,05	8,15	7,90
	6,80	7,95	8,00	8,05	8,05
Média	**6,83**	**7,95**	**7,98**	**8,07**	**7,98**
Desvio padrão	**0,06**	**0,00**	**0,08**	**0,08**	**0,08**

ANEXO C

Tabela 4 – Viabilidade celular (%) durante a Pré-seleção 2 (mediante ensaios de fermentação com reciclo de células) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens

	Viabilidade (%)				
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**
	71,50	65,50	59,90	53,90	53,70
SA-1	72,30	64,00	58,00	44,90	42,80
	70,30	69,00	53,90	53,90	53,20
Média	**71,37**	**66,17**	**57,27**	**50,90**	**49,90**
Desvio padrão	**1,01**	**2,57**	**3,07**	**5,20**	**6,15**
	81,50	63,00	50,00	50,00	38,00
SA-C2	77,50	62,20	52,00	51,00	46,00
	78,30	59,00	51,60	46,50	42,90
Média	**79,10**	**61,40**	**51,20**	**49,17**	**42,30**
Desvio padrão	**2,12**	**2,12**	**1,06**	**2,36**	**4,03**
	68,80	56,70	50,50	49,70	47,30
SA-C2-4	71,60	63,50	53,60	45,40	44,20
	73,00	58,70	50,30	44,30	42,00
Média	**71,13**	**59,63**	**51,47**	**46,47**	**44,50**
Desvio padrão	**2,14**	**3,49**	**1,85**	**2,85**	**2,66**
	88,20	69,30	61,40	58,60	56,80
SA-C9	93,50	79,70	63,70	62,70	57,50
	89,50	76,60	72,30	66,50	65,60
Média	**90,40**	**75,20**	**65,80**	**62,60**	**59,97**
Desvio padrão	**2,76**	**5,34**	**5,75**	**3,95**	**4,89**
	79,00	67,50	51,60	49,80	41,50
SA-C14	75,90	65,30	51,70	43,80	43,00
	70,60	62,80	58,80	46,20	43,30
Média	**75,17**	**65,20**	**54,03**	**46,60**	**42,60**
Desvio padrão	**4,25**	**2,35**	**4,13**	**3,02**	**0,96**
	79,90	66,60	59,40	57,50	56,50
SA-C14-6	78,16	71,90	64,60	59,00	55,80
	80,70	66,20	60,80	56,00	56,00
Média	**79,59**	**68,23**	**61,60**	**57,50**	**56,10**
Desvio padrão	**1,30**	**3,18**	**2,69**	**1,50**	**0,36**
	78,70	69,70	57,50	57,00	53,30
SA-C14-C10	82,70	68,20	59,90	48,60	47,70
	80,80	66,30	60,80	51,30	50,60
Média	**80,73**	**68,07**	**59,40**	**52,30**	**50,53**
Desvio padrão	**2,00**	**1,70**	**1,71**	**4,29**	**2,80**

ANEXO D

Tabela 5 – Teor de biomassa, úmida centrifugada (g) ao final dos 7 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (primeiro lote)

