

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DESIRRÊ ALEXIA LOURENÇO PETTERS

COMPARAÇÃO FISIOLÓGICA DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

CURITIBA – PR

2015

DESIRRÊ ALEXIA LOURENÇO PETTERS

COMPARAÇÃO FISIOLÓGICA DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Monografia apresentada à disciplina BIO028 – Estágio Supervisionado em Biologia (300h) como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

Orientador: MSc. Felipe Senne de Oliveira Lino

Co-orientadora: Dr^a Chirlei Glienke

CURITIBA – PR

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, seja direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

A todos os integrantes de Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da *Novozymes Latin America*, pela companhia, ensinamentos e bons momentos vividos nestes dois anos de estágio, e em especial ao MSc. Felipe Senne de Oliveira Lino pela orientação no desenvolvimento do trabalho e supervisão das atividades desenvolvidas na fermentação e também ao restante dos integrantes da “Fermentação”, Camila, João e Víctor, que também muito me ajudaram para que esta monografia fosse possível. Agradeço também às estagiárias Larissa, Nicolle, Helyandra, Elisama, Thais, e aos antigos estagiários Diogo, Fernanda e Bruna, que estiveram sempre presentes no dia-a-dia de laboratório e tornaram tudo mais divertido.

Aos integrantes do Laboratório de Genética de Microrganismos, especialmente à Dr^a Chirlei Glienke, co-orientadora deste trabalho e que me orientou por quase três anos durante minha Iniciação Científica, fornecendo a oportunidade de trabalhar com Genética, Biologia Molecular e Microbiologia. À Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, que muito me ensinou durante meu período no LabGeM e durante minha monitoria em BG038, pela disposição em avaliar este trabalho. A Eduardo Goulin, pelos bons momentos e por todo o conhecimento que compartilhou comigo durante seu Mestrado, quando realizei minha Iniciação Científica.

Ao Dr. Thiago Olitta Basso, por sua supervisão durante o período em que estive na *Novozymes Latin America* e por aceitar o convite para avaliar este trabalho.

Aos amigos e colegas do curso de Ciências Biológicas pela companhia dentro e fora da Universidade, durante todo o período da graduação.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, pela competência em transmitir seus conhecimentos e auxílio durante a graduação.

Aos amigos, pelos bons momentos vividos, conselhos, companhia e compreensão durante a graduação, em especial à Nivea e Juliana, que estiveram comigo desde muito antes da graduação começar.

À minha família, por todo o amor e apoio muito antes do início da graduação, para que este projeto de vida fosse possível.

RESUMO

A indústria sucroalcooleira possui grande importância na economia brasileira, sendo referência para os outros países graças a diversos fatores, como a grande produção de cana-de-açúcar e domínio do ciclo completo da produção de etanol. Melhorias neste processo industrial são possíveis em diversos aspectos, sendo um deles a fermentação realizada por leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Tais leveduras são submetidas a diversas fontes de stress industrialmente, como alta concentração de etanol, alta pressão osmótica, pH baixo, alta temperatura, presença de compostos tóxicos, todos fatores oriundos da prática de reciclagem de células, típica do processo brasileiro. Além disso, há uma grande diversidade de linhagens, que respondem de maneiras diferentes a tais fatores, tornando impossível estabelecer um processo uniforme e adequado a todas as linhagens. Para avaliar de forma mais adequada o perfil de cada linhagem, torna-se necessária a existência de ensaios em escala laboratorial que possam simular os processos industriais, gerando informações relevantes e que possam ser aplicadas para a interpretação de situações que ocorrem em usinas. No presente trabalho foram realizadas fermentações na escala de 50mL utilizando as leveduras CAT-1, PE-2 e BRT, e dois diferentes melaços como fonte de açúcares, avaliando viabilidade celular, rendimento em etanol, produção de glicerol, ácido láctico e acético, a fim de comparar as diferentes linhagens e melaços. Os resultados obtidos demonstram que o ensaio é capaz de simular condições industriais e reproduzir resultados descritos em literatura, sendo então uma ferramenta útil para avaliar o desempenho de linhagens em diferentes condições.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação alcoólica

ABSTRACT

The sugarcane industry is very important to the Brazilian economy, being a reference for other countries thanks to several factors, such as the high production of sugarcane and knowledge about the full cycle of ethanol production. Improvements in the industrial process are possible in many aspects, one of them being the fermentation conducted by yeasts, mainly by the species *Saccharomyces cerevisiae*. Such yeasts are subjected to several sources of stress in the industrial context, such as high ethanol concentration, high osmotic pressure, low pH, high temperature, presence of toxic compounds, all those factors associated with the practice cell-recycling, typical of Brazilian ethanol production process. Furthermore, there is a great diversity of strains, which respond differently to such factors, making it impossible to set a uniform and appropriate procedure for all strains. To assess more clearly each strain profile, it is necessary to conduct trials in laboratory scale simulating the industrial processes, generating relevant information which could be applied to interpret situations that occur in industrial plants. In this work fermentations in 50 mL scale were carried using CAT-1, PE-2 and BRT yeast strains and two different molasses as a source of sugars, evaluating cell viability, ethanol yield, glycerol, lactic and acetic acid production, in order to compare the different strains and molasses. The results show that the test is able to simulate industrial conditions and reproduce results described in the literature, being a useful tool to evaluate the performance of strains in different conditions.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTIMATIVAS DE CUSTO DE PRODUÇÃO DE ETANOL EM DÓLARES POR LITRO PARA DIFERENTES SUBSTRATOS E REGIÕES	12
FIGURA 2 - ESQUEMA RESUMIDO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AÇÚCAR E ETANOL A PARTIR DE CANA-DE-AÇÚCAR	20
FIGURA 3 - FRASCOS COM MOSTO DE PROPAGAÇÃO ESTÉRIL.....	30
FIGURA 4 - TUBOS APÓS A PREPARAÇÃO DO CICLO DE FERMENTAÇÃO.....	32
FIGURA 5 - CÉLULAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CORADAS COM ERITROSINA, OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO (AUMENTO DE 400X).....	33
FIGURA 6 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	38
FIGURA 7 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2.....	39
FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2.....	40
FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2.....	42
FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2.....	43
FIGURA 11 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	45
FIGURA 12 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT	46
FIGURA 13 - VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS EM MELAÇOS A E B.....	48
FIGURA 14 - RENDIMENTO EM ETANOL DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B.....	49
FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B.....	50
FIGURA 16 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 PARA OS MELAÇOS A E B.....	51
FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - BALANÇO ENERGÉTICO DA PRODUÇÃO DE ETANOL PARA DIVERSOS SUBSTRATOS.....	12
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA E CONCENTRAÇÃO RECOMENDADA PARA A FERMENTAÇÃO DE ALGUNS COMPONENTES PRESENTES EM SUBSTRATOS DERIVADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR	22
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE COMPONENTES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO NOS MELAÇOS A E B.....	27
TABELA 4 – VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	37
TABELA 5 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	39
TABELA 6 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	40
TABELA 7- PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	41
TABELA 8 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2	43
TABELA 9 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT	44
TABELA 10 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT	46
TABELA 11 - DADOS DE VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA CAT-1 NOS MELAÇOS A E B.....	47
TABELA 12 - RENDIMENTO EM ETANOL DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B	49
TABELA 13 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 PARA OS MELAÇOS A E B.....	50
TABELA 14 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 PARA OS MELAÇOS A E B.....	51
TABELA 15 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B	52

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATP - *Adenosine triphosphate* / Adenosina trifosfato

NAD⁺ - *Nicotinamide adenine dinucleotide* / Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada

NADH - *Nicotinamide adenine dinucleotide* / Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida

HPLC - *High-performance liquid chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	16
3.1.1	Metabolismo celular.....	16
3.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.2	PRODUÇÃO BRASILEIRA DE ETANOL	17
3.3	FATORES QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO BRASILEIRO	21
3.3.1	Contaminação.....	21
3.3.2	Composição do substrato	22
3.4	LINHAGENS DE LEVEDURA DENTRO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO BRASILEIRO	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	25
4.2	MEIOS DE CULTURA.....	25
4.2.1	Meio YPD	25
4.2.2	Meio YPD-Agar.....	26
4.3	MELAÇOS.....	26
4.4	SOLUÇÕES	27
4.4.1	Tampão Fosfato.....	27
4.4.2	Solução Estoque de Eritrosina.....	27
4.4.3	Solução de Trabalho de Eritrosina.....	28
4.4.4	Fase móvel de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 5mmol/L.....	28
4.4.5	Ácido sulfúrico 1mol/L.....	28
4.4.6	Mosto de propagação	28
4.4.7	Mosto de fermentação	29
4.5	MÉTODOS	30
4.5.1	Ensaio de fermentação	30
4.5.2	Determinação de açúcares e outros compostos.....	32

4.5.3	Viabilidade celular.....	33
4.5.4	Rendimento da produção de etanol.....	34
4.5.5	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS	37
5.1	COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E PE-2 EM MELAÇO A ..	37
5.1.1	Viabilidade celular.....	37
5.1.2	Rendimento na produção de etanol.....	38
5.1.3	Produção de glicerol	40
5.1.4	Produção de ácido láctico.....	41
5.1.5	Produção de ácido acético	42
5.2	COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E BRT EM MELAÇO B ..	44
5.2.1	Viabilidade celular.....	44
5.2.2	Rendimento na produção de etanol.....	45
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE MELAÇOS A E B PARA A LINHAGEM CAT-1.....	47
5.3.1	Viabilidade celular.....	47
5.3.2	Rendimento na produção de etanol.....	48
5.3.3	Produção de glicerol	49
5.3.4	Produção de ácido láctico.....	51
5.3.5	Produção de ácido acético	52
6	DISCUSSÃO.....	54
6.1	COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E PE-2 EM MELAÇO A ..	54
6.2	COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E BRT EM MELAÇO B ..	55
6.3	COMPARAÇÃO ENTRE MELAÇOS A E B PARA A LINHAGEM CAT-1.....	56
7	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICES.....	62

1 INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo biológico onde moléculas orgânicas (e.g. glicose ($C_6H_{12}O_6$), frutose ($C_6H_{12}O_6$) e sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)) são utilizadas como doadoras eceptoras finais de elétrons. Desta forma, esta rota metabólica não faz uso de O_2 como aceptor final de elétrons e a molécula metabolizada não se encontra em seu estado mais oxidado ao final do ciclo. Além da manutenção do balanço interno de cofatores e geração de duas moléculas de ATP por molécula de glicose, metabólitos como etanol (C_2H_6O) e dióxido de carbono (CO_2) são também gerados. Devido ao fato da fermentação independe de um aceptor final de elétrons inorgânico (e.g. O_2), a mesma é considerada um processo anaeróbio. A fermentação alcoólica ocorre em diversos processos presentes no cotidiano, tais como a produção de bebidas alcoólicas (sendo o vinho e a cerveja os exemplos mais conhecidos), panificação, e produção de etanol como combustível, sendo este o biocombustível mais consumido do planeta (WALKER, 2010).

O etanol utilizado como biocombustível, normalmente é produzido através da fermentação de açúcares diretamente fermentescíveis por leveduras, tais como sacarose, glicose e frutose (BASSO *et al.*, 2011). Como fontes destes açúcares para a fermentação é possível citar beterraba e cana-de-açúcar, embora também exista a possibilidade de trabalhar com outras fontes como milho ou materiais lignocelulósicos. Entretanto, para estas fontes, os açúcares estão disponíveis na forma de polissacarídeos (amido e celulose, respectivamente), sendo necessária hidrólise para a liberação dos açúcares diretamente fermentescíveis, uma vez que as leveduras não são capazes de utilizar os polissacarídeos para fermentação (NOVA CANA, 2015; BASSO *et al.*, 2011). Esta etapa adicional tende a aumentar os custos de produção de etanol a partir destes substratos, uma vez que há necessidade de produção de enzimas hidrolíticas (NIELSEN, 2014).

Segundo Walker (2010), o custo de obtenção do etanol no Brasil é mais baixo que em outros países, como observado na FIGURA 1. O custo de produção sofre influencia principalmente da matéria-prima utilizada. De acordo com Petrou (2009), o custo da matéria prima pode oscilar entre 50 e 80% do custo total.

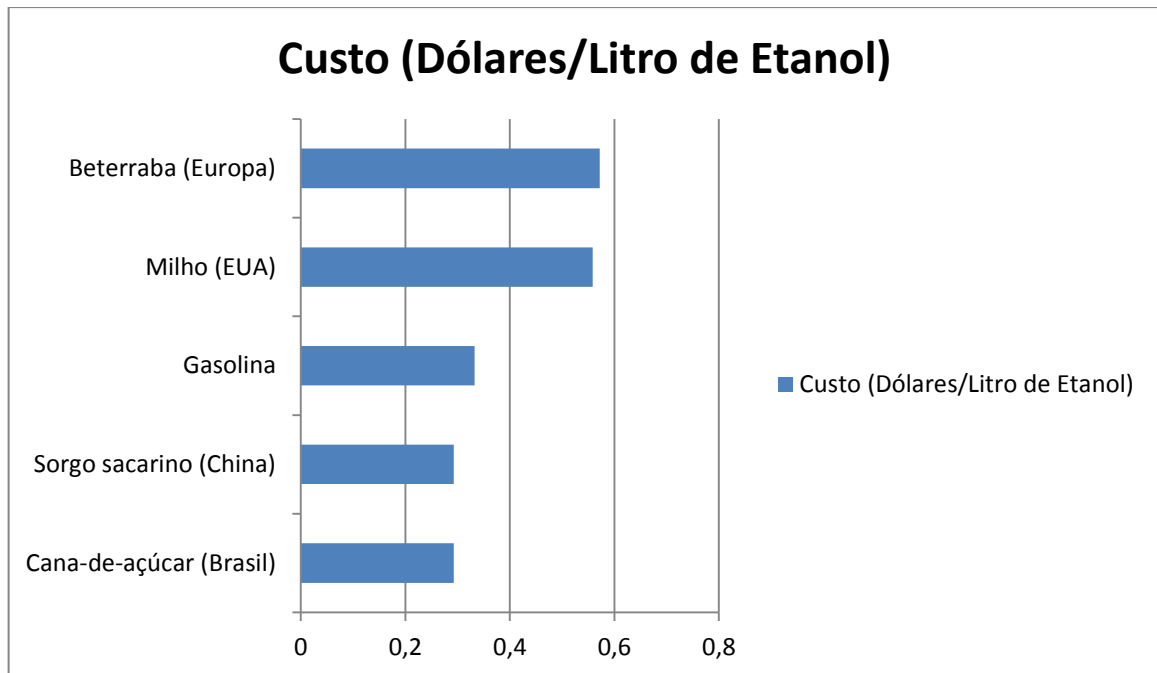


FIGURA 1 - ESTIMATIVAS DE CUSTO DE PRODUÇÃO DE ETANOL EM DÓLARES POR LITRO PARA DIFERENTES SUBSTRATOS E REGIÕES
 FONTE: WALKER (2010).

NOTA: Valores originais em euro, convertidos para dólar. Para os dados de cana-de-açúcar e beterraba foram utilizadas as médias da faixa de custo, de 0,21-0,37\$/L para a cana-de-açúcar e 0,42-0,71\$/litro para a beterraba.

Além do custo de produção, outro parâmetro importante para avaliar a viabilidade do processo é o balanço energético, definido como a razão entre a energia produzida e a energia consumida para que o processo fosse possível. Na TABELA 1 são apresentados os balanços de diversos substratos, em unidades de energia obtida para unidade de energia investida, e percebe-se que o melhor balanço energético ocorre para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, bastante promissor inclusive se comparado à gasolina.

TABELA 1 - BALANÇO ENERGÉTICO DA PRODUÇÃO DE ETANOL PARA DIVERSOS SUBSTRATOS

Matéria-prima	Balanço energético
Cana-de-açúcar	6,5-9,5:1
Beterraba	1,1-2,3:1
Sorgo sacarino	0,9-1,1:1
Materiais lignocelulósicos	Dependente do material, mas geralmente positivo
Milho	1-2:1
Gasolina	6:1

FONTE: WALKER (2010).

NOTA: Balanço definido em unidades de energia obtidas para unidade de energia investida.

O Brasil, graças ao seu histórico de sucesso na produção de cana-de-açúcar desde o século XVI, foi o primeiro país a introduzir este combustível em sua matriz energética, e por várias décadas o Brasil foi o principal produtor de etanol no mundo (tendo produzido aproximadamente 23 bilhões de litros na safra de 2014), e mesmo tendo sido ultrapassado recentemente pelos EUA (que produziram aproximadamente 54 bilhões de litros utilizando milho, matéria-prima de menor eficiência), ainda é referência em produção sustentável do produto. (BASSO *et al.*, 2011; NOVA CANA, 2015; RFA, 2014).

O setor sucroalcooleiro nacional é referência para os outros países graças a diversos fatores, como: 1) a grande produção de cana-de-açúcar (sendo o maior produtor global, tendo produzido cerca de 739 milhões de toneladas em 2013, seguido pela Índia, com 341 milhões de toneladas, e pela China, com 126 milhões de toneladas); 2) a disponibilidade de terras cultiváveis para o plantio da cana sem prejuízo do plantio de outros alimentos e 3) domínio do ciclo completo da produção de etanol, desde lavouras de alta produtividade até destilarias que geram este combustível a partir da fermentação do caldo extraído da cana (MAPA, 2015; UDOP, 2015, FAO, 2015). Resíduos do processo também podem ser eficientemente aproveitados pela indústria. Resíduos sólidos como o bagaço podem ser utilizados para produzir etanol de segunda geração, através de hidrólise para conversão da celulose em açúcares simples, ou como biomassa para produção de energia (inclusive elétrica) através de outros processos, como a queima em caldeiras (NOVA CANA, 2015).