	Biomassa (g)						
Linhagem	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**B7**
	3,09	3,50	3,76	3,96	4,32	4,56	4,32
SA-1	3,09	3,53	3,80	4,01	4,35	4,62	4,34
	3,07	3,52	3,78	4,04	4,31	4,54	4,32
Média	**3,08**	**3,52**	**3,78**	**4,00**	**4,33**	**4,57**	**4,33**
Desvio padrão	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,04**	**0,02**	**0,04**	**0,01**
	3,15	3,60	3,84	4,18	4,58	4,86	4,58
103	3,14	3,61	3,91	4,30	4,69	4,95	4,65
	3,15	3,60	3,92	4,28	4,75	5,01	4,69
Média	**3,15**	**3,60**	**3,89**	**4,25**	**4,67**	**4,94**	**4,64**
Desvio padrão	**0,01**	**0,01**	**0,04**	**0,06**	**0,09**	**0,08**	**0,06**
	3,08	3,60	3,81	4,05	4,39	4,85	4,62
242	3,15	3,66	3,91	4,21	4,67	5,02	4,75
	3,11	3,62	3,87	4,14	4,58	4,95	4,71
Média	**3,11**	**3,63**	**3,86**	**4,13**	**4,55**	**4,94**	**4,69**
Desvio padrão	**0,04**	**0,03**	**0,05**	**0,08**	**0,14**	**0,09**	**0,07**
261	3,08	3,47	3,70	3,94	4,30	4,57	4,31
	3,10	3,49	3,73	3,96	4,34	4,59	4,29
	3,10	3,47	3,72	3,98	4,39	4,57	4,35
Média	**3,09**	**3,48**	**3,72**	**3,96**	**4,34**	**4,58**	**4,32**
Desvio padrão	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,05**	**0,01**	**0,03**
	3,09	3,41	3,59	3,75	4,13	4,31	4,07
277	3,10	3,43	3,63	3,80	4,23	4,39	4,15
	3,13	3,46	3,66	3,81	4,18	4,39	4,11
Média	**3,11**	**3,43**	**3,63**	**3,79**	**4,18**	**4,36**	**4,11**
Desvio padrão	**0,02**	**0,03**	**0,04**	**0,03**	**0,05**	**0,05**	**0,04**
	3,06	3,45	3,57	3,74	4,20	4,43	4,09
291	3,05	3,45	3,61	3,82	4,20	4,50	4,25
	3,02	3,41	3,53	3,74	4,24	4,47	4,18
Média	**3,04**	**3,44**	**3,57**	**3,77**	**4,21**	**4,47**	**4,17**
Desvio padrão	**0,02**	**0,02**	**0,04**	**0,05**	**0,02**	**0,04**	**0,08**
	3,04	3,47	3,62	3,86	4,37	4,66	4,55
408	3,04	3,46	3,65	3,92	4,33	4,63	4,56
	3,06	3,46	3,67	3,96	4,39	4,72	4,66
Média	**3,05**	**3,46**	**3,65**	**3,91**	**4,36**	**4,67**	**4,59**
Desvio padrão	**0,01**	**0,01**	**0,03**	**0,05**	**0,03**	**0,05**	**0,06**
	3,09	3,90	4,26	4,59	5,00	5,32	5,26
572	3,06	3,87	4,30	4,59	5,05	5,47	5,41
	3,08	3,89	4,32	4,63	5,05	5,44	5,42
Média	**3,08**	**3,89**	**4,29**	**4,60**	**5,03**	**5,41**	**5,36**
Desvio padrão	**0,02**	**0,02**	**0,03**	**0,02**	**0,03**	**0,08**	**0,09**

ANEXO E

Tabela 6 – Teor de etanol (%, v/v) nos vinhos ao final dos 7 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (primeiro lote)

	Etanol (%)						
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**	**V6**	**V7**
	7,90	7,60	8,10	8,70	8,30	8,85	8,85
SA-1	8,00	7,40	8,10	8,40	8,20	8,80	8,85
	7,90	7,55	8,10	8,45	8,10	8,90	8,85
Média	**7,93**	**7,52**	**8,10**	**8,52**	**8,20**	**8,85**	**8,85**
Desvio padrão	**0,06**	**0,10**	**0,00**	**0,16**	**0,10**	**0,05**	**0,00**
	8,00	7,55	8,05	8,15	8,10	8,95	8,75
103	7,95	7,40	8,10	8,20	8,10	8,85	8,75
	7,95	7,63	8,05	8,10	8,15	8,85	8,75
Média	**7,97**	**7,53**	**8,07**	**8,15**	**8,12**	**8,88**	**8,75**
Desvio padrão	**0,03**	**0,12**	**0,03**	**0,05**	**0,03**	**0,06**	**0,00**
	7,85	7,40	8,05	8,20	8,20	8,90	8,8
242	7,70	7,45	8,10	8,20	8,05	8,95	8,8
	7,70	7,35	8,05	8,20	8,00	9,00	8,8
Média	**7,75**	**7,40**	**8,07**	**8,20**	**8,08**	**8,95**	**8,80**
Desvio padrão	**0,09**	**0,05**	**0,03**	**0,00**	**0,10**	**0,05**	**0,00**
	7,50	7,50	8,00	8,20	8,10	8,90	8,75
261	7,95	7,50	8,10	8,15	8,10	8,90	8,8
	7,95	7,50	8,15	8,25	8,10	8,90	8,8
Média	**7,80**	**7,50**	**8,08**	**8,20**	**8,10**	**8,90**	**8,78**
Desvio padrão	**0,26**	**0,00**	**0,08**	**0,05**	**0,00**	**0,00**	**0,03**
	7,90	7,45	8,15	8,25	8,10	8,90	8,75
277	7,85	7,50	8,20	8,25	8,05	8,90	8,75
	8,00	7,45	8,10	8,25	8,10	8,90	8,80
Média	**7,92**	**7,47**	**8,15**	**8,25**	**8,08**	**8,90**	**8,77**
Desvio padrão	**0,08**	**0,03**	**0,05**	**0,00**	**0,03**	**0,00**	**0,03**
	7,90	7,45	8,15	8,25	8,00	8,80	8,65
291	7,80	7,50	8,20	8,15	8,05	8,90	8,75
	7,95	7,50	8,15	8,10	8,00	9,00	8,65
Média	**7,85**	**7,48**	**8,17**	**8,17**	**8,02**	**8,90**	**8,68**
Desvio padrão	**0,07**	**0,03**	**0,03**	**0,08**	**0,03**	**0,10**	**0,06**
	7,80	7,50	8,10	8,20	8,10	8,85	8,85
408	8,00	7,45	8,10	8,15	8,15	9,05	8,90
	7,70	7,50	8,10	8,30	8,05	8,90	8,85
Média	**7,83**	**7,48**	**8,10**	**8,22**	**8,10**	**8,93**	**8,87**
Desvio padrão	**0,15**	**0,03**	**0,00**	**0,08**	**0,05**	**0,10**	**0,03**
	7,85	7,40	8,00	8,05	7,95	8,80	8,55
572	7,85	7,40	8,05	8,05	8,10	8,90	8,55
	7,75	7,40	7,95	8,10	8,20	8,85	8,75
Média	**7,82**	**7,40**	**8,00**	**8,07**	**8,08**	**8,85**	**8,62**
Desvio padrão	**0,06**	**0,00**	**0,05**	**0,03**	**0,13**	**0,05**	**0,12**