Além disso, existem vantagens características do produto em si, pois o etanol é um combustível renovável e sustentável, uma vez que é obtido através de vegetais, e boa parte do gás-carbônico lançado à atmosfera durante sua produção é absorvido pela própria cana-de-açúcar durante a fotossíntese em seu ciclo de vida. O etanol reduz a emissão de gases de efeito estufa e outros poluentes, se comparado a combustíveis derivados do petróleo, sendo assim extremamente viável ecologicamente (NOVA CANA, 2015).

O etanol pode ser utilizado tanto de forma pura ou misturado à gasolina. O etanol comum presente nos postos é o etanol hidratado, numa mistura de 96% de etanol e o restante de água. Já quando é misturado à gasolina, está presente em sua forma anidra – pelo menos 99,6% de álcool em sua composição. No Brasil, a proporção de etanol pode variar entre 18% até 27,5%, segundo determinação do

governo via lei 13.033, de 24 de setembro de 2014. Além disso, a indústria automobilística brasileira desenvolveu veículos denominados “flex”, com motores capazes de funcionar em qualquer proporção de mistura de gasolina e etanol armazenados no mesmo tanque. Estas duas medidas conjuntamente favoreceram o consumo de etanol no país, permitindo que ultrapassasse o consumo da gasolina em 2008 (NOVA CANA, 2015).

Considerando a importância da indústria sucroalcooleira na economia brasileira, é possível perceber a grande relevância de estudos que possam promover melhorias para todo este processo. Apesar de já ser uma indústria bem estabelecida, melhorias incrementais podem ser atingidas em diversas frentes, sendo uma delas a compreensão e melhoria de parâmetros relacionados à fisiologia da *Saccharomyces cerevisiae*, principal organismo de escolha para produção de etanol. As melhorias podem ser feitas tanto visando lidar com o stress industrial à que as leveduras são submetidas (alta concentração de etanol, alta pressão osmótica, pH baixo, alta temperatura, presença de compostos tóxicos, todos fatores oriundos da prática de reciclo de células), tanto para o stress biológico vindo da contaminação bacteriana (BASSO *et al.*, 2011).

Entretanto, a grande diversidade existente de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* torna impossível estabelecer um processo uniforme e adequado a todas as linhagens. Cada linhagem possui características fisiológicas diferentes, tornando-as mais ou menos adaptadas a diferentes condições. É importante estabelecer o perfil destas linhagens, de modo a evidenciar como se comportam em diferentes situações, avaliando diferenças de viabilidade celular e rendimento na produção de etanol. Para poder avaliar estes parâmetros, é necessária a existência de um ensaio de fermentação em escala laboratorial que possa simular de maneira razoável a fermentação industrial, para que as informações obtidas possam ser de relevância para a interpretação de situações que ocorrem em usinas.

Sendo assim, este trabalho se destina a estabelecer o perfil de algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em ambiente industrial, através da realização de um ensaio de fermentação em escala laboratorial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica de melaço de cana de açúcar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar ensaios de fermentação de melaço de cana de açúcar simulando da melhor forma possível o processo *Melle-Boinot* (batelada alimentada de alta densidade celular, sem esterilidade e com reciclo de células) em escala laboratorial;

Acompanhar viabilidade celular, rendimento em produção de etanol, produção de glicerol e ácidos acético e láctico das linhagens CAT-1, PE-2 e BRT durante os ensaios de fermentação, usando dois melaços diferentes.

Analisar os resultados de forma crítica, considerando o contexto fisiológico no qual as linhagens se apresentam, avaliando diferenças entre as linhagens utilizadas e influência da composição do melaço na fermentação;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

3.1.1 Metabolismo celular

Açúcares (principalmente glicose) ocupam uma posição central no metabolismo de vários microrganismos, plantas e animais. São excelentes fontes de energia química para as células, visto que a oxidação completa de glicose até dióxido de carbono gera uma mudança de energia livre de $-2,840\text{kJ/mol}$. Para algumas células (como células vegetais), estocar glicose na forma de polímeros de alto peso molecular como amido ou glicogênio pode auxiliar a manter grandes quantidades de unidades de hexose sem aumentar a osmolaridade do citosol. Quando há demanda de energia por parte da célula, a glicose pode ser liberada destes polímeros de armazenamento e ser utilizada para produzir ATP, seja aerobicamente ou anaerobicamente (NELSON, 2008).

A glicose pode ter quatro principais destinos nos diferentes organismos: pode ser utilizada para a síntese de oligossacarídeos complexos, destinados ao espaço extracelular, pode ser estocada nas células na forma de polissacarídeos ou sacarose, degradada através da glicólise para fornecer ATP ou oxidada pela via das pentoses-fosfato (fosfogluconato) para fornecer ribose-5-fosfato (utilizado na síntese de ácidos nucleos e NADPH) (NELSON, 2008).

Na glicólise (do grego “*glykys*”, doce/açúcar and “*lysis*”, quebra), uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas, para gerar duas moléculas de piruvato. Durante a sequência de reações, parte da energia livre liberada pela glicose é conservada na forma de ATP e NADH. Para diversos organismos a glicólise é apenas uma etapa na degradação da glicose, pois o piruvato obtido é transportado para dentro da mitocôndria, onde é convertido à CO_2 e Acetil-CoA, a qual é completamente oxidada à CO_2 e H_2O , e o NADH doa seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (ALBERTS *et al.*, 2010).

Entretanto, existem diversos organismos que não utilizam o oxigênio em seus processos, de modo que a glicólise acaba se tornando a principal forma pela qual são capazes de gerar energia para os processos celulares, por não envolver oxigênio durante as reações (ALBERTS *et al.*, 2010). Apesar disso, alguns

organismos, como leveduras, não são capazes de tolerar altas concentrações de moléculas ácidas no interior da célula, sendo o piruvato um exemplo deste tipo de molécula. Evolutivamente, desenvolveu-se uma maneira de remover o excesso de piruvato, convertendo-o em CO₂ e etanol, que são facilmente eliminados pela célula. Dessa forma, o NADH formado na glicólise é reoxidado à NAD (podendo ser novamente utilizado na glicólise) e acetaldeído é convertido a etanol, mantendo o balanço de oxidação e redução no interior da célula (INGLEDEW, 2003). O conjunto de reações responsável por estas transformações é denominado fermentação (ALBERTS *et al.*, 2010).

3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Um dos principais organismos a realizar a fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae* é um levedura pertencente ao filo Ascomycota. Unicelular (embora algumas linhagens possam apresentar crescimento através de pseudohifas), suas células são ovoides e tem tamanho variável, de 5-10µm de diâmetro (DARBY, 2012). Podem existir na forma haploide, mas normalmente se encontram na forma diploide, reproduzindo-se assexuadamente por brotamento, mas em condições de stress podem gerar esporos haploides capazes de realizar reprodução sexuada (ZÖRGÖ, 2013).

São capazes de utilizar glicose, frutose, sacarose e maltose como fonte de carbono, sendo incapazes de utilizar lactose ou celobiose (CBS, 2015). Podem utilizar amônia e ureia como fonte de nitrogênio, e também necessitam de fósforo e enxofre. Alguns metais como ferro, cálcio, magnésio e zinco podem melhorar seu crescimento (DARBY, 2012).

3.2 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE ETANOL

A produção brasileira de etanol é feita a partir da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), uma monocotiledônea da família Poaceae, cultivada em países tropicais e subtropicais (KEW ROYAL BOTANICAL GARDENS, 2015). É rica em açúcares diretamente fermentescíveis, contendo de 12-17% de açúcares totais em peso úmido (68-72% de umidade), com a sacarose correspondendo a 90% dos açúcares, glicose e frutose correspondendo aos outros 10% (WHEALS *et al.*, 1999).

Após a colheita e transporte, a cana chega às usinas e é submetida a uma lavagem, para remover areia, terra e impurezas, e picada. Após esta etapa, a cana passa pela etapa de extração dos açúcares, geralmente feita por moagem, onde é moída por rolos trituradores para produzir o caldo. Há também a possibilidade de realizar a extração através do processo de difusão, onde os açúcares são removidos por lixiviação, através de sucessivas lavagens (ALCARDE, 2006).

A eficiência de extração dos açúcares no caldo nesta etapa é de aproximadamente 95%, enquanto os sólidos restantes caracterizam o bagaço, que pode ser utilizado para gerar eletricidade, fazendo com que a unidade industrial seja autossuficiente energeticamente (BASSO *et al.*, 2011; NIELSEN, 2014; NOVA CANA, 2015, WHEALS *et al.*, 1999).

Em seguida, o caldo é filtrado, para eliminar resíduos como restos de bagaço e outros, e segue para repouso em um tanque, para que os resíduos e impurezas ainda presentes possam decantar, depositando-se no fundo no tanque. Após a decantação, o caldo puro é obtido e é denominado caldo clarificado. Em destilarias que produzem exclusivamente etanol, sem produzir açúcar, esse caldo é aquecido para que possa ser esterilizado e em seguida fermentado (NOVA CANA, 2015).

Já em plantas onde há a produção combinada de açúcar e etanol, após a clarificação o caldo é concentrado através de evaporação até que ocorra a cristalização da sacarose. Os cristais de sacarose são coletados através de centrifugação, restando uma fase viscosa que contém de 45-60% de sacarose e de 5-20% de glicose/frutose, chamada melaço. Tanto o caldo quanto o melaço podem ser utilizados para a fermentação, seja isoladamente ou misturados, sendo a segunda opção considerada um melhor substrato, uma vez que o caldo possui algumas deficiências nutricionais e o melaço apresenta compostos que podem ser inibitórios para a fermentação. (BASSO *et al.*, 2011)

A fermentação ocorre em dornas, onde o caldo é misturado com água ou melaço formando o mosto de fermentação. Este mosto possui aproximadamente 15 – 20% (p/v) em teor de açúcares (principalmente sacarose, glicose e frutose). O mosto de fermentação é limitado em nitrogênio, fazendo com que o crescimento celular (ou seja, produção de massa celular) seja mínimo (NIELSEN, 2014). A fermentação é conduzida por leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que fermentam os açúcares presentes e produzem etanol e gás carbônico. Em geral esse processo pode levar de 6 a 11 horas, com conversão de

açúcares próxima a 90% e cerca de 10% de etanol no vinho (mosto fermentado) após a fermentação, e ocorre em um sistema sem assepsia, onde a contaminação por outros microrganismos é comum, sendo bactérias ácido-láticas o principal grupo de microrganismos contaminantes. (BASSO *et al.*, 2011; SKINNER, 2004). De acordo com BASSO *et al.* (2011), o processo fermentativo mais comum (presente em 75% das destilarias) é o processo *Melle-Boinot*, construído por um processo de batelada alimentada com alta densidade celular (i.e. em torno de 10 a 14% (peso úmido/volume; obtido através do reciclo de células), sem esterilidade, onde o caldo é misturado aos poucos com as leveduras para ser fermentado, e ao final da fermentação, as células são coletadas via centrifugação e utilizadas num novo ciclo. Cerca de 90 a 95% das células são coletadas por após cada batelada de fermentação, mantendo assim, altas densidades celulares dentro das dornas. Essa alta densidade celular é responsável pelo curto tempo de fermentação citado anteriormente, quando comparado com o processo de fermentação do milho, que pode durar de 40 a 50 horas.

Como vantagens do reciclo de células, pode-se citar a redução da necessidade de propagar as leveduras antes começar um novo ciclo, e assim menos açúcar é desviado da produção de etanol para a produção de biomassa. No Brasil, a biomassa celular é reutilizada pelo menos duas vezes por dia, dentro de um período de safra de cana de açúcar de 200 a 250 dias. Entretanto, a extensa reutilização de um mesmo inóculo pode favorecer a presença de contaminantes, sejam eles bactérias ou outras linhagens e espécies de leveduras, conforme citado anteriormente. A contaminação é uma situação que deve ser evitada, pois gera diversos problemas, como desvio do uso de açúcares (que, ao invés de serem usados para produzir etanol pelas leveduras, são utilizados para produção de metabólitos como ácido láctico e acético pelas bactérias), redução no rendimento de etanol, floculação das células de levedura, causando diminuição da eficiência na centrifugação e recuperação da biomassa celular, formação de espuma e redução da viabilidade de células de levedura (BASSO *et al.*, 2011). Todas estas consequências da contaminação geram problemas para o processo industrial, bem como prejuízos financeiros, ao exigirem uso de produtos químicos como antiespumantes e dispersantes, ou antibióticos, de modo que se torna essencial possuir medidas para lidar com essa questão. Sendo assim, normalmente antes de se iniciar um novo ciclo as leveduras coletadas são tratadas com ácido sulfúrico,

mantendo o pH numa faixa de 1,8 até 2,5, num tempo que pode variar desde uma hora e meia até três horas, para reduzir a possibilidade de contaminação. Células mais novas ou mais velhas são menos resistentes ao tratamento, e quanto maior o tempo em que as células permanecem neste pH, menor será a sua viabilidade ao final do processo (BASSO *et al.*,2011; OLIVA-NETO *et al.*,2013).

Após o término da fermentação, ao separar as células para o reciclo, obtêm-se o mosto de levedurado (sem massa de leveduras) também chamado de vinho, que é enviado para destilação. Nesta etapa, o vinho é colocado em colunas de destilação, onde é aquecido até evaporar. Como o ponto de ebulição do álcool é menor que o da água, ele evapora primeiro e segue para a condensação, sendo transformado novamente em líquido e separado do vinho. Obtém-se assim o etanol hidratado. Para que seja obtido o álcool anidro, é necessário realizar-se a etapa de desidratação, separando a água restante do álcool. Pode ser feita através de mistura de solvente que se misture apenas com a água e evaporação desta mistura de água e solvente, ou através de peneira molecular (NOVA CANA, 2015).

As etapas do processo podem ser observadas em esquema resumido na FIGURA 2.

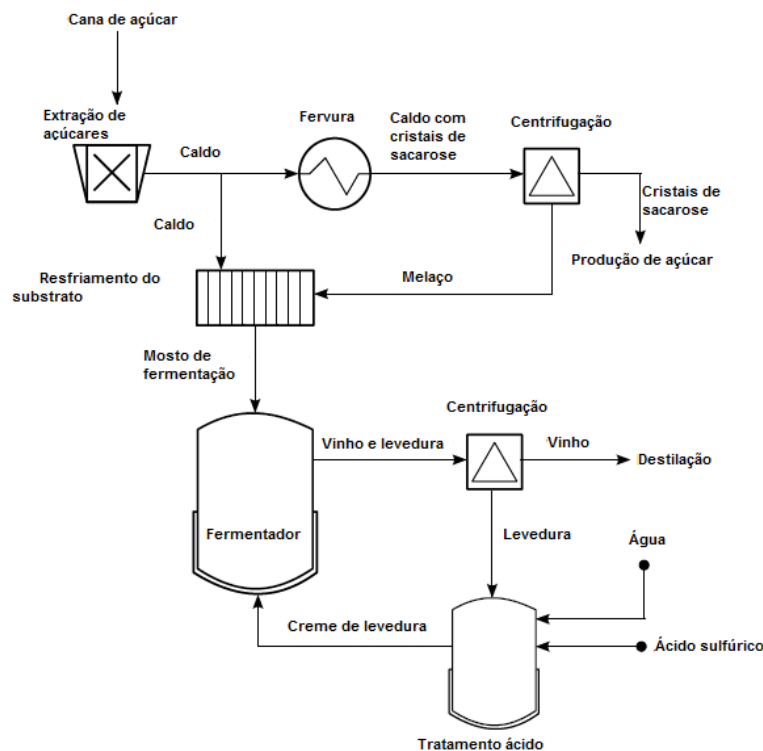


FIGURA 2 - ESQUEMA RESUMIDO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AÇÚCAR E ETANOL A PARTIR DE CANA-DE-AÇÚCAR
 FONTE: NIELSEN (2014), adaptado.

3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO BRASILEIRO

A principal característica que diferencia o processo brasileiro dos processos realizados em outras regiões e com outros substratos é o reciclo de células, que faz com que as células sejam constantemente submetidas a condições industriais estressantes como altas temperaturas, baixo pH, presença de etanol, excesso de sais ou compostos inibitórios presentes no melaço, deficiência de nutrientes, metabólitos produzidos por bactérias, entre outros (BASSO *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2011). Compreender como estes fatores afetam as células é extremamente importante, uma vez que podem reduzir o rendimento em etanol e afetar a produtividade do processo (NIELSEN, 2014). Entretanto, devido às características peculiares do processo, torna-se difícil aplicar o conhecimento obtido em investigações de processos de produção de etanol a partir de outros substratos (como milho e beterraba), ou para outras finalidades (como produção de bebidas alcoólicas fermentadas como uísque, cerveja, vinho e saquê), porque as condições de operação são completamente diferentes (AMORIM *et al.*, 2011). Além disso, poucos são os laboratórios capazes de reproduzir as condições industriais em escala de bancada (AMORIM *et al.*, 2011), o que reforça a necessidade de buscar ensaios que estejam de acordo com o que se observa em situações reais.

3.3.1 Contaminação

Devido ao constante reciclo de células e à grande escala do processo, condições de assepsia dificilmente são conseguidas, de modo que as fermentações industriais estão sujeitas à contaminação por bactérias. As bactérias contaminantes mais frequentes são bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, provavelmente devido à sua habilidade de suportar o pH baixo e a alta concentração de etanol (BASSO *et al.*, 2011; SKINNER, 2004; AMORIM *et al.*, 2011). Tais bactérias desviam os açúcares que, ao invés de serem utilizados pelas leveduras para produzir etanol, serão utilizados pelas bactérias para produzir metabólitos como ácido láctico e acético. Tais metabólitos podem alterar o desempenho das leveduras,

causando floculação, formação de espuma, redução de viabilidade e rendimento em etanol (BASSO *et al.*, 2011).

Além disso, pode ocorrer contaminação do processo por leveduras selvagens, tanto linhagens de *Saccharomyces* como de leveduras de outros gêneros, como *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Schizosaccharomyces pombe*. Contaminações de outras espécies podem ser controladas através de modificações no processo, entretanto, uma contaminação vinda de uma linhagem selvagem de *Saccharomyces* é muito mais difícil de controlar, uma vez que tais apresentam um metabolismo muito similar às linhagens selecionadas utilizadas no processo. Muitas vezes linhagens selvagens apresentam características inadequadas ao processo, como floculação, produção excessiva de espuma, baixo rendimento em etanol e fermentação incompleta (AMORIM *et al.*, 2011; BASSO *et al.*, 2011).

3.3.2 Composição do substrato

Segundo Basso *et al.* (2011), a composição dos substratos derivados da cana-de-açúcar pode variar amplamente, sendo influenciada tanto por aspectos relacionados ao cultivo da planta, como variedade, maturidade, condições climáticas e do solo, como por aspectos do processamento e produção do melaço e caldo. A TABELA 2 apresenta a faixa de concentração de alguns componentes que é encontrada nestes materiais e a faixa recomendada para o processo de fermentação.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA E CONCENTRAÇÃO RECOMENDADA PARA A FERMENTAÇÃO DE ALGUNS COMPONENTES PRESENTES EM SUBSTRATOS DERIVADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Componente	Faixa de concentração (mg/L)	Nível ótimo (mg/L)
Nitrogênio (NH ₄ ⁺ and R-NH ₂)	70-350	100-300
Fósforo (P)	20-200	50-250
Potássio (K)	300-12000	700-1300
Magnésio (Mg)	80-3900	100-200
Enxofre (S)	80-3900	Tão baixo quanto possível
Cálcio (Ca)	150-2000	Tão baixo quanto possível
Zinco (Zn)	0,45-9	1-5
Cobre (Cu)	0,20-8	1-5
Manganês (Mn)	2-8	1-5
Alumínio (Al)	2-500	<10 (no caldo)

FONTE: BASSO *et al.* (2011).

Alguns desses componentes podem apresentar efeitos tóxicos e diminuir o desempenho da fermentação. Por exemplo, altas concentrações de alumínio podem afetar a viabilidade, rendimento, taxa de fermentação e diminuir os níveis de trealose na célula. Os efeitos podem variar entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo relatado que a linhagem CAT-1 é menos sensível se comparada à linhagem PE-2 ou outras linhagens comerciais (BASSO *et al.*, 2011).

Além disso, altos níveis de sais como potássio, magnésio e cálcio podem exceder as necessidades nutricionais da levedura e aumentar a pressão osmótica, gerando respostas como aumento da produção de glicerol, o que acaba por reduzir a produção de etanol (BASSO *et al.*, 2011).

3.4 LINHAGENS DE LEVEDURA DENTRO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO BRASILEIRO

Devido aos baixos custos e disponibilidade em grandes quantidades, as culturas inicialmente empregadas no processo brasileiro são derivadas de linhagens disponíveis comercialmente (usadas geralmente no processo de panificação). Entretanto, estudos cariotípicos para a detecção de variação entre linhagens demonstraram que as linhagens iniciais rapidamente eram substituídas por linhagens selvagens ao longo dos ciclos, e que algumas linhagens apresentavam maior persistência e eram capazes de substituir outras quando reintroduzidas no processo. Este foi um dos primeiros indicadores da possibilidade de selecionar linhagens a partir da biodiversidade encontrada nas destilarias para se tornarem a linhagem da cultura inicial (BASSO *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Basso *et al.* (2008) buscaram por linhagens com prevalência ao longo da safra e que apresentassem características apropriadas para o processo, como pouca formação de espuma, alto rendimento em etanol, baixa produção de glicerol e alta viabilidade celular durante os ciclos. Linhagens que apresentavam tais características foram reintroduzidas no processo e avaliadas quanto à sua capacidade de dominar o processo. As linhagens CAT-1 e PE-2 apresentam as maiores capacidades de implantação (51-58% das destilarias onde foram introduzidas) e grande competitividade em relação às linhagens contaminantes, representando de 45 a 54% da biomassa durante a safra, chegando a representar a biomassa total em algumas destilarias durante mais de 200 dias de

reciclo. Estas características foram responsáveis por tornar as duas linhagens as mais utilizadas para iniciar uma fermentação, estando presentes em mais de 200 destilarias e sendo responsáveis por 60% da produção de etanol do país (BASSO, *et al.*, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens utilizadas nos ensaios de fermentação estão depositadas no banco de microrganismos do departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, da *Novozymes Latin America*.

As linhagens CAT-1 e PE-2 foram escolhidas por serem linhagens descritas na literatura como possuindo fenótipos de interesse no processo industrial, como pouca formação de espuma, alto rendimento em etanol, baixa produção de glicerol e alta viabilidade celular durante os ciclos, e serem amplamente utilizadas, responsáveis por cerca de 60% da produção de etanol do país (BASSO *et al.*, 2011). Já a linhagem BRT foi escolhida por apresentar produção de espuma excessiva, um fenótipo indesejável em condições industriais por exigir consumo de químicos como antiespumantes e dispersantes, uma vez que a espuma ocupa espaço dentro das dornas (obrigando que o volume de trabalho da fermentação seja reduzido) e a biomassa tende a se acumular na espuma, fazendo com que menos células tenham contato com o mosto (JUNKER, 2007), o que reduz o rendimento em etanol.

Para criação de alíquotas para o estoque, culturas de *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivadas em frascos contendo meio YPD, *overnight*, a 32°C. Após o crescimento, 20% (v/v) de glicerol foi adicionado e alíquotas de 1mL foram estocadas em tubos criogênicos, a -80°C. Cada alíquota pode ser utilizada para preparar os pré-inóculos para os ensaios de fermentação.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio YPD

Peptona	20g
Glicose	20g
Extrato de levedura	10g
Água deionizada	q.s.p. 1000mL

Os componentes foram dissolvidos em água deionizada e o meio de cultura foi esterilizado em autoclave (modelo 39206, Phoenix Luferco) em um ciclo de 20 minutos a 2 atm.

4.2.2 Meio YPD-Agar

Peptona	20g
Glicose	20g
Extrato de levedura	10g
Ágar	15g
Água deionizada	q.s.p. 1000mL

Os componentes foram dissolvidos em água deionizada e o meio de cultura foi esterilizado em autoclave em um ciclo de 20 minutos a 2 atm.

4.3 MELAÇOS

Para a realização dos ensaios de fermentação foram escolhidos dois melaços provenientes de duas usinas diferentes localizadas no estado de São Paulo. Por questões de confidencialidade, os nomes das usinas não serão divulgados, sendo caracterizados apenas como melaços A e B.

A concentração de alguns componentes é apresentada na TABELA 3, e foi obtida através de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente. Nesta técnica, as amostras são destruídas em ácido nítrico (HNO_3) concentrado e vaporizadas em uma fonte de excitação de plasma de argônio, que causa a excitação dos elementos devido à alta temperatura (10000 °K). Essa excitação faz com que os átomos de cada elemento emitam luz num comprimento de onda definido, que pode ser detectada utilizando um dispositivo de carga acoplada.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE COMPONENTES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO NOS MELAÇOS A E B

Componente	A (mg/L)	B (mg/L)
Nitrogênio (NH ₄ ⁺ and R-NH ₂)	2,40	4,10
Fósforo (P)	153,17	385,91
Potássio (K)	10677,96	17223,45
Magnésio (Mg)	1817,43	3531,51
Enxofre (S)	5022,6	3048,31
Cálcio (Ca)	5388,12	3237,94
Zinco (Zn)	4,45	4,02
Cobre (Cu)	1,25	2,86
Manganês (Mn)	27,52	32,87
Alumínio (Al)	12,92	139,69

FONTE: Ulrik Sidenius (comunicação pessoal, 2015).

4.4 SOLUÇÕES

4.4.1 Tampão Fosfato

Fosfato de Sódio Dibásico Anidro 35,8g

(Na₂HPO₄)

Di-hidrogeno Fosfato de Sódio 13,78g

(NaH₂PO₄)

Água deionizada estéril q.s.p. 1000mL

Adicionaram-se os reagentes sólidos em balão volumétrico de 1000mL contendo aproximadamente 800mL de água deionizada estéril e o sistema foi agitado através de agitação magnética até que os reagentes estivessem dissolvidos. O volume do balão foi completado para 1000mL com água deionizada estéril, fechou-se o balão e homogeneizou-se a solução. O conteúdo foi transferido para um frasco fechado e armazenado a 4°C, por no máximo 8 meses.

4.4.2 Solução Estoque de Eritrosina

Eritrosina B Sal Sódico (C₂₀H₆I₄O₅Na₂) 0,5g

Água deionizada estéril q.s.p. 50mL

Dissolveu-se a eritrosina em água deionizada estéril e a solução foi transferida para um frasco âmbar fechado, e armazenada fora do alcance da luz, a 4°C, por no máximo 8 meses.

4.4.3 Solução de Trabalho de Eritrosina

Solução Estoque de Eritrosina	200 μ L
Tampão Fosfato	10mL

Diluiu-se a solução estoque de eritrosina no tampão fosfato e a solução resultante foi armazenada em frasco fechado, a 4°C.

4.4.4 Fase móvel de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5mmol/L

Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄)	554 μ L
Água Milli-Q	q.s.p. 2L

Pipetou-se o ácido sulfúrico em balão volumétrico de 2L contendo aproximadamente 1900mL de Água Milli-Q. O volume do balão foi completado para 2L, fechou-se o balão e homogeneizou-se a solução. O conteúdo foi transferido para um frasco fechado e armazenado a 4°C.

4.4.5 Ácido sulfúrico 1mol/L

Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄)	2,805mL
Água Milli-Q	q.s.p 50mL

Em uma proveta contendo aproximadamente 40mL de água Milli-Q, mantida em banho de gelo, adicionou-se lentamente o ácido sulfúrico, homogeneizando devagar. Completou-se o volume para 50mL e o conteúdo foi transferido para um frasco fechado, armazenado a 4°C, por no máximo um mês.

4.4.6 Mosto de propagação

Melaço	~400g
--------	-------

Extrato de levedura	10g
Água de torneira	q.s.p 2000mL

Diluiu-se o melão em água de torneira até atingir a concentração de 10°Brix, determinada através do uso de um refratômetro (modelo RX-5000α, ATAGO). 1° Brix corresponde a 1g de sólidos solúveis em 100g de solução à 20°C. Em uma solução com alto teor de açúcares e sem muitas impurezas, o Brix pode ser utilizado como uma medida aproximada da quantidade de açúcares na solução, de modo 10° Brix correspondem a aproximadamente de 10g de açúcares (sacarose, glicose e frutose) em 100g de solução.

Após a diluição, centrifugou-se (modelo *Sorvall*TM LYNX 6000, *Thermo Scientific*) a 4000rpm por 15 minutos, para remover possíveis impurezas sólidas do material. Em seguida, transferiu-se 2L para outro recipiente, suplementou-se com o extrato de levedura, e o mosto foi homogeneizado.

O conteúdo foi dividido em porções de 100, 500 e 1400mL e transferido para três frascos fechados e esterilizado em autoclave em um ciclo de 20 minutos a 2 atm.

4.4.7 Mosto de fermentação

Melão	~400g
Água de torneira	q.s.p 1000mL

Diluiu-se o melão em água de torneira até atingir a concentração de 20°Brix (cerca de 200g de açúcares redutores por litro), determinada através do uso de um refratômetro. Após a diluição, centrifugou-se a 4000rpm por 15 minutos, para remover possíveis impurezas sólidas do material.

Transferiu-se o conteúdo para um frasco fechado, que foi esterilizado em autoclave em um ciclo de 20 minutos a 2 atm. Após autoclavagem, em condições assépticas, com uso de fluxo laminar (modelo BioSeg 12, Grupo Veco), dividiu-se o mosto em porções menores, que foram armazenadas a -20°C. Cada porção foi descongelada no máximo duas vezes.

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Ensaio de fermentação

As células de uma alíquota que foi mantida em estoque a -80°C foram cultivadas em placas de meio YPD-ágar, incubadas por 48 horas em estufa bacteriológica (modelo TE-392/I, TECNAL) a 30°C . A partir desta placa, uma colônia isolada foi escolhida e transferida para um tubo de ensaio contendo 8mL de YPD, que foi incubado por mais 24 horas em estufa bacteriológica a 30°C , sem agitação.

Todo o conteúdo do tubo foi então transferido para o frasco contendo 100mL mosto de propagação, e incubado novamente em estufa bacteriológica a 30°C , sem agitação. Após 24 horas, realizou-se nova transferência para o frasco contendo 500mL de mosto, incubado também em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas, sem agitação. Por fim, realizou-se a última transferência para o frasco contendo 1400mL, que foi incubado durante 48 horas em estufa bacteriológica a 30°C , sem agitação. Todas as transferências foram realizadas em fluxo laminar, para evitar contaminações. O mosto dividido nos frascos pode ser observado na FIGURA 3.



FIGURA 3 - FRASCOS COM MOSTO DE PROPAGAÇÃO ESTÉRIL

FONTE: A autora (2015).

Para o preparo do primeiro ciclo de fermentação, o material foi centrifugado a 4000rpm por 15 minutos, para coletar a biomassa celular produzida e que seria utilizada nos ensaios e separá-la do mosto fermentado. Após determinar a quantidade em gramas de biomassa obtida, diluiu-se a biomassa no mosto fermentado, para atingir aproximadamente 0,4g de células por mL. A biomassa diluída foi pipetada em tubos de centrifugação de 50mL (modelo 91050, TPP/*Techno Plastics Products AG*), de massa conhecida, e tais tubos foram centrifugados a 4000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram pesados novamente, para determinar a quantidade de biomassa presente em cada tubo. A partir deste valor, foram determinadas as quantidades de vinho e água necessárias para a preparação do creme de levedura/pé-de-cuba (biomassa celular diluída em água e vinho de levedurado da propagação, numa concentração de cerca de 30% (m/v) de células). O creme foi alimentado com o mosto de fermentação, de modo que representasse 30% do volume total de fermentação, de modo semelhante ao que ocorre no processo industrial. Os tubos foram fechados com tampas ventiladas (conforme observado na FIGURA 4) e mantidos em estufa bacteriológica a 32°C, sem agitação, durante seis horas. Após este período, foram retirados e mantidos em temperatura ambiente *overnight*.

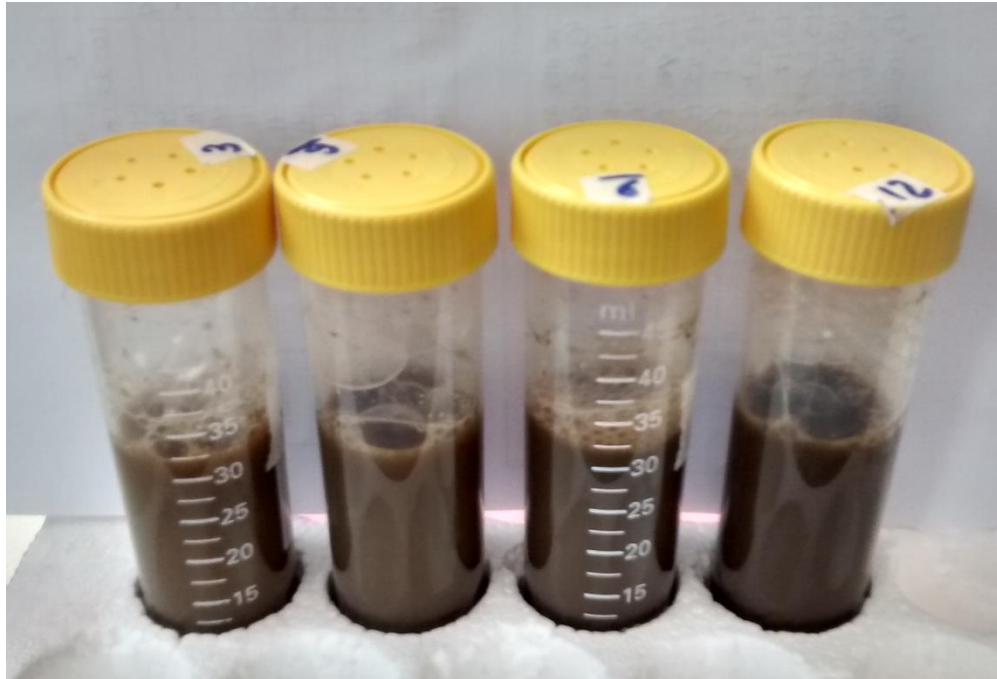


FIGURA 4 - TUBOS APÓS A PREPARAÇÃO DO CICLO DE FERMENTAÇÃO
 FONTE: A autora (2015).

Para a preparação dos ciclos seguintes, os tubos foram novamente centrifugados para separar a biomassa do mosto fermentado no dia anterior. Novamente preparou-se o creme de levedura, a partir do sobrenadante da centrifugação (vinho delevedurado) e água. Este creme teve seu pH ajustado para 2,5 com ácido sulfúrico 1mol/L, e permaneceu nesta condição em temperatura ambiente por 1 hora, simulando o tratamento ácido que ocorre industrialmente, e que tem o objetivo de controlar a contaminação bacteriana existente no processo. Ao fim do tratamento ácido, repete-se o processo de alimentação já descrito para o primeiro ciclo.