ANEXO F

Tabela 7 – Viabilidade celular (%) para as diferentes linhagens ao final dos ciclos fermentativos referente à avaliação final (primeiro lote)

	Viabilidade (%)						
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**	**V6**	**V7**
	100,00	98,70	97,60	94,10	87,10	75,50	76,00
SA-1	97,00	92,50	96,90	96,30	89,20	73,50	72,70
	98,00	96,40	97,00	96,10	87,80	71,30	68,70
Média	**98,33**	**95,87**	**97,17**	**95,50**	**88,03**	**73,43**	**72,47**
Desvio padrão	**1,53**	**3,13**	**0,38**	**1,22**	**1,07**	**2,10**	**3,66**
	100,00	98,00	90,30	92,40	89,80	69,70	65,00
103	99,00	96,60	92,40	94,50	87,30	71,50	65,50
	100,00	99,40	96,90	90,90	86,20	72,40	65,00
Média	**99,67**	**98,00**	**93,20**	**92,60**	**87,77**	**71,20**	**65,17**
Desvio padrão	**0,58**	**1,40**	**3,37**	**1,81**	**1,84**	**1,37**	**0,29**
	99,50	96,90	98,20	96,50	95,00	86,90	76,70
242	99,60	98,60	97,60	96,50	97,70	82,90	79,30
	99,50	98,00	98,20	96,70	96,40	84,30	78,20
Média	**99,53**	**97,83**	**98,00**	**96,57**	**96,37**	**84,70**	**78,07**
Desvio padrão	**0,06**	**0,86**	**0,35**	**0,12**	**1,35**	**2,03**	**1,31**
	100,00	94,40	97,90	93,40	89,90	82,90	68,40
261	99,00	94,40	98,30	93,40	91,10	83,70	65,00
	99,50	97,80	97,80	95,10	89,20	79,20	70,50
Média	**99,50**	**95,53**	**98,00**	**93,97**	**90,07**	**81,93**	**67,97**
Desvio padrão	**0,50**	**1,96**	**0,26**	**0,98**	**0,96**	**2,40**	**2,78**
	97,00	95,20	94,30	91,50	83,70	76,10	65,00
277	**95,00**	**93,90**	**94,40**	**90,70**	**84,50**	69,30	60,20
	96,00	94,60	93,90	89,80	83,50	69,80	57,70
Média	**96,00**	**94,57**	**94,20**	**90,67**	**83,90**	**71,73**	**60,97**
Desvio padrão	**1,00**	**0,65**	**0,26**	**0,85**	**0,53**	**3,79**	**3,71**
	100,00	99,20	99,50	96,70	93,50	81,30	77,80
291	99,00	99,00	97,70	95,50	91,00	83,60	82,50
	99,70	98,50	99,40	96,70	91,70	80,00	80,00
Média	**99,57**	**98,90**	**98,87**	**96,30**	**92,07**	**81,63**	**80,10**
Desvio padrão	**0,51**	**0,36**	**1,01**	**0,69**	**1,29**	**1,82**	**2,35**
	100,00	99,20	98,70	97,00	94,40	86,70	82,40
408	99,00	99,60	97,50	96,90	93,50	87,50	84,00
	98,00	99,00	98,20	97,50	94,50	88,00	83,90
Média	**99,00**	**99,27**	**98,13**	**97,13**	**94,13**	**87,40**	**83,43**
Desvio padrão	**1,00**	**0,31**	**0,60**	**0,32**	**0,55**	**0,66**	**0,90**
	97,00	94,60	96,50	81,80	84,50	73,40	75,40
572	97,00	94,70	94,30	84,10	83,50	78,20	72,70
	95,00	94,90	93,20	82,20	83,70	76,00	78,00
Média	**96,33**	**94,73**	**94,67**	**82,70**	**83,90**	**75,87**	**75,37**
Desvio padrão	**1,15**	**0,15**	**1,68**	**1,23**	**0,53**	**2,40**	**2,65**