4.5.2 Determinação de açúcares e outros compostos

O vinho delevedurado do fim de cada ciclo e da propagação foi utilizado para determinar a presença de açúcares residuais (glicose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos, etanol e glicerol. Os compostos foram separados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (*Agilent*) usando uma coluna de trocas iônicas HPX-87H (*BioRad*) a 60°C, com H₂SO₄ 5mmol/L como fase móvel num fluxo de 0,7L por minuto. Glicose, etanol, ácido acético, glicerol e ácido láctico foram detectados por um detector de índice de refração. Para o mosto de fermentação

contendo alta concentração de sacarose, os açúcares foram analisados usando o mesmo *set up* de equipamento, porém a 25°C e fase móvel num fluxo de 0,5mL por minuto, para evitar a hidrólise da sacarose.

4.5.3 Viabilidade celular

Ao fim de cada ciclo, antes da centrifugação, os tubos tiveram seu conteúdo ressuspendido e alíquotas de 100µl foram retiradas para a determinação da viabilidade celular. As células foram coradas com a solução de trabalho de eritrosina e contadas em câmara de Neubauer. Ao utilizar eritrosina, as células mortas adquirem uma coloração rosada, enquanto as vivas continuam transparentes (conforme observado na FIGURA 5).

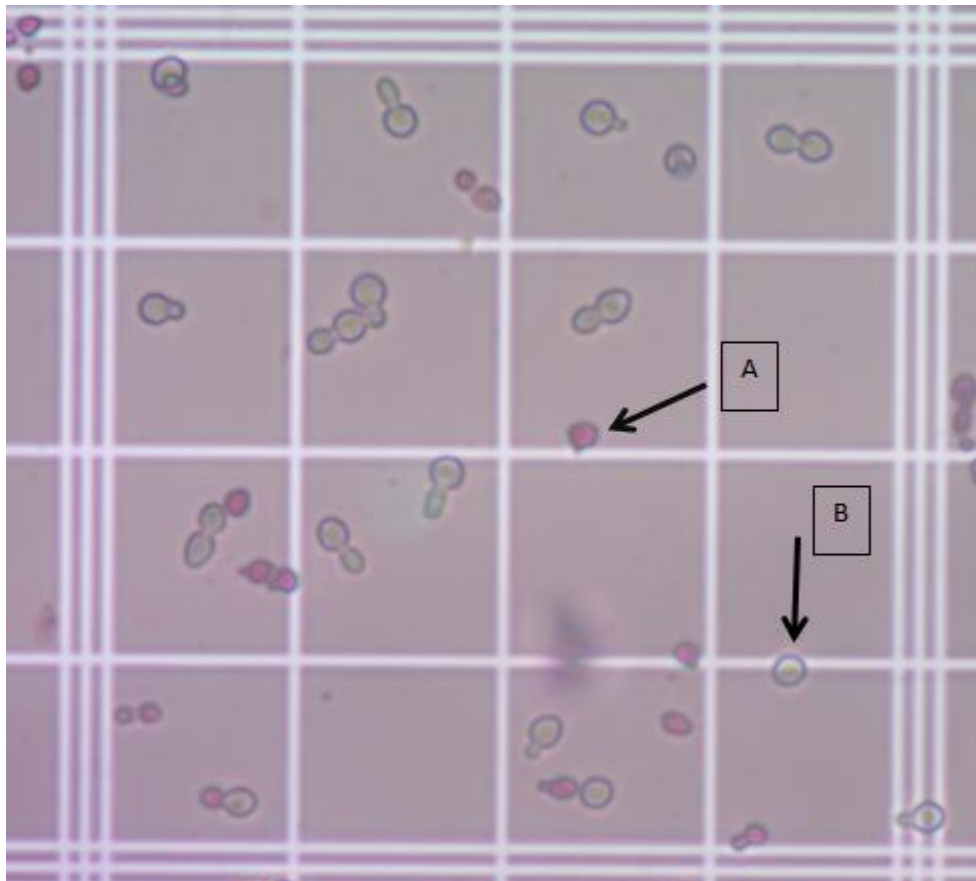


FIGURA 5 - CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae* CORADAS COM ERITROSINA, OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO (AUMENTO DE 400X).

FONTE: A autora (2015).

NOTA: SETA A indica célula morta, com coloração rosada, SETA B indica uma célula viva, sem o corante em seu interior.

A viabilidade pode ser expressa em porcentagem, da seguinte forma:

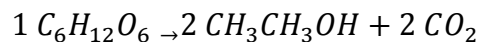
$$Viabilidade (\%) \equiv \left(\frac{(células\ vivas - células\ mortas)}{quantidade\ total\ de\ células} \right) \times 100$$

4.5.4 Rendimento da produção de etanol

Uma fermentação pode ser avaliada pela eficiência na conversão dos açúcares redutores totais em etanol, caracterizando o rendimento. A porcentagem de eficiência pode ser expressa da seguinte forma, numa relação entre a conversão teórica de açúcares máxima possível e a conversão que ocorreu de fato:

$$Eficiência\ de\ fermentação (\%) = \left(\frac{\text{valor de etanol produzido pela fermentação}}{\text{valor teórico máximo de produção de etanol}} \right) \times 100$$

Para obter o valor de conversão teórica máxima possível, deve-se levar em conta que para cada mol de glicose fermentado, são gerados dois moles de gás carbônico e dois moles de etanol, conforme equação abaixo:



Um mol de glicose equivale a 180,18g, enquanto cada mol de etanol equivale 46,08g. Com base na quantidade inicial de açúcares disponível para fermentação, é possível calcular qual a quantidade máxima de etanol que poderia ter sido gerada. Por exemplo, 100g de glicose equivalem a 0,55 mols de açúcar, gerando 1,11 mols de etanol. Cada mol de etanol corresponde a 46,08g de etanol, de modo que 1,11 mols equivalem a 51,11g de etanol. Sendo assim, para cada 100g de glicose, é gerado, em teoria, o máximo de 51,11g de etanol. Quantificando os açúcares redutores totais do mosto de fermentação através de HPLC, foi possível descobrir a quantidade máxima de etanol que seria possível produzir a partir do mosto.

Já para determinar o valor de etanol produzido pela fermentação, o etanol presente no vinho de levedurado foi destilado através de microdestilador (modelo TE-012, TECNAL) e quantificado através do uso de um densímetro (modelo DMA 5000M, Anton Paar), que em uma solução de álcool e água, é capaz de quantificar a porcentagem de etanol. A partir desta informação, com base na densidade do etanol

(0,789 g cm⁻³) foi possível calcular quantos gramas de etanol existiam em cada amostra.

Entretanto, devido à prática de reciclo de células, para a preparação do pé de cuba de um novo ciclo de fermentação retorna-se uma porção do vinho delevedurado do ciclo anterior, para simular a eficiência da centrífuga industrial. Conseqüentemente, uma porção de etanol acaba sendo retornada para os tubos. Além disso, o álcool também é permeável às células, de forma que o volume de massa úmida ocupado pela biomassa no pé de cuba também contém uma porção de etanol. Sendo assim, parte do etanol existente em uma amostra ao fim de um ciclo é proveniente da montagem do pé de cuba usando vinho do ciclo anterior, de modo que a quantidade de álcool no pé de cuba foi determinada e descontada ao calcular o rendimento, para que este parâmetro não seja superestimado.

A quantidade de álcool no pé de cuba pode ser determinada através do seguinte cálculo (sendo 0,7 o a fração de água existente na biomassa, uma vez que o álcool não está presente na sólida):

$$\begin{aligned} \text{Etanol no pé de cuba (g)} = & \\ & \left(\frac{(\text{vinho retornado (g)} \times \text{etanol do ciclo anterior (g/L)})}{1000} \right) + \\ & \left(\frac{((\text{biomassa (g)} \times 0,7) \times \text{etanol do ciclo anterior (g/L)})}{1000} \right) \end{aligned}$$

O cálculo para determinar a quantidade de etanol em uma amostra, descontando o etanol presente no pé de cuba pode ser expresso da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \text{Etanol na amostra (g)} = & \\ & \left(\frac{\text{álcool determinado na amostra via destilação } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \times \text{volume de vinho}}{1000} \right) \\ & - \text{etanol no pé de cuba (g)} \end{aligned}$$

4.5.5 Análise estatística

Para análise estatística dos dados, será utilizada a ANOVA para medidas repetidas (*Analysis of variance with repeated measures*), através do software Dell STATISTICA, versão 13. Este é um teste equivalente à ANOVA unifatorial, mas avalia também mudanças nas médias através de diferentes pontos amostrais ao longo do tempo, uma vez que a viabilidade celular, rendimento de etanol, produção de glicerol, ácido láctico e acético serão avaliados ao longo dos ciclos.

5 RESULTADOS

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E PE-2 EM MELAÇO A

Para realizar a comparação entre estas duas linhagens, a fermentação foi conduzida por 3 ciclos em triplicata, com mosto de fermentação preparado a partir do melaço A.

Os dados obtidos foram analisados através de ANOVA de medidas repetidas, para avaliar se existiam diferenças significativas entre as leveduras, ciclos ou se existia interação entre os dois fatores, e os resultados da análise estão apresentados no

APÊNDICE A.

5.1.1 Viabilidade celular

Os valores de viabilidade celular obtido em cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 4. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 6, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a levedura PE-2 apresenta viabilidade maior que a levedura CAT-1 desde o primeiro ciclo, e que as diferenças entre as viabilidades se mantêm durante os ciclos.

TABELA 4 – VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	90,63%	90,09%	91,37%
	90,43%	90,91%	93,01%
	91,21%	92,09%	90,86%
Média	90,76%	91,03%	91,75%
PE-2	95,14%	94,57%	96,76%
	98,67%	96,59%	95,07%
	95,77%	95,74%	95,88%
Média	96,53%	95,63%	95,90%

FONTE: A autora (2015).

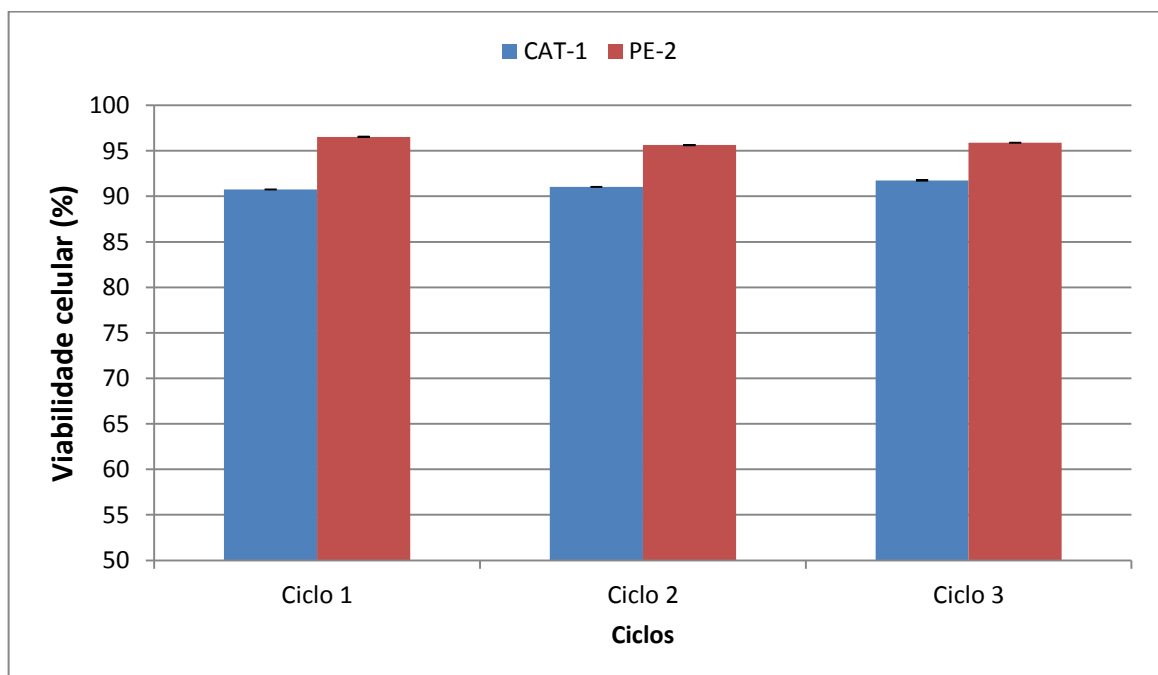


FIGURA 6 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

FONTE: A autora (2015).

Segundo a análise estatística, para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura não há diferenças significativas entre os dados. As leveduras apresentam um perfil semelhante ao longo dos ciclos, com as viabilidades se mantendo em valores próximos, embora existam diferenças entre as viabilidades ao se comparar uma levedura com a outra.

Analisando o fator Ciclo isoladamente, percebe-se que não há diferenças significativas entre os dados, o que sugere que a viabilidade se mantém constante ao longo de todos os ciclos.

Já ao analisar o fator Levedura, observa-se que há diferença significativa entre as linhagens CAT-1 e PE-2 para a viabilidade celular, com *p-value* de 0.00045.

5.1.2 Rendimento na produção de etanol

Os valores de rendimento em etanol obtido em cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 5. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 7, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que as leveduras apresentam valores de rendimento similares entre si ao longo dos ciclos.

TABELA 5 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	92,05%	84,53%	86,91%
	91,34%	84,86%	87,79%
	91,55%	86,15%	87,43%
Média	91,64%	85,18%	87,37%
PE-2	90,65%	84,99%	87,66%
	91,20%	85,40%	88,80%
	91,43%	85,07%	87,91%
Média	91,09%	85,15%	88,13%

FONTE: A autora (2015).

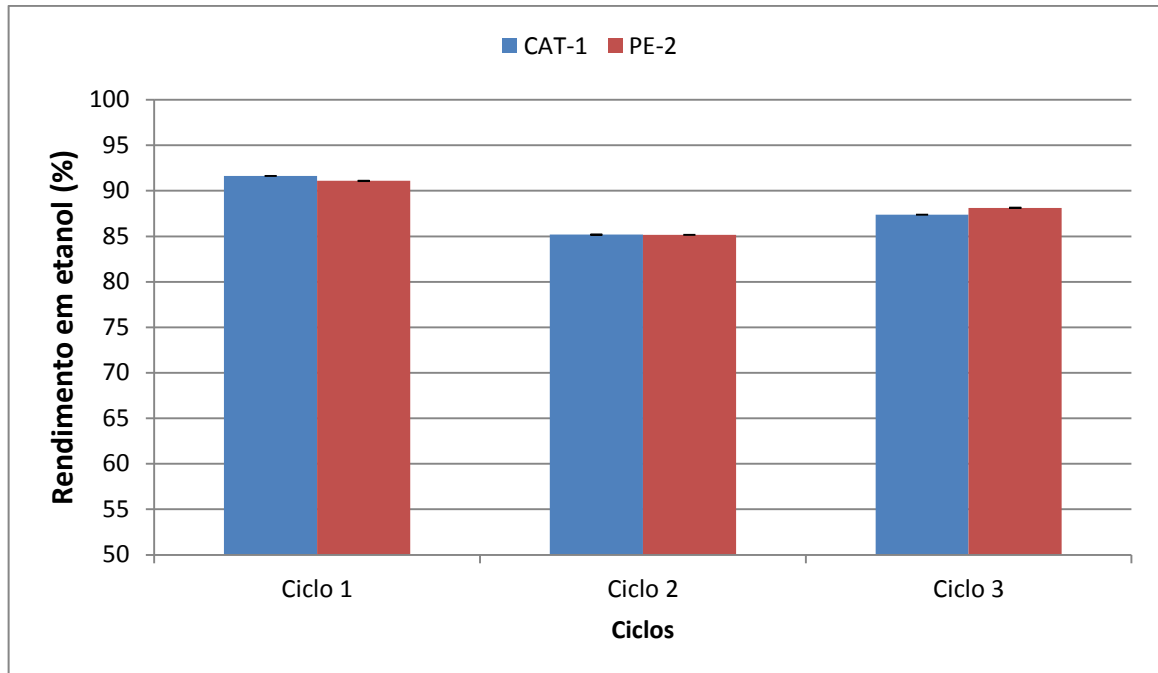


FIGURA 7 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura não há diferenças significativas entre os dados. As leveduras apresentam um perfil semelhante ao longo dos ciclos, com valores de rendimento similares ao comparar uma levedura com a outra, embora tais valores oscilem ao longo dos ciclos.

Como a interação não foi significativa é possível analisar os outros fatores para avaliar se há diferenças significativas para algum deles. Analisando o fator Levedura isoladamente, percebe-se que não há diferenças significativas entre os dados, o que sugere que o rendimento é semelhante para ambas as linhagens em todos os ciclos.

Já ao analisar o fator Ciclo, observa-se que há diferença significativa entre rendimento ao longo dos ciclos, com *p-value* de 0.00000. O maior valor de rendimento é encontrado no primeiro ciclo, e o menor valor no segundo ciclo.

5.1.3 Produção de glicerol

Os valores para a quantidade de glicerol (g/L) produzida por cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 6. As médias são apresentadas

em gráfico na FIGURA 8, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a quantidade de glicerol produzida é similar entre as duas leveduras.