ANEXO G

Tabela 8 – Teor de biomassa, úmida centrifugada (g) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (segundo lote)

	Biomassa (g)				
Linhagem	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**
	3,17	3,09	3,03	3,12	3,44
SA-1	3,17	3,07	3,00	3,08	3,35
	3,19	3,10	3,07	3,22	3,44
Média	**3,18**	**3,09**	**3,03**	**3,14**	**3,41**
Desvio padrão	**0,01**	**0,02**	**0,04**	**0,07**	**0,05**
	3,34	3,30	3,19	3,24	3,39
SA-C9	3,30	3,24	3,22	3,27	3,44
	3,37	3,29	3,26	3,39	3,55
Média	**3,34**	**3,28**	**3,22**	**3,30**	**3,46**
Desvio padrão	**0,04**	**0,03**	**0,04**	**0,08**	**0,08**
	3,27	3,34	3,32	3,37	3,41
SA-C14-6	3,27	3,31	3,35	3,33	3,50
	3,29	3,34	3,40	3,40	3,63
Média	**3,28**	**3,33**	**3,36**	**3,37**	**3,51**
Desvio padrão	**0,01**	**0,02**	**0,04**	**0,04**	**0,11**
	3,24	3,22	3,23	3,24	3,49
L5 col 10	3,26	3,27	3,29	3,29	3,53
	3,27	3,27	3,28	3,33	3,44
Média	**3,26**	**3,25**	**3,27**	**3,29**	**3,49**
Desvio padrão	**0,02**	**0,03**	**0,03**	**0,05**	**0,05**
	3,39	3,30	3,23	3,37	3,55
289	3,37	3,38	3,22	3,35	3,59
	3,36	3,40	3,27	3,41	3,68
Média	**3,37**	**3,36**	**3,24**	**3,38**	**3,61**
Desvio padrão	**0,02**	**0,05**	**0,03**	**0,03**	**0,07**
	3,30	3,14	2,97	2,96	3,11
362	3,33	3,11	3,03	3,04	3,17
	3,30	3,17	3,04	3,05	3,13
Média	**3,31**	**3,14**	**3,01**	**3,02**	**3,14**
Desvio padrão	**0,02**	**0,03**	**0,04**	**0,05**	**0,03**
	3,23	3,22	3,37	3,45	3,50
365	3,31	3,25	3,32	3,50	3,57
	3,37	3,34	3,36	3,45	3,60
Média	**3,30**	**3,27**	**3,35**	**3,47**	**3,56**
Desvio padrão	**0,07**	**0,06**	**0,03**	**0,03**	**0,05**
	3,46	3,49	3,43	3,48	3,59
430	3,47	3,48	3,45	3,53	3,56
	3,43	3,46	3,44	3,49	3,63
Média	**3,45**	**3,48**	**3,44**	**3,50**	**3,59**
Desvio padrão	**0,02**	**0,02**	**0,01**	**0,03**	**0,04**

ANEXO H

Tabela 9 – Teor de etanol (%, v/v) nos vinhos ao final dos 7 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente à avaliação final (segundo lote)

	Etanol (%)				
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**
	9,00	9,05	9,05	8,90	8,80
SA-1	9,00	9,00	9,00	8,80	8,75
	9,00	9,10	9,15	8,90	8,85
Média	**9,00**	**9,05**	**9,07**	**8,87**	**8,80**
Desvio padrão	**0,00**	**0,05**	**0,08**	**0,06**	**0,05**
	9,00	9,15	9,25	8,85	8,65
SA-C9	8,95	9,15	9,15	8,90	8,70
	8,90	9,10	9,25	8,95	8,75
Média	**8,95**	**9,13**	**9,22**	**8,90**	**8,70**
Desvio padrão	**0,05**	**0,03**	**0,06**	**0,05**	**0,05**
	8,90	9,25	9,15	8,75	8,65
SA-C14-6	8,95	9,20	9,25	8,85	8,60
	8,85	9,20	9,25	8,80	8,65
Média	**8,90**	**9,22**	**9,22**	**8,80**	**8,63**
Desvio padrão	**0,05**	**0,03**	**0,06**	**0,05**	**0,03**
	8,95	9,10	9,15	8,75	8,65
L5col10	9,00	9,05	9,20	8,85	8,70
	9,00	9,10	9,05	8,80	8,70
Média	**8,98**	**9,08**	**9,13**	**8,80**	**8,68**
Desvio padrão	**0,03**	**0,03**	**0,08**	**0,05**	**0,03**
	9,00	9,20	9,20	8,95	8,70
289	8,95	9,25	9,00	8,85	8,75
	8,95	9,15	9,05	8,80	8,70
Média	**8,97**	**9,20**	**9,08**	**8,87**	**8,72**
Desvio padrão	**0,03**	**0,05**	**0,10**	**0,08**	**0,03**
	8,85	9,10	9,25	8,90	8,75
362	9,00	9,10	9,15	8,90	8,75
	8,90	9,10	9,15	8,95	8,75
Média	**8,92**	**9,10**	**9,18**	**8,92**	**8,75**
Desvio padrão	**0,08**	**0,00**	**0,06**	**0,03**	**0,00**
	9,00	9,15	9,35	8,80	8,55
365	8,70	9,20	9,40	8,80	8,60
	8,80	9,15	9,35	8,90	8,65
Média	**8,83**	**9,17**	**9,37**	**8,83**	**8,60**
Desvio padrão	**0,15**	**0,03**	**0,03**	**0,06**	**0,05**
	9,05	9,10	9,05	9,00	8,60
430	9,00	9,15	9,15	8,90	8,65
	8,95	9,15	9,30	9,00	8,65
Média	**9,00**	**9,13**	**9,17**	**8,97**	**8,63**
Desvio padrão	**0,05**	**0,03**	**0,13**	**0,06**	**0,03**

ANEXO I

Tabela 10 – Viabilidade celular (%) para as diferentes linhagens ao final dos ciclos fermentativos referente à avaliação final (segundo lote)