TABELA 6 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	5,04	4,74	4,73
	5,09	4,81	4,73
	4,94	5,07	4,77
Média	5,03	4,87	4,74
PE-2	5,13	4,94	4,77
	5,16	4,90	4,88
	4,92	4,80	4,81
Média	5,07	4,88	4,82

FONTE: A autora (2015).

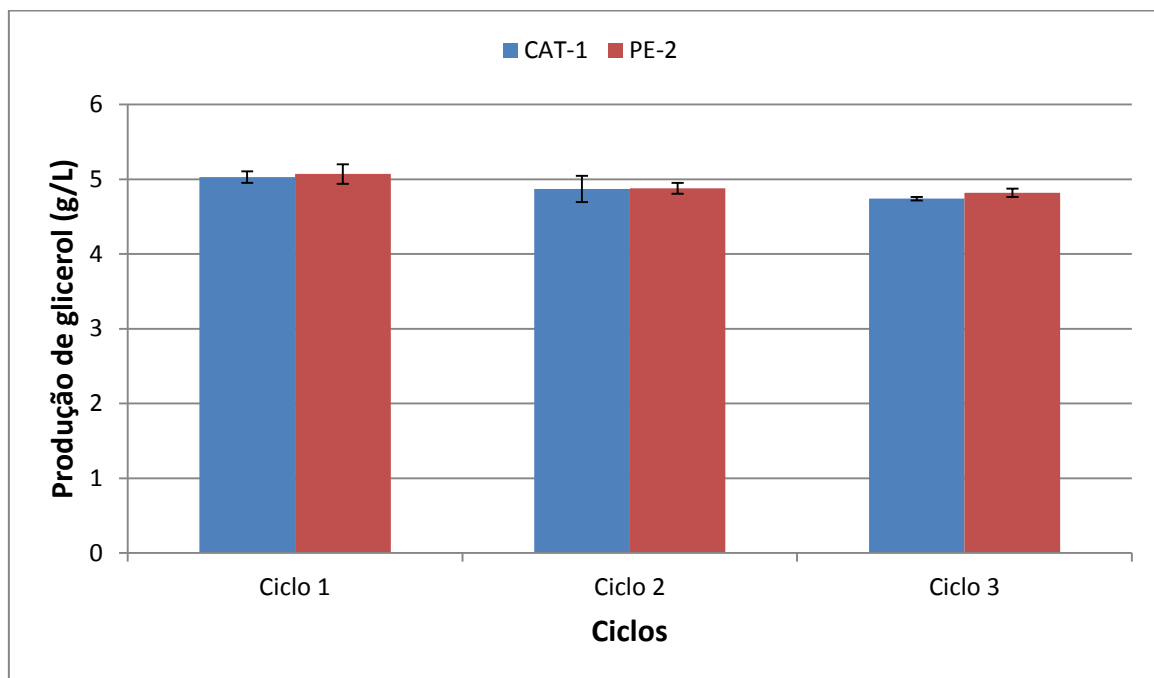


FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura não há diferenças significativas entre os dados. As leveduras apresentam um perfil semelhante ao longo dos ciclos, com valores de produção de glicerol semelhantes ao comparar uma levedura com a outra, embora tais valores diminuam ao longo dos ciclos.

Como a interação não foi significativa é possível analisar os outros fatores para avaliar se há diferenças significativas para algum deles. Analisando o fator

Levedura isoladamente, percebe-se que não há diferenças significativas entre os dados, o que sugere que a produção de glicerol é semelhante para ambas as linhagens em todos os ciclos. Já ao analisar o fator Ciclo, observa-se que há diferença significativa entre a produção de glicerol ao longo dos ciclos, com *p-value* de 0.00557. O maior valor de produção de glicerol é encontrado no primeiro ciclo, e o menor valor no terceiro ciclo.

5.1.4 Produção de ácido láctico

A quantidade de ácido láctico (g/L) produzida por cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 7. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 9, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a levedura CAT-1 apresenta maior produção de ácido láctico que a levedura PE-2 desde o primeiro ciclo, e que as diferenças se mantêm durante os ciclos.

TABELA 7- PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	0,62	0,58	0,59
	0,63	0,59	0,60
	0,62	0,60	0,60
Média	0,62	0,59	0,59
PE-2	0,58	0,55	0,57
	0,58	0,55	0,58
	0,56	0,55	0,57
Média	0,58	0,55	0,57

FONTE: A autora (2015).

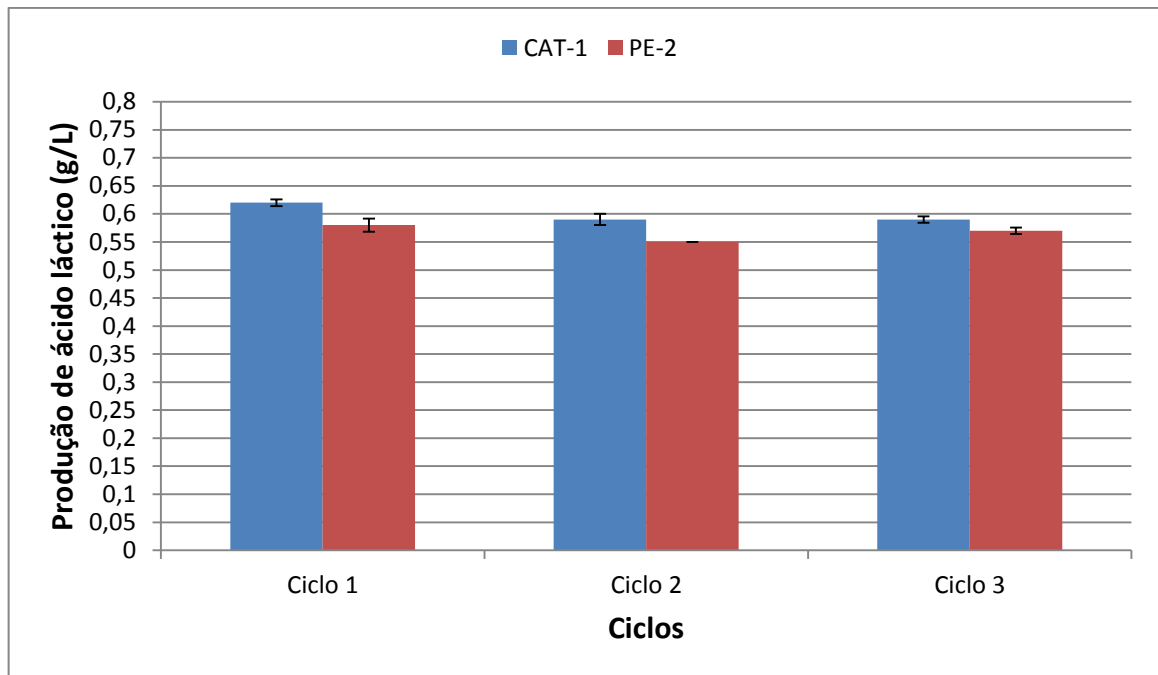


FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura há diferenças significativas entre os dados, com *p-value* de 0.02678. Há diferenças entre a quantidade de ácido láctico para cada levedura, quantidade de ácido láctico produzida em cada ciclo e diferenças entre as leveduras com relação ao perfil de oscilação de produção.

5.1.5 Produção de ácido acético

Os valores para a quantidade de ácido acético (g/L) produzida por cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 8. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 10, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a levedura CAT-1 apresenta maior produção de ácido acético que a levedura PE-2 desde o primeiro ciclo, e que as diferenças se mantêm durante os ciclos.

TABELA 8 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	0,89	0,88	0,86
	0,88	0,88	0,82
	0,90	0,87	0,83
Média	0,89	0,88	0,84
PE-2	0,82	0,77	0,75
	0,83	0,80	0,77
	0,79	0,81	0,78
Média	0,81	0,79	0,77

FONTE: A autora (2015).

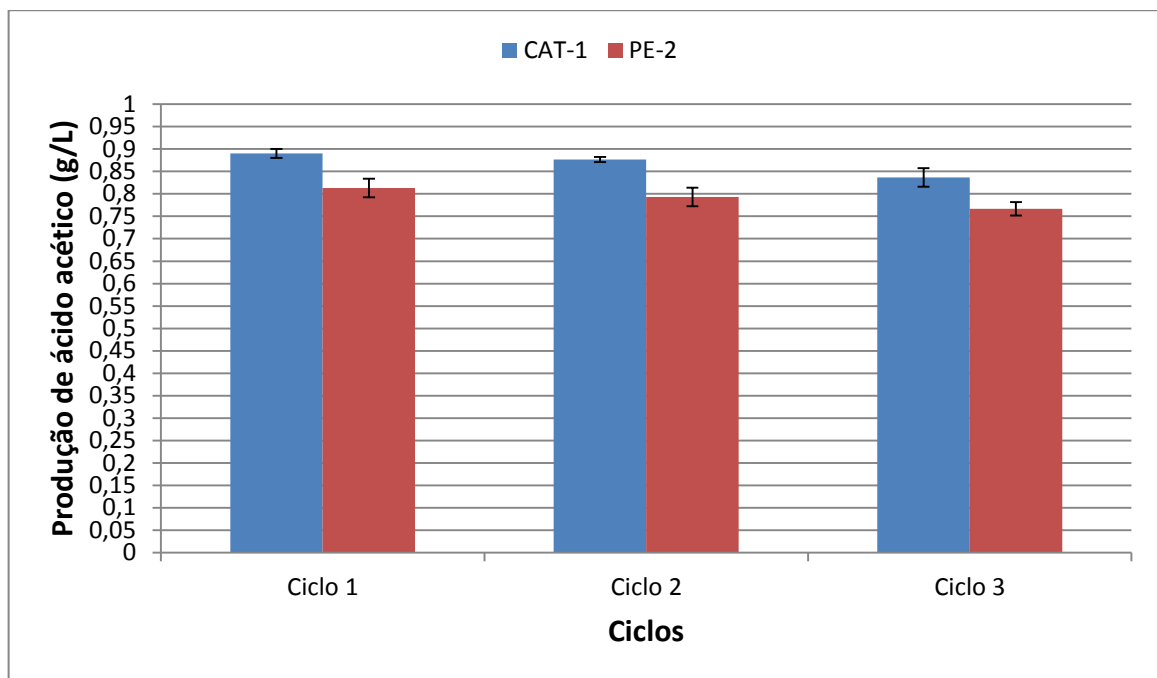


FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
FONTE: A autora (2015).

Segundo a análise estatística, para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura não há diferenças significativas entre os dados. As leveduras apresentam um perfil semelhante de oscilação na produção de ácido acético ao longo dos ciclos, ocorrendo diferença na quantidade de ácido acético produzida entre os ciclos e para cada levedura.

Como a interação não foi significativa é possível analisar os outros fatores para avaliar se há diferenças significativas para algum deles. Analisando o fator Ciclo isoladamente, percebe-se que há diferenças significativas entre os dados, com *p-value* de 0.00136, o que sugere que há diferença na quantidade de ácido acético produzida em cada ciclo. A maior produção de ácido acético ocorre no primeiro ciclo, e a menor no terceiro.

Já ao analisar o fator Levedura, observa-se que há diferença significativa entre a produção de ácido acético ao longo dos ciclos, com *p-value* de 0.00053, com a levedura CAT-1 apresentando a maior produção.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E BRT EM MELAÇO B

Para realizar a comparação entre estas duas linhagens, a fermentação foi conduzida por 3 ciclos, em triplicata, com mosto de fermentação preparado a partir do melaço B.

Os dados obtidos foram analisados através de ANOVA de medidas repetidas, para avaliar se existiam diferenças significativas entre as leveduras, ciclos ou se existia interação entre os dois fatores, e os resultados da análise estão apresentados no APÊNDICE B.

5.2.1 Viabilidade celular

Os valores de viabilidade celular obtido em cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 9. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 11, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a levedura BRT apresenta viabilidade maior que a levedura CAT-1 durante os dois primeiros ciclos, mas no terceiro apresenta viabilidade menor.

TABELA 9 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	76,52%	68,25%	71,57%
	75,88%	69,89%	71,14%
	77,90%	70,47%	70,41%
Média	76,77%	69,54%	71,04%
BRT	79,32%	76,27%	71,64%
	84,81%	75,79%	66,43%
	82,78%	77,64%	70,51%
Média	82,30%	76,57%	69,53%

FONTE: A autora (2015).

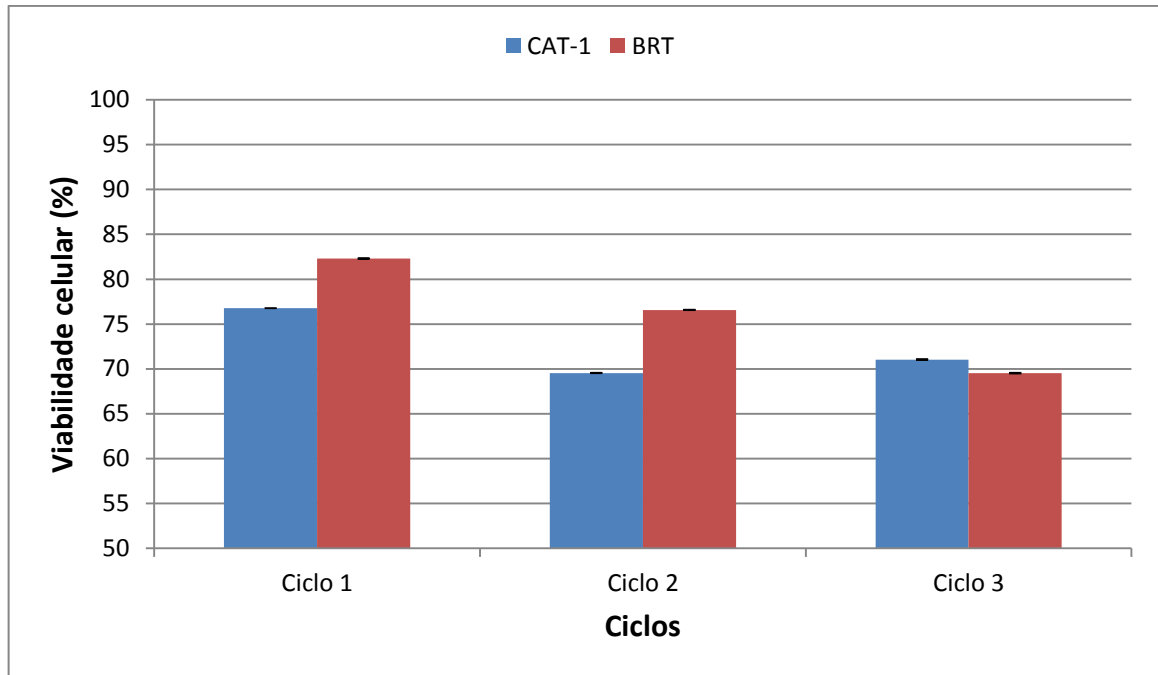


FIGURA 11 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura há diferenças significativas entre os dados, com *p-value* de 0.01474. Há diferenças de viabilidade entre as leveduras, entre a viabilidade durante cada ciclo e também na maneira como a viabilidade se modifica com o passar dos ciclos para cada levedura.

5.2.2 Rendimento na produção de etanol

Os valores de rendimento em etanol obtido em cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na

TABELA 10. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 12, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que as leveduras apresentam valores de rendimento similares entre si ao longo dos ciclos.

TABELA 10 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT

LEVEDURA	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
CAT-1	78,53%	77,59%	79,93%
	77,93%	76,98%	80,06%
	77,30%	76,67%	79,19%
Média	77,92%	77,08%	79,73%
BRT	72,04%	71,16%	70,75%
	79,76%	79,68%	78,45%
	79,84%	79,62%	83,07%
Média	77,21%	76,82%	77,42%

FONTE: A autora (2015).

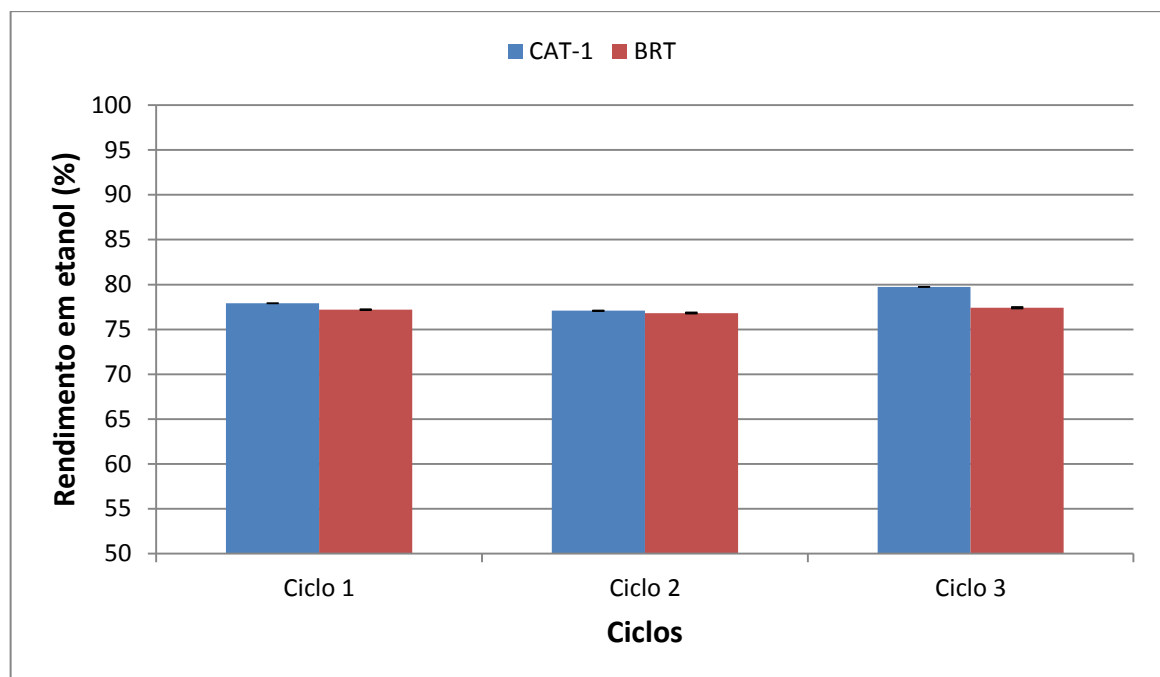


FIGURA 12 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT

FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Levedura não há diferenças significativas entre os dados. As leveduras apresentam rendimentos semelhantes entre si e também entre cada ciclo.

Analisando o fator Ciclo isoladamente, percebe-se que não há diferenças significativas entre os dados, com os valores de rendimento se mantendo similares entre os ciclos.

Analisando o fator Levedura isoladamente, percebe-se que não há diferenças significativas entre os dados, com os valores de rendimento se mantendo similares entre as leveduras.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE MELAÇOS A E B PARA A LINHAGEM CAT-1

Para realizar a comparação entre os dois melaços, a fermentação foi conduzida por 3 ciclos, em triplicata, utilizando a linhagem CAT-1, com mostos de fermentação preparados a partir de melaços A e B.

Os dados obtidos foram analisados através de ANOVA de medidas repetidas, para avaliar se existiam diferenças significativas entre as leveduras, ciclos ou se existia interação entre os dois fatores, e os resultados da análise estão apresentados no APÊNDICE C.

5.3.1 Viabilidade celular

Os valores de viabilidade celular obtido em cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 11. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 13, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a levedura CAT-1 apresenta viabilidade maior no melaço A se comparada ao melaço B, durante todos os ciclos.

TABELA 11 - DADOS DE VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA CAT-1 NOS MELAÇOS A E B

MELAÇO	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
A	90,63%	90,09%	91,37%
	90,43%	90,91%	93,01%
	91,21%	92,09%	90,86%
Média	90,76%	91,03%	91,75%
B	76,52%	68,25%	71,57%
	75,88%	69,89%	71,14%
	77,90%	70,47%	70,41%
Média	76,77%	69,54%	71,04%

FONTE: A autora (2015).

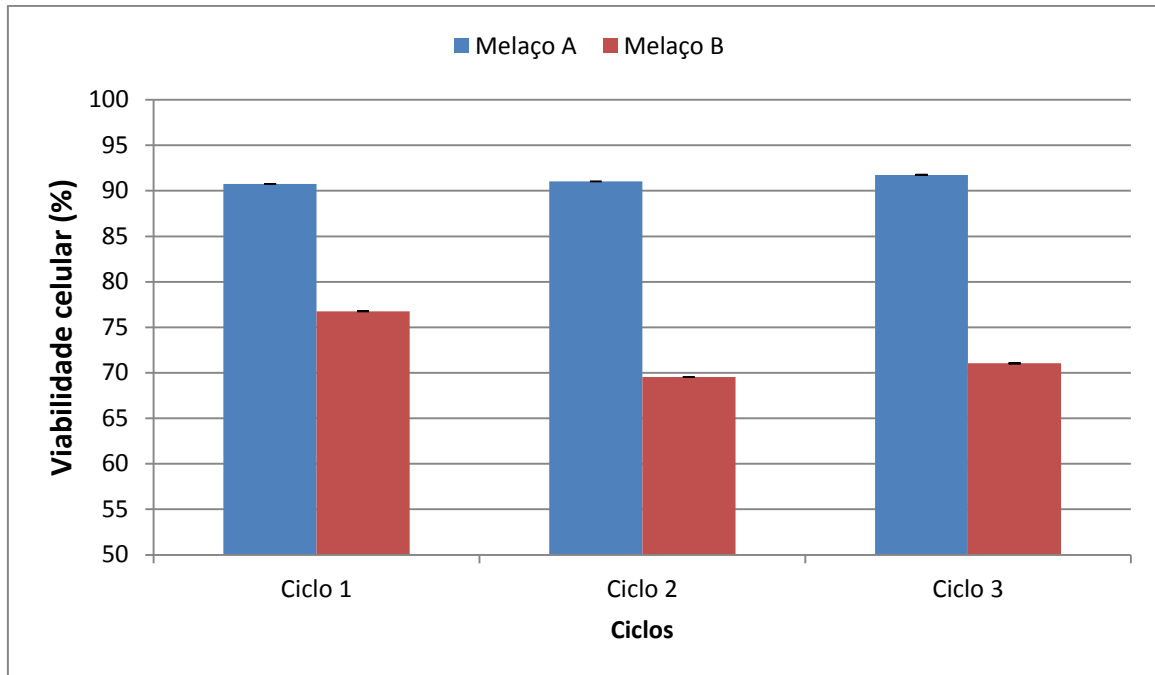


FIGURA 13 - VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS EM MELAÇOS A E B
 FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Melaço há diferenças significativas entre os dados, com p -value de 0.00036. Há diferenças de viabilidade da levedura entre os melaços, entre a viabilidade durante cada ciclo e também na maneira como a viabilidade se modifica com o passar dos ciclos para cada melaço.

5.3.2 Rendimento na produção de etanol

Os valores de rendimento em etanol obtido em cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 12. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 14, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que o rendimento é maior no melaço A em todos os três ciclos.

TABELA 12 - RENDIMENTO EM ETANOL DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B

MELAÇO	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
A	92,05%	84,53%	86,91%
	91,34%	84,86%	87,79%
	91,55%	86,15%	87,43%
Média	91,64%	85,18%	87,37%
B	78,53%	77,59%	79,93%
	77,93%	76,98%	80,06%
	77,30%	76,67%	79,19%
Média	77,92%	77,08%	79,73%

FONTE: A autora (2015).

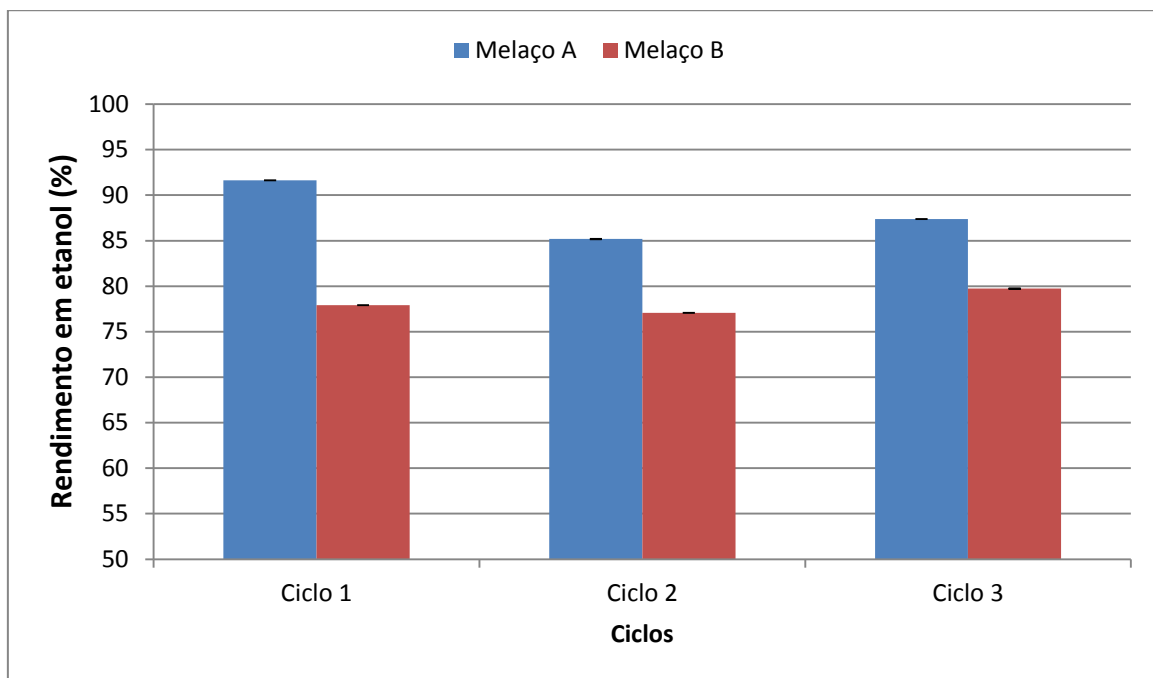


FIGURA 14 - RENDIMENTO EM ETANOL DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Melaço há diferenças significativas entre os dados, com *p-value* de 0.00001. Há diferenças no rendimento em etanol entre os melaços, entre o rendimento durante cada ciclo e também na maneira como o rendimento oscila com o passar dos ciclos para cada melaço.

5.3.3 Produção de glicerol

Os valores para a quantidade de glicerol (g/L) produzida por cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 13. As médias são apresentadas

em gráfico na FIGURA 15, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a quantidade de glicerol produzida pela levedura é diferente entre os dois melaços, sendo maior no melaço B.

TABELA 13 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 PARA OS MELAÇOS A E B

MELAÇO	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
A	5,04	4,74	4,73
	5,09	4,81	4,73
	4,94	5,07	4,77
Média	5,03	4,87	4,74
B	5,15	5,16	5,26
	4,99	5,47	5,31
	5,07	5,44	5,54
Média	5,07	5,36	5,37

FONTE: A autora (2015).

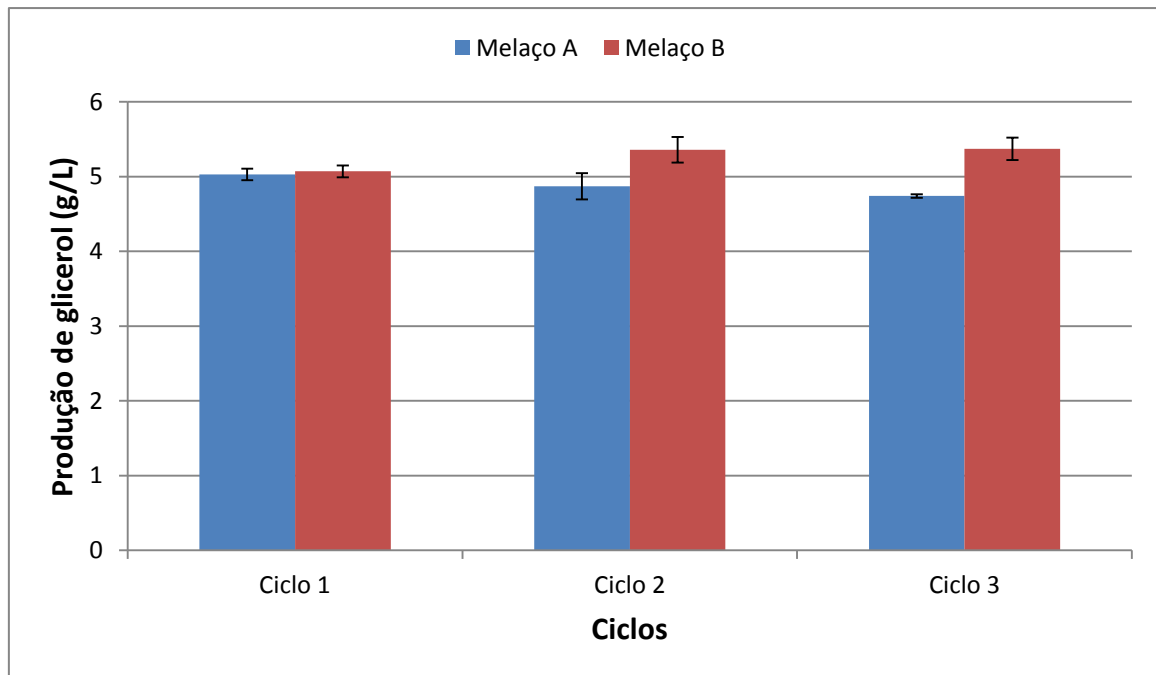


FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).

Segundo a análise estatística, para a interação entre os fatores Ciclo e Melaço há diferenças significativas entre os dados, com *p-value* de 0.01254. Há diferenças na quantidade de glicerol produzida para cada melaço e também na maneira como a produção varia com o passar dos ciclos.

5.3.4 Produção de ácido láctico

Os valores para a quantidade de ácido láctico (g/L) produzida por cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 14. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 16, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a quantidade de ácido láctico produzida é diferente entre os dois melaços, sendo maior no melaço A.

TABELA 14 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 PARA OS MELAÇOS A E B

MELAÇO	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
A	0,62	0,58	0,59
	0,63	0,59	0,60
	0,62	0,60	0,60
Média	0,62	0,59	0,59
B	0,44	0,43	0,42
	0,44	0,44	0,44
	0,41	0,42	0,44
Média	0,43	0,43	0,43

FONTE: A autora (2015).

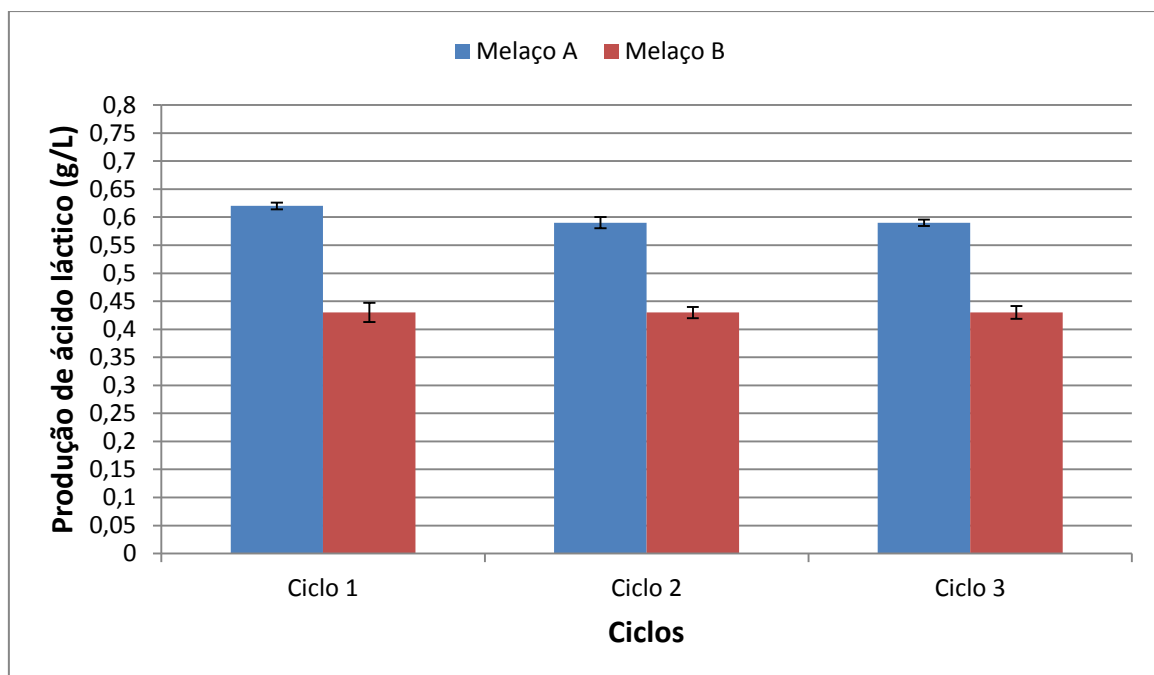


FIGURA 16 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 PARA OS MELAÇOS A E B

FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Melaço há diferenças significativas entre os dados, com *p-value* de 0.01908. Há

diferenças na quantidade de ácido láctico produzida para cada melaço e também na maneira como a produção varia com o passar dos ciclos.

5.3.5 Produção de ácido acético

Os valores para a quantidade de ácido acético (g/L) produzida por cada triplicata, em cada ciclo, podem ser observados na TABELA 15. As médias são apresentadas em gráfico na FIGURA 17, com os respectivos desvios-padrão. É possível observar que a quantidade de ácido acético produzida é diferente entre os dois melaços, sendo maior no melaço B.

TABELA 15 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B

MELAÇO	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3
A	0,89	0,88	0,86
	0,88	0,88	0,82
	0,90	0,87	0,83
Média	0,89	0,88	0,84
B	1,47	1,44	1,38
	1,42	1,51	1,44
	1,30	1,37	1,44
Média	1,40	1,44	1,42

FONTE: A autora (2015).