	Viabilidade (%)				
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**
	85,00	72,52	54,60	41,71	31,04
SA-1	85,00	68,57	60,33	42,43	30,32
	85,00	72,41	47,30	43,15	36,72
Média	**85,00**	**71,17**	**54,08**	**42,43**	**32,69**
Desvio padrão	**0,00**	**2,25**	**6,53**	**0,72**	**3,51**
	97,00	88,60	64,80	51,42	44,47
SA-C9	96,00	84,27	59,70	47,79	32,84
	98,00	88,46	66,20	44,35	37,35
Média	**97,00**	**87,11**	**63,57**	**47,85**	**38,22**
Desvio padrão	**1,00**	**2,46**	**3,42**	**3,54**	**5,86**
	98,00	91,38	81,00	59,59	47,36
SA-C14-6	99,00	91,54	78,00	52,15	33,98
	99,00	92,69	77,60	61,41	48,69
Média	**98,67**	**91,87**	**78,87**	**57,72**	**43,34**
Desvio padrão	**0,58**	**0,71**	**1,86**	**4,91**	**8,14**
	91,00	77,44	60,00	39,62	23,80
L5 col 10	93,00	73,17	62,90	34,22	24,45
	89,00	74,15	62,10	40,14	27,23
Média	**91,00**	**74,92**	**61,67**	**37,99**	**25,16**
Desvio padrão	**2,00**	**2,24**	**1,50**	**3,28**	**1,82**
	98,90	89,40	63,90	52,20	40,90
289	98,70	88,80	68,90	54,90	40,40
	97,20	89,70	66,40	53,20	58,30
Média	**98,27**	**89,30**	**66,40**	**53,43**	**46,53**
Desvio padrão	**0,93**	**0,46**	**2,50**	**1,37**	**10,19**
	97,90	83,90	65,40	61,40	48,60
362	98,70	81,00	66,70	59,40	52,30
	97,40	83,80	70,80	58,80	42,50
Média	**98,00**	**82,90**	**67,63**	**59,87**	**47,80**
Desvio padrão	**0,66**	**1,65**	**2,82**	**1,36**	**4,95**
	99,40	93,90	86,50	78,20	59,40
365	99,30	90,90	88,80	77,20	68,50
	99,20	91,60	86,00	76,10	65,40
Média	**99,30**	**92,13**	**87,10**	**77,17**	**64,43**
Desvio padrão	**0,10**	**1,57**	**1,49**	**1,05**	**4,63**
	98,50	94,40	85,40	83,70	58,50
430	99,10	93,40	86,20	81,50	61,50
	98,90	94,50	85,90	76,80	60,00
Média	**98,83**	**94,10**	**85,83**	**80,67**	**60,00**
Desvio padrão	**0,31**	**0,61**	**0,40**	**3,52**	**1,50**

ANEXO J

Tabela 11 – Teor de biomassa, úmida centrifugada (g) ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente ao ensaio fermentativo dos isolados selecionados a partir dos cruzamentos massal e direcionado

	Biomassa (g)				
Linhagem	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**
	3,42	3,56	3,55	3,73	3,77
242	3,43	3,55	3,56	3,68	3,75
	3,43	3,59	3,65	3,74	3,81
Média	**3,43**	**3,57**	**3,59**	**3,72**	**3,78**
Desvio padrão	**0,01**	**0,02**	**0,06**	**0,03**	**0,03**
	3,35	3,40	3,19	3,44	3,54
408	3,38	3,45	3,56	3,49	3,64
	3,34	3,38	3,37	3,55	3,69
Média	**3,36**	**3,41**	**3,37**	**3,49**	**3,62**
Desvio padrão	**0,02**	**0,04**	**0,19**	**0,06**	**0,08**
	3,44	3,57	3,56	3,69	3,86
CM16	3,44	3,57	3,58	3,70	3,86
	3,45	3,58	3,62	3,68	3,84
Média	**3,44**	**3,57**	**3,59**	**3,69**	**3,85**
Desvio padrão	**0,01**	**0,01**	**0,03**	**0,01**	**0,01**
	3,44	3,61	3,63	3,79	3,89
Cm20	3,46	3,46	3,52	3,67	3,82
	3,35	3,50	3,55	3,73	3,83
Média	**3,42**	**3,52**	**3,57**	**3,73**	**3,85**
Desvio padrão	**0,06**	**0,08**	**0,06**	**0,06**	**0,04**
	3,51	**3,64**	**3,55**	**3,65**	**3,77**
CM60	**3,51**	**3,66**	**3,62**	**3,66**	**3,83**
	3,48	**3,65**	**3,60**	**3,67**	**3,82**
Média	**3,50**	**3,65**	**3,59**	**3,66**	**3,81**
Desvio padrão	**0,02**	**0,01**	**0,04**	**0,01**	**0,03**
	3,36	**3,55**	**3,53**	**3,68**	**3,84**
CM76	**3,52**	**3,62**	**3,62**	**3,70**	**3,88**
	3,42	**3,57**	**3,63**	**3,76**	**3,90**
Média	**3,43**	**3,58**	**3,59**	**3,71**	**3,87**
Desvio padrão	**0,08**	**0,04**	**0,06**	**0,04**	**0,03**
	3,41	**3,53**	**3,53**	**3,73**	**3,82**
52	**3,37**	**3,62**	**3,62**	**3,76**	**3,88**
	3,38	3,70	3,63	3,77	3,83
Média	3,39	3,62	3,59	3,75	3,84
Desvio padrão	0,02	0,09	0,06	0,02	0,03
	3,47	**3,56**	**3,59**	3,73	**3,88**
68	**3,52**	**3,63**	**3,69**	3,82	**3,95**
	3,47	3,57	3,66	3,81	3,91
Média	3,49	3,59	3,65	3,79	3,91
Desvio padrão	0,03	0,04	0,05	0,05	0,04
	3,50	**3,61**	**3,69**	**3,89**	**4,02**
132	**3,49**	**3,64**	**3,76**	**3,91**	**4,01**
	3,43	3,59	3,71	3,91	4,05
Média	3,47	3,61	3,72	3,90	4,03
Desvio padrão	0,04	0,03	0,04	0,01	0,02