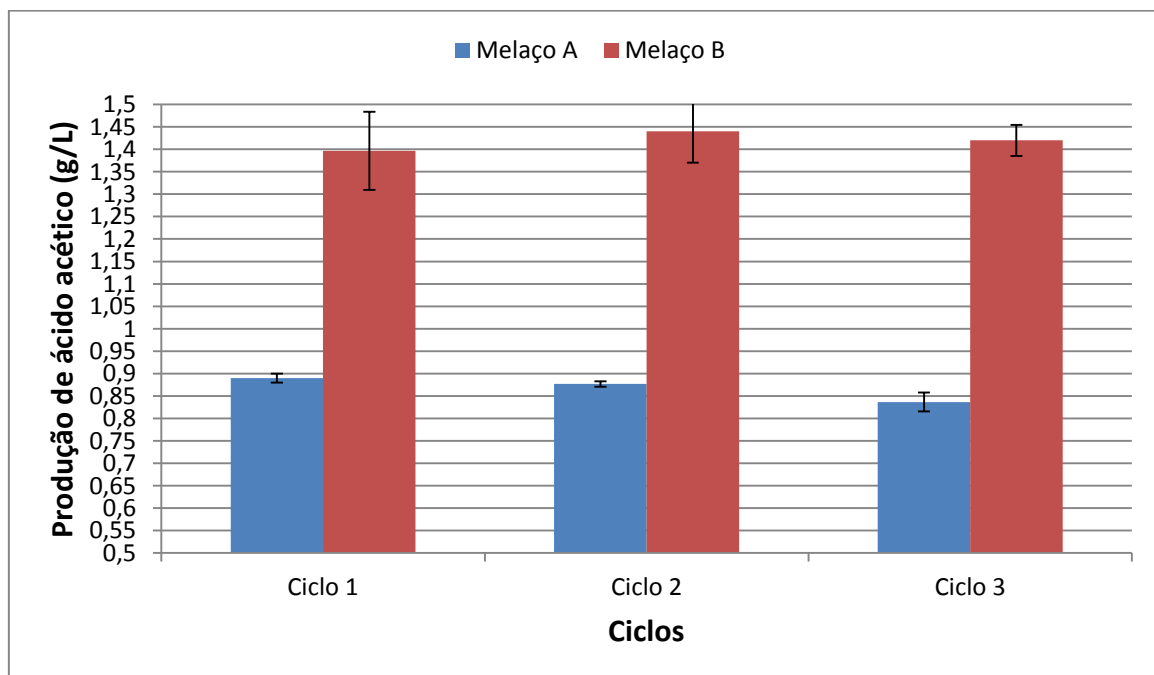


FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B

FONTE: A autora (2015).

A análise estatística mostrou que para a interação entre os fatores Ciclo e Melaço não há diferenças significativas entre os dados. Os perfis de produção de ácido acético pela levedura são semelhantes entre os melaços e também entre cada ciclo, embora existam diferenças na quantidade de ácido acético produzida pela levedura em cada melaço.

Analisando o fator Ciclo isoladamente, percebe-se que não há diferenças significativas entre os dados, com os valores de produção de ácido acético se mantendo similares entre os ciclos.

Já ao analisar o fator Melaço, observa-se que há diferença significativa entre a produção de ácido acético ao longo dos ciclos, com *p-value* de 0.00003, com a maior produção ocorrendo no melaço B.

6 DISCUSSÃO

Conforme já mencionado anteriormente, compreender como os diferentes fatores do processo brasileiro influenciam a fermentação alcoólica de substratos derivados da cana-de-açúcar é importante para evitar problemas como perda de produtividade e rendimento na produção de etanol (NIELSEN, 2014). Uma vez que, segundo Amorim *et al.* (2011), poucos são os laboratórios capazes de reproduzir as condições industriais em escala laboratorial, justifica-se a necessidade de avaliar se os resultados obtidos em um ensaio estão de acordo com o observado em situações reais, para que então tais ensaios possuam validade e possam ser utilizados para investigações.

6.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E PE-2 EM MELAÇO A

Ao comparar as duas linhagens, observou-se que apesar das diferenças significativas em viabilidade, ambas as leveduras apresentaram viabilidade acima de 90% nos ciclos, um valor alto e adequado ao processo. Para outros parâmetros como o rendimento em etanol e produção de glicerol, as linhagens são semelhantes, sendo que as diferenças foram encontradas entre um ciclo e outro, e não entre as leveduras. Os valores de rendimento encontrados, próximos de 90%, estão próximos do que se descreve para o processo em condições industriais (AMORIM *et al.*, 2011).

Para o glicerol, as diferenças significativas estão entre os ciclos, e não entre leveduras, não sendo possível diferenciar as linhagens através deste critério. Para ambas as leveduras a maior produção ocorreu no primeiro ciclo, diminuindo com o passar dos ciclos. A produção de glicerol acentuada pode ser resultado do estresse osmótico pelo contato com um meio altamente concentrado em açúcares, como o mosto de fermentação. O glicerol funciona como um soluto protetor nessa situação, aumentando a osmolaridade intracelular e evitando que a célula perca água (ERASMUS, 2005).

Para o ácido láctico, há diferenças significativas entre ciclos e leveduras, sendo maior para a linhagem CAT-1 e maior no primeiro ciclo para ambas as linhagens. O ácido láctico normalmente é utilizado como um parâmetro para avaliar a existência de contaminação bacteriana no processo, uma vez que bactérias contaminantes (principalmente espécies do gênero *Lactobacillus*) o produzem a

partir dos açúcares (SKINNER, 2004). Em experimentos conduzidos para avaliar fermentações de milho com a presença de bactérias contaminantes, a produção de ácido láctico atingiu valores entre 1,6 até 6,3 g/L., dependendo da espécie de *Lactobacillus* contaminante (THOMAS *et al*, 2001), sendo quantidades maiores que as observadas neste experimento, sugerindo que o ácido láctico produzido durante a fermentação manteve-se em níveis mínimos.

Para o ácido acético, há diferenças entre ciclos e entre leveduras, com a concentração de ácido acético reduzindo ao longo dos ciclos e sendo maior para a levedura CAT-1. Entretanto, o perfil de oscilação do ácido acético ao longo do tempo é semelhante para ambas as linhagens, sendo maior no primeiro ciclo em relação aos outros.

O ácido acético é produzido pela oxidação de acetaldeído através de aldeído-desidrogenases, e pode ser utilizado para converter NAD⁺ em NADH. Quando a produção de glicerol pela célula é aumentada, gera-se um aumento na quantidade de NAD⁺, desequilibrando o balanço entre NAD⁺ e NADH (ERASMUS, 2005). Sendo assim, é possível observar uma correlação entre a produção de ácido acético e glicerol em situações de estresse osmótico, inclusive em resposta ao contato com um meio de alta concentração de açúcares (ERASMUS, 2005), como o mosto de fermentação. Sendo assim, a produção acentuada de ácido acético no primeiro ciclo pode ter relação com a produção acentuada de glicerol observada.

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CAT-1 E BRT EM MELAÇO B

Ao comparar as duas linhagens, observou-se que para a viabilidade, há diferenças significativas de viabilidade entre ciclos e entre as leveduras, com a linhagem CAT-1 iniciando com uma viabilidade mais baixa, mas com uma viabilidade no último ciclo maior se comparada ao segundo, e com a linhagem BRT iniciando com uma viabilidade mais alta, porém perdendo viabilidade ao longo dos ciclos e terminando com uma viabilidade menor que a linhagem CAT-1. Segundo Basso *et al.* (2011), para substratos com maior quantidade de alumínio há a possibilidade de redução de viabilidade e rendimento em etanol, e a linhagem CAT-1 tende ser menos sensível a esses efeitos se comparada com outras linhagens comerciais. Tal informação explicaria a queda na viabilidade ao longo dos ciclos, após a exposição das leveduras a esse componente tóxico que está presente em quantidade acima do

recomendado (BASSO *et al*, 2011) no melão B, assim como explicaria porque os efeitos foram diferentes entre as duas leveduras, uma vez que a linhagem BRT seria mais sensível.

Para valores de rendimento, não há diferenças significantes entre ciclos e nem entre linhagens, demonstrando que os valores de rendimento permaneceram similares ao longo dos ciclos e similares entre as leveduras. Entretanto, os valores ficaram próximos de 77%, abaixo do descrito para o processo, que é próximo de 90% (AMORIM *et al*, 2011). Tal situação também pode ser decorrente da presença de alumínio em quantidade acima do recomendado (BASSO *et al*, 2011).

6.3 COMPARAÇÃO ENTRE MELAÇOS A E B PARA A LINHAGEM CAT-1

Ao comparar a linhagem CAT-1 em ambos os melãos, para a viabilidade percebeu-se que há diferenças significativas entre os ciclos e entre os melãos. No melão A a viabilidade tende a se manter constante ao longo dos ciclos e maior do que se observa no melão B, onde a viabilidade ainda diminui de um ciclo para outro. Para o rendimento em etanol, há diferenças significativas entre os ciclos e melãos, sendo o rendimento maior no melão A. Considerando que a quantidade de alumínio do melão A é cerca de 10 vezes menor que no melão B, é possível que o pior desempenho da linhagem no melão B seja proveniente da quantidade de alumínio acima do recomendado (BASSO *et al*, 2011), uma vez que o rendimento no melão A é semelhante ao descrito em literatura, próximo de 90% (AMORIM *et al*, 2011). A queda na viabilidade também ocorre no melão B, provavelmente em função do estresse causado pelo excesso de alumínio.

Para a produção de glicerol, também há diferenças significativas entre ciclos e melãos, sendo maior a produção de glicerol no melão B. Conforme mencionado ao comparar as linhagens CAT-1 e PE-2, o glicerol é produzido como resposta ao estresse osmótico causado pelo contato com um meio rico em açúcares (ERASMUS, 2005), o que explicaria a produção acentuada de glicerol no primeiro ciclo para o melão A. Entretanto, para o melão B a produção aumenta com o passar dos ciclos. Segundo Basso *et al* (2011), altos níveis de sais como potássio e magnésio podem aumentar a pressão osmótica e aumentar a produção de glicerol. A concentração destes componentes é maior no melão B, o que poderia explicar

porque a produção do glicerol tende a aumentar apenas neste melão, uma vez que no melão A as células estão expostas a estes fatores em proporção menor.

Para a produção de ácido láctico, há diferenças entre ciclos e melões, sendo a quantidade de ácido láctico maior no melão A. Conforme já mencionado ao comparar as linhagens CAT-1 e PE-2 no melão A, o ácido láctico normalmente é utilizado como parâmetro para monitorar a existência de contaminação bacteriana (SKINNER, 2004). Entretanto, para esse experimento a quantidade de ácido láctico observada também foi menor que a quantidade observada em fermentação de milho realizada para avaliar o efeito da presença de bactérias contaminantes (THOMAS *et al*, 2001), sugerindo que o ácido láctico produzido durante a fermentação manteve-se em níveis mínimos.

Para a produção de ácido acético, há diferenças significativas entre os melões, sendo a quantidade de ácido acético maior no melão B. Como já mencionado anteriormente, maior produção de ácido acético tem correlação com a produção de glicerol aumentada em situações de estresse osmótico (ERASMUS, 2005). No melão B, além da quantidade excessiva de alumínio, há altos níveis de sais como potássio e magnésio, o que poderia explicar a maior produção de glicerol (BASSO *et al*, 2011).

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a validade do ensaio de fermentação em escala laboratorial, uma vez que se mostrou possível simular parâmetros do processo industrial, e foram obtidos resultados de rendimento e viabilidade semelhantes aos já descritos em literatura, assim como foi possível observar a influência de um fator (composição do substrato) descrito como capaz de influenciar rendimento e viabilidade, causando perdas nestes parâmetros quando há excesso de alguns componentes que podem ser tóxicos às células, como alumínio, potássio e magnésio.

Foi possível evidenciar diferenças entre leveduras e melaços em poucos ciclos, demonstrando que o ensaio em escala laboratorial pode ser uma ferramenta útil para determinar o perfil de uma linhagem em diferentes condições, gerando informações importantes e que servem de base para avaliar influências de outros fatores sobre as linhagens.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1054p

ALCARDE, A. R. **Extração**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_103_22122006154841.html>. Acesso em 13 nov. 2015.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 91, n. 5, p. 1267-1275, Springer, 2011.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O; ROCHA, S. N; Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.) **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. InTech, 2011. p. 87-100. ISBN: 978-953-307-478-8, DOI: 10.5772/17047. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/ethanol-production-in-brazil-the-industrial-process-and-its-impact-on-yeast-fermentation>>

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

CBS – CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES - FUNGAL BIODIVERSITY CENTRE. **Saccharomyces cerevisiae**. Disponível em <<http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Name=Saccharomyces%20cerevisiae&Fields=All&ExactMatch=T>>. Acesso em 13 nov. 2015.

DARBY, R. A.; CARTWRIGHT, S. P.; DILWORTH, M. V.; BILL, R. M. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (review). **Methods in Molecular Biology**. Springer, 2012.

ERASMUS, D. J. **PRODUCTION OF ACETIC ACID BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE DURING ICEWINE PRODUCTION**. 2005. University Of British Columbia.

FAO. **Saccharum officinarum L.** Disponível em <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/GBASE/data/Pf000310.HTM>>. Acesso em 8 nov. 2015.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em 8 nov. 2015.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. 1999. In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A.; KELSALL, D. R. (Ed.) **The alcohol textbook**, 3 ed., Nottingham University Press, UK, 1999. p 49-87.

JUNKER, B. Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems. **Biotechnology progress**. v. 23, n. 4, p. 767-784, Wiley, 2007.

KEW ROYAL BOTANICAL GARDENS. ***Saccharum officinarum* (sugar cane)**. Disponível em <<http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/saccharum-officinarum-sugar-cane>>. Acesso em 8 nov. 2015.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Cana-de-açúcar – Saiba mais**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/saiba-mais>>. Acesso em 20 jul. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5 ed. W. H. Freeman, 2008.

NIELSEN, J. C. F. **INFLUENCE OF ANTIFOAMING AGENTS ON THE CELLULAR PERFORMANCE OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE IN THE BRAZILIAN BIOETHANOL INDUSTRY**. 2014. Technical University of Denmark (DTU)

NOVA CANA. **Aplicações e usos**. Disponível em <<http://www.novacana.com/etanol/aplicacoes/>>. Acesso em 20 jul. 2015.

NOVA CANA. **Benefícios em usar etanol**. Disponível em <<http://www.novacana.com/etanol/beneficios/>>. Acesso em 20 jul. 2015.

NOVA CANA. **Fabricação**. Disponível em <<http://www.novacana.com/etanol/fabricacao/>>. Acesso em 20 jul. 2015.

NOVA CANA. **Sobre o etanol**. Disponível em <<http://www.novacana.com/etanol/sobre/>>. Acesso em 20 jul. 2015.

OLIVA-NETO, P.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G.; SILVA, D. F.; The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. FORMATEX, 2013. P. 371-379.

PETROU, E. C.; PAPPIS C. P. Biofuels: A Survey on Pros and Cons. **Energy & Fuels**. v. **23**, n. 2, p. 1055–1066, 2009.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (RFA). **Industry Statistics**. Disponível em <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. Acesso em 8 nov. 2015

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**., v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M.. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, n. 5 p. 819-828, 2001.

UDOP – UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA. Disponível em <<http://www.udop.com.br/>>

WALKER, G. M. **Bioethanol: Science and technology of fuel ethanol**. Ventus Publishing ApS, 2010. ISBN 978-87-7681-681-0.

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

ZÖRGÖ, E; CHWIALKOWSKA, K; GJUVSLAND, A. B.; GARRÉ, E; SUNNERHAGEN, P.; LITI, G.; BLOMBERG, A.; OMHOLT, S. W.; WARRINGER, J. Ancient Evolutionary Trade-Offs between Yeast Ploidy States. **PloS Genetics**. v. 9, n. 3, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2 NO MELAÇO A	63
APÊNDICE B - ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT NO MELAÇO B	73
APÊNDICE C - ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE MELAÇOS A E B PARA A LINHAGEM CAT-1	76

APÊNDICE A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2 NO MELAÇO A

TABELA 1 - RESULTADOS DE ANOVA PARA VIABILIDADE CELULAR DAS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

FATOR	SS	GL	MS	F	p-value
LEVEDURA	,011	1	,011	111,8	,000*
CICLO	,000	2	,000	,3	,781
CICLO*LEVEDURA	,000	2	,000	,7	,518

FONTE: A autora (2015).

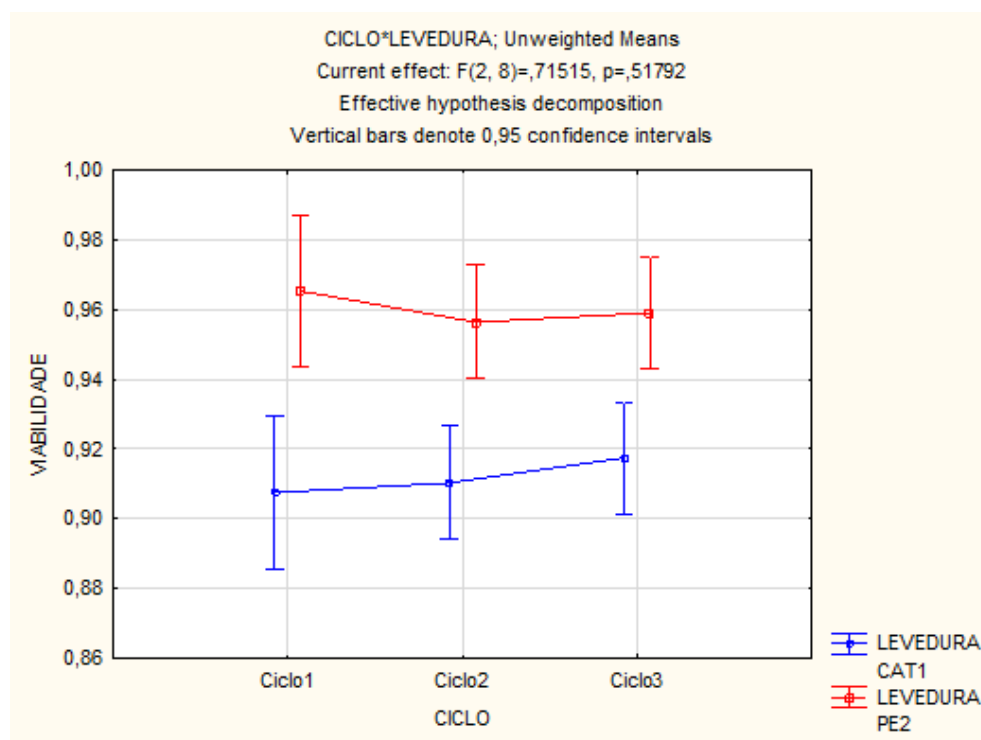


FIGURA 1 - VIABILIDADE CELULAR DURANTE OS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
FONTE: A autora (2015).