ANEXO L

Tabela 12 – Teor de etanol (%, v/v) nos vinhos ao final dos 5 ciclos fermentativos para as diferentes linhagens referente ao ensaio fermentativo dos isolados selecionados a partir dos cruzamentos massal e direcionado

	Etanol (%)				
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**
	8,65	9,25	8,55	9,00	8,95
242	8,55	9,20	8,40	8,95	8,80
	8,60	9,25	8,45	9,00	8,85
Média	**8,60**	**9,23**	**8,47**	**8,98**	**8,87**
Desvio padrão	**0,05**	**0,03**	**0,08**	**0,03**	**0,08**
	8,65	9,10	8,55	9,00	8,85
408	8,55	9,10	8,55	9,00	8,85
	8,55	9,10	8,45	8,95	9,00
Média	**8,58**	**9,10**	**8,52**	**8,98**	**8,90**
Desvio padrão	**0,06**	**0,00**	**0,06**	**0,03**	**0,09**
	8,65	9,35	8,60	8,95	8,90
CM16	8,65	9,40	8,50	8,95	8,85
	8,65	9,30	8,65	8,95	8,85
Média	**8,65**	**9,35**	**8,58**	**8,95**	**8,87**
Desvio padrão	**0,00**	**0,05**	**0,08**	**0,00**	**0,03**
	8,65	9,35	8,60	9,10	9,40
CM20	8,60	9,25	8,65	9,00	8,80
	8,65	9,25	8,60	8,95	8,75
Média	**8,63**	**9,28**	**8,62**	**9,02**	**8,98**
Desvio padrão	**0,03**	**0,06**	**0,03**	**0,08**	**0,36**
	8,65	9,20	8,65	8,80	8,80
CM60	8,65	9,15	8,65	8,85	8,95
	8,65	9,20	8,65	8,80	8,95
Média	**8,65**	**9,18**	**8,65**	**8,82**	**8,90**
Desvio padrão	**0,00**	**0,03**	**0,00**	**0,03**	**0,09**
	8,70	9,20	8,50	8,95	8,90
CM76	8,70	9,30	8,65	8,90	8,80
	8,65	9,30	8,55	8,95	8,75
Média	**8,68**	**9,27**	**8,57**	**8,93**	**8,82**
Desvio padrão	**0,03**	**0,06**	**0,08**	**0,03**	**0,08**
	8,65	9,10	8,50	8,90	8,85
CD52	8,65	9,10	8,55	8,90	8,85
	8,70	9,15	8,45	9,05	8,80
Média	**8,67**	**9,12**	**8,50**	**8,95**	**8,83**
Desvio padrão	**0,03**	**0,03**	**0,05**	**0,09**	**0,03**
	8,65	9,25	8,60	9,00	8,85
CD68	8,65	9,25	8,65	9,00	9,25
	8,65	9,35	8,70	9,05	9,00
Média	**8,65**	**9,28**	**8,65**	**9,02**	**9,03**
Desvio padrão	**0,00**	**0,06**	**0,05**	**0,03**	**0,20**
	8,55	9,3	8,45	9	8,85
CD132	8,55	9,15	8,40	9	8,75
	8,55	9,2	8,50	9	8,75
Média	**8,55**	**9,22**	**8,45**	**9,00**	**8,78**
Desvio padrão	**0,00**	**0,08**	**0,05**	**0,00**	**0,06**

ANEXO M

Tabela 13 – Viabilidade celular (%) para as diferentes linhagens ao final dos 5 ciclos fermentativos referente ao ensaio fermentativo dos isolados selecionados a partir dos cruzamentos massal e direcionado

	Viabilidade (%)				
Linhagem	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**
	96,90	97,00	93,40	84,40	70,00
242	97,50	95,80	88,50	83,30	71,80
	97,90	97,20	91,50	85,50	68,50
Média	**97,43**	**96,67**	**91,13**	**84,40**	**70,10**
Desvio padrão	**0,50**	**0,76**	**2,47**	**1,10**	**1,65**
	97,70	88,90	80,30	74,40	69,00
408	98,60	88,90	78,50	72,00	71,90
	96,70	89,40	79,90	73,50	72,00
Média	**97,67**	**89,07**	**79,57**	**73,30**	**70,97**
Desvio padrão	**0,95**	**0,29**	**0,95**	**1,21**	**1,70**
	100,00	99,60	93,90	84,30	74,60
CM16	99,70	98,80	92,60	86,00	73,20
	100,00	99,60	91,50	83,80	75,20
Média	**99,90**	**99,33**	**92,67**	**84,70**	**74,33**
Desvio padrão	**0,17**	**0,46**	**1,20**	**1,15**	**1,03**
	100,00	99,60	96,50	92,90	88,00
Cm20	100,00	98,90	96,30	92,50	88,20
	99,70	99,10	96,60	92,50	85,90
Média	**99,90**	**99,20**	**96,47**	**92,63**	**87,37**
Desvio padrão	**0,17**	**0,36**	**0,15**	**0,23**	**1,27**
	99,30	99,00	89,40	78,70	68,30
CM60	100,00	99,30	90,70	78,80	68,80
	99,60	98,60	89,50	80,40	69,70
Média	**99,63**	**98,97**	**89,87**	**79,30**	**68,93**
Desvio padrão	**0,35**	**0,35**	**0,72**	**0,95**	**0,71**
	100,00	99,43	97,61	87,70	86,70
CM76	99,58	99,61	95,26	88,16	87,40
	99,65	99,42	97,64	89,65	84,40
Média	**99,74**	**99,49**	**96,84**	**88,50**	**86,17**
Desvio padrão	**0,23**	**0,11**	**1,37**	**1,02**	**1,57**
	100,00	99,70	98,30	94,80	93,30
CD52	97,05	100,00	97,80	97,50	90,90
	99,60	99,75	98,42	93,20	92,70
Média	**98,88**	**99,82**	**98,17**	**95,17**	**92,30**
Desvio padrão	**1,60**	**0,16**	**0,33**	**2,17**	**1,25**
	99,78	99,65	98,76	95,25	92,00
CD68	99,61	99,68	98,73	94,28	89,30
	100,00	99,20	98,29	94,47	93,80
Média	**99,80**	**99,51**	**98,59**	**94,67**	**91,70**
Desvio padrão	**0,20**	**0,27**	**0,26**	**0,51**	**2,26**
	100,00	100,00	98,63	94,80	88,96
CD132	99,34	98,44	97,81	92,51	88,11
	100,00	98,62	98,30	95,40	89,49
Média	**99,78**	**99,02**	**98,25**	**94,24**	**88,85**
Desvio padrão	**0,38**	**0,85**	**0,41**	**1,53**	**0,70**

ANEXO N

Tabela 14 – Relação e identificação dos híbridos obtidos mediante cruzamentos direcionados (inter e intra linhagens parentais) indicando a origem dos haploides e seu “mating type”.

origem	haploide "a"	origem	haploide "α"	Identificação do hibrido gerado (CD)
408	76	242	11	1, 3 e 4
408	59	242	11	2
408	8a	408	44	5 a 10
408	91	408	44	11 a 14
242	26	408	44	15 a 19
242	84	408	44	20 a 25
242	80	408	44	26 a 29
408	93	408	44	30 a 36
242	80	408	44	37
242	107	408	78	38 a 44
242	96	242	112	45 a 52
408	73	408	78	58 a 63
242	22	242	11	53 a 57
408	59	408	78	64 a 68
242	26	242	11	69
408	73	242	11	70 a 76
242	17	242	11	77 a 80
242	17	408	78	81 a 83
242	50	408	44	84 a 89
242	39	408	44	90 a 95
242	54	408	44	96 a 101
408	57	408	44	102 a 104
408	18A	408	44	105 a 110
408	12B	408	44	111 a 116
408	14B	408	44	117 a 121
408	8A	408	44	122 a 127
242	116	242	144	128 e 129
242	78	242	141	130 e 131
242	107	242	119	132 a 135
242	96	242	119	136 a 138
242	78	242	119	139 a 142
408	14B	408	78	143 e 144
242	107	242	141	145 a 148
242	116	242	11	149 e 150
242	116	242	11	151 a 155