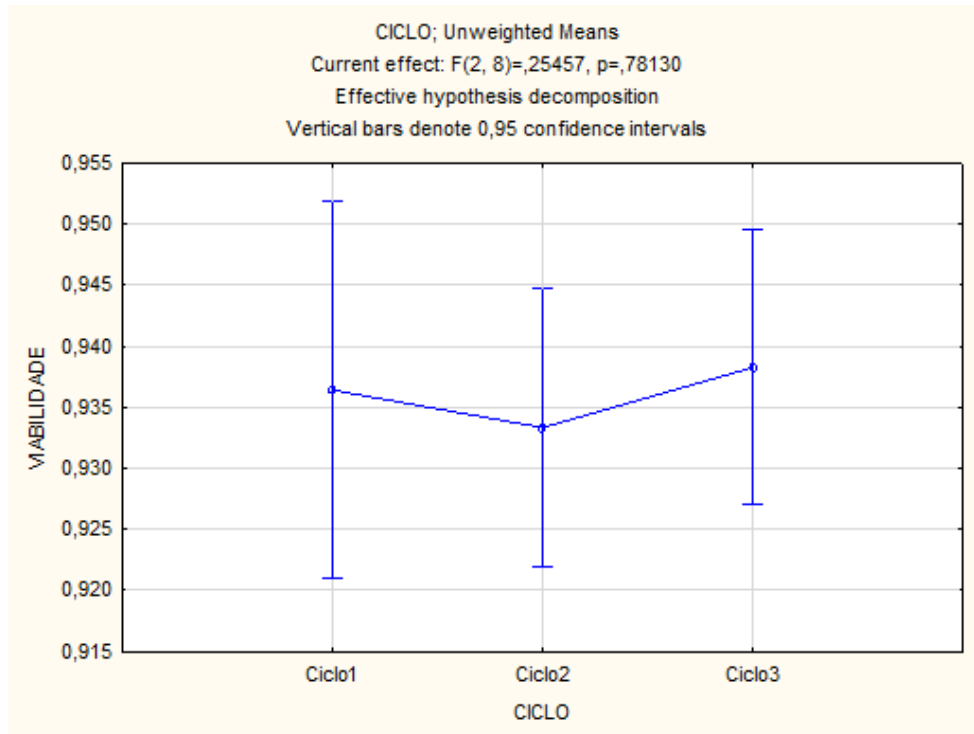


FIGURA 2 - VIABILIDADE CELULAR PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2 COMPARADA ENTRE OS CICLOS
FONTE: A autora (2015).

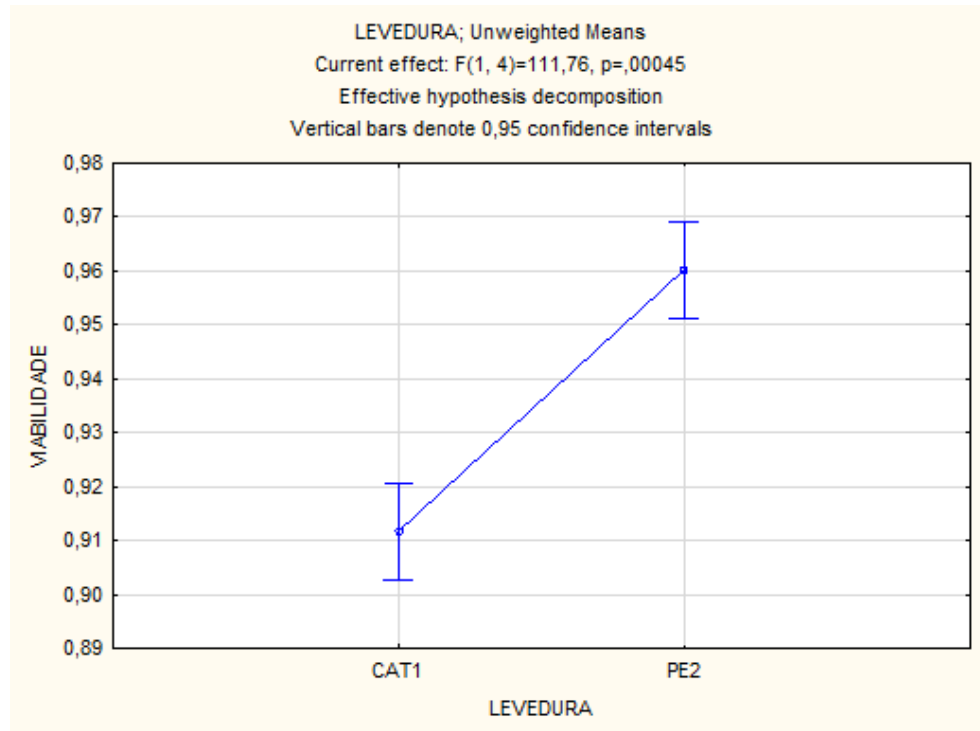


FIGURA 3 - VIABILIDADE CELULAR COMPARADA ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

TABELA 2 - RESULTADOS DE ANOVA PARA RENDIMENTO EM ETANOL PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

FATOR	SS	GL	MS	F	p
LEVEDURA	,000	1	,000	,1	,831
CICLO	,012	2	,006	227,6	,000*
CICLO*LEVEDURA	,000	2	,000	2,5	,142

FONTE: A autora (2015).

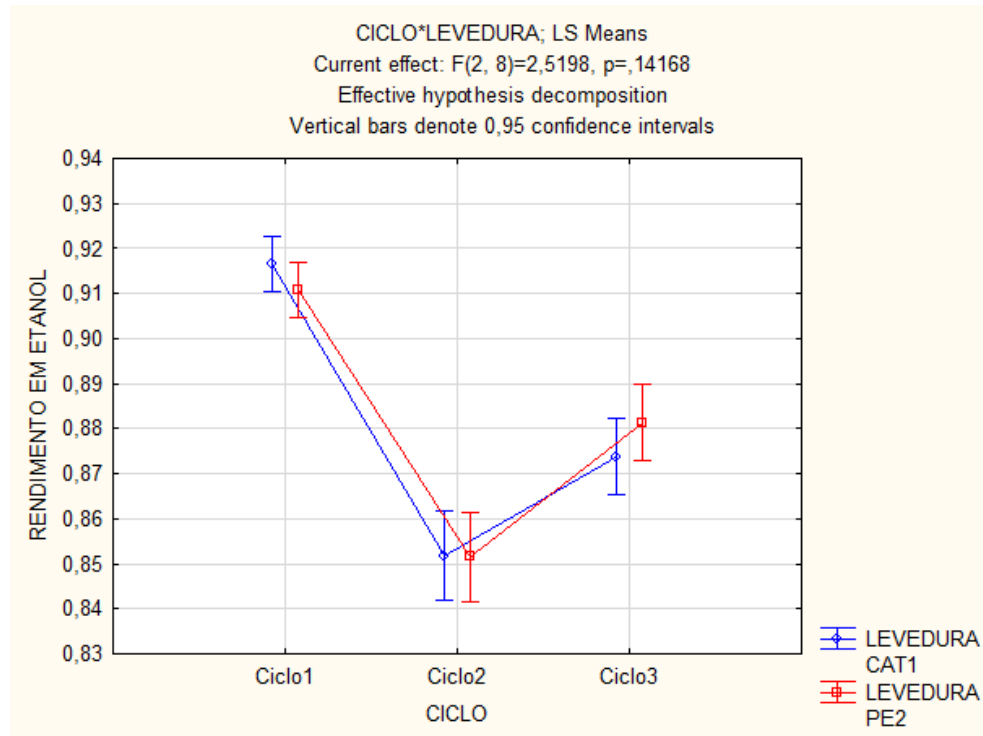


FIGURA 4 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

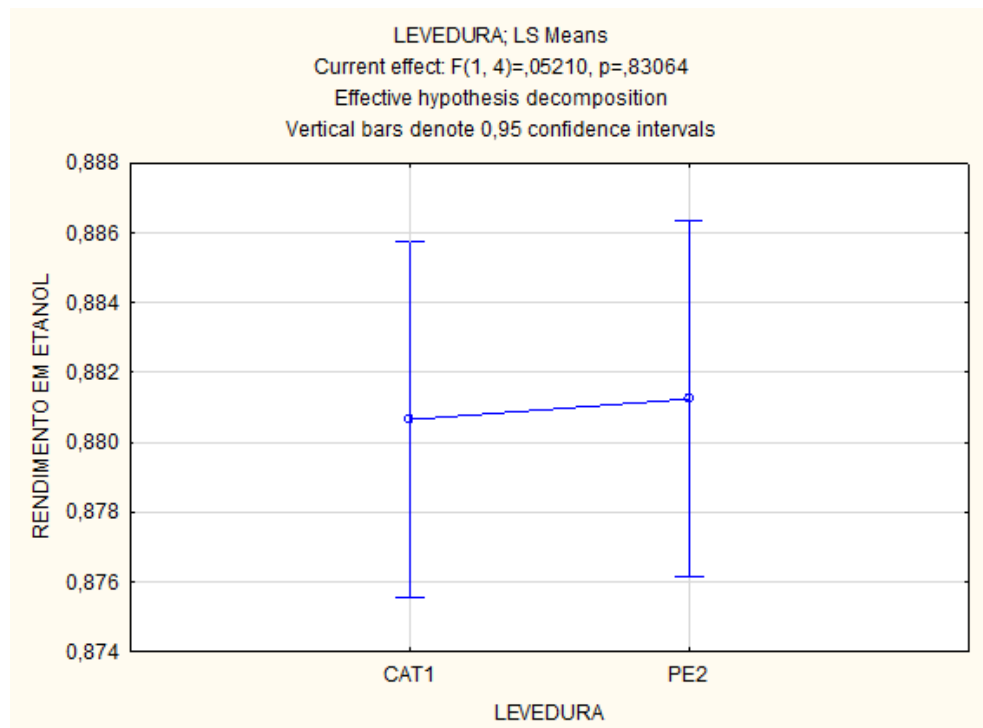


FIGURA 5 - RENDIMENTO EM ETANOL COMPARADO ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

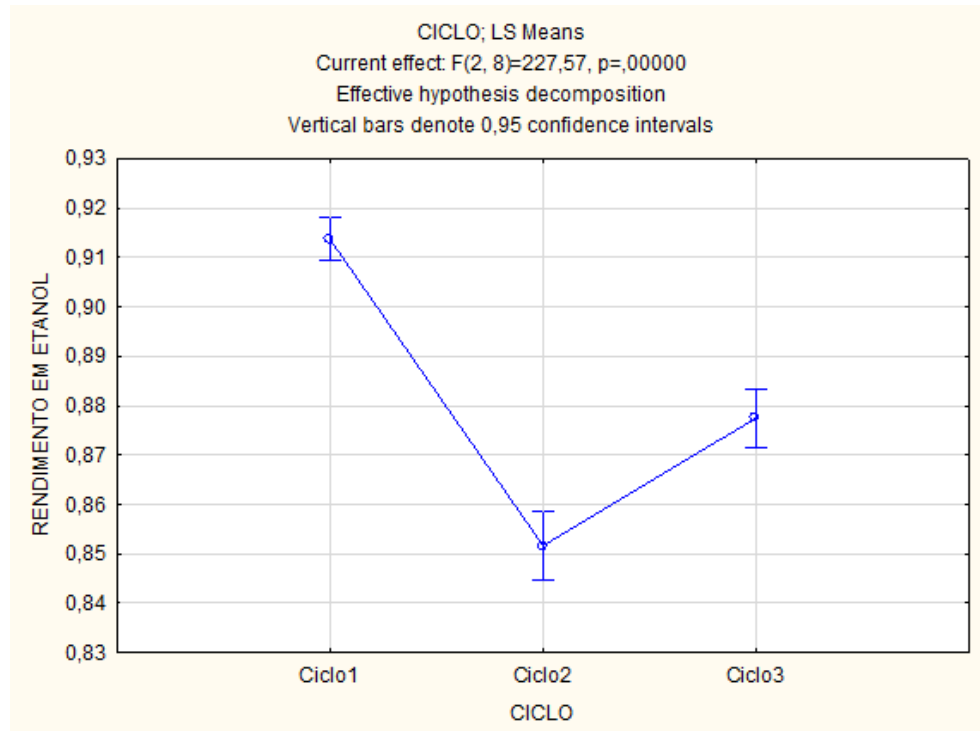


FIGURA 6 - RENDIMENTO EM ETANOL COMPARADO ENTRE OS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
FONTE: A autora (2015).

TABELA 3 - RESULTADOS DE ANOVA PARA PRODUÇÃO DE GLICEROL PELAS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

FATOR	SS	GL	MS	F	p
LEVEDURA	,008	1	,008	,82	,416
CICLO	,218	2	,109	10,64	,006*
CICLO*LEVEDURA	,004	2	,002	,19	,834

FONTE: A autora (2015).

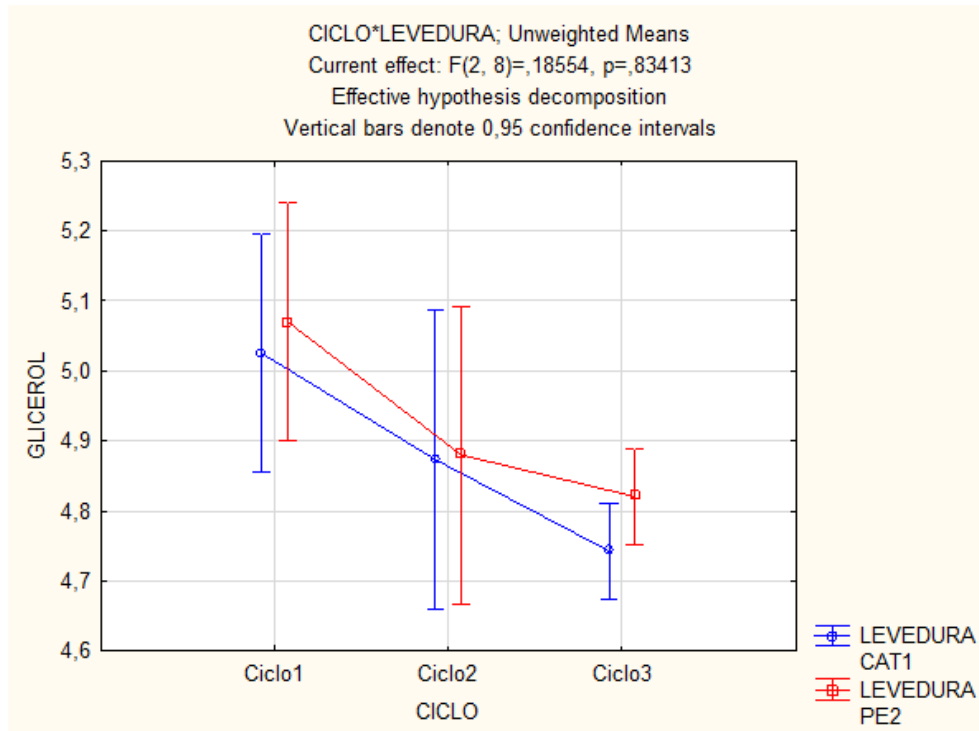


FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE GLICEROL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

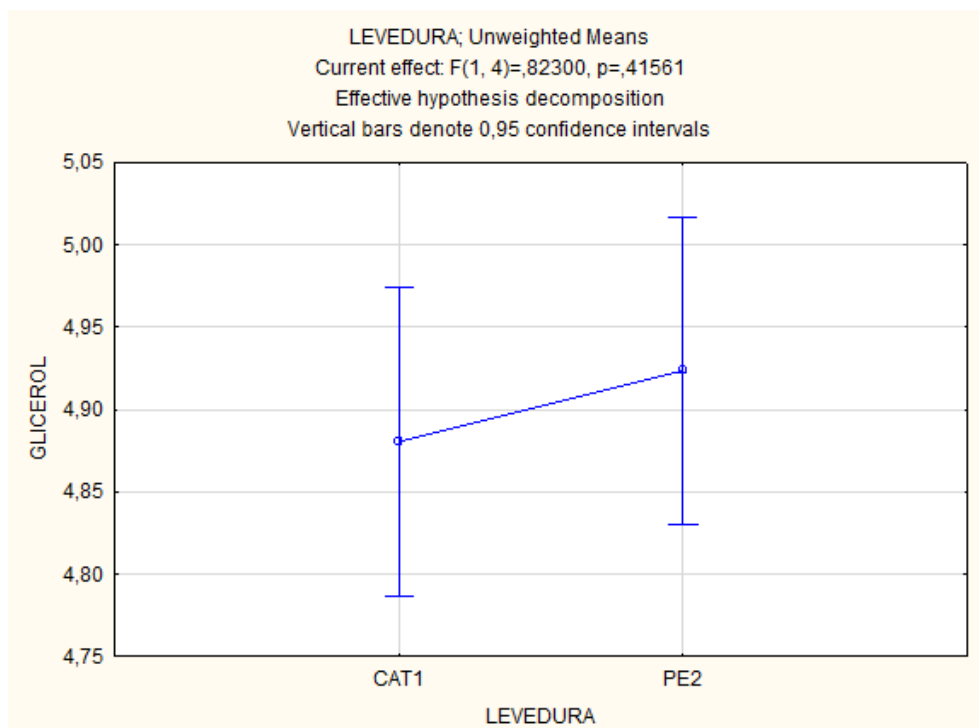


FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE GLICEROL COMPARADA ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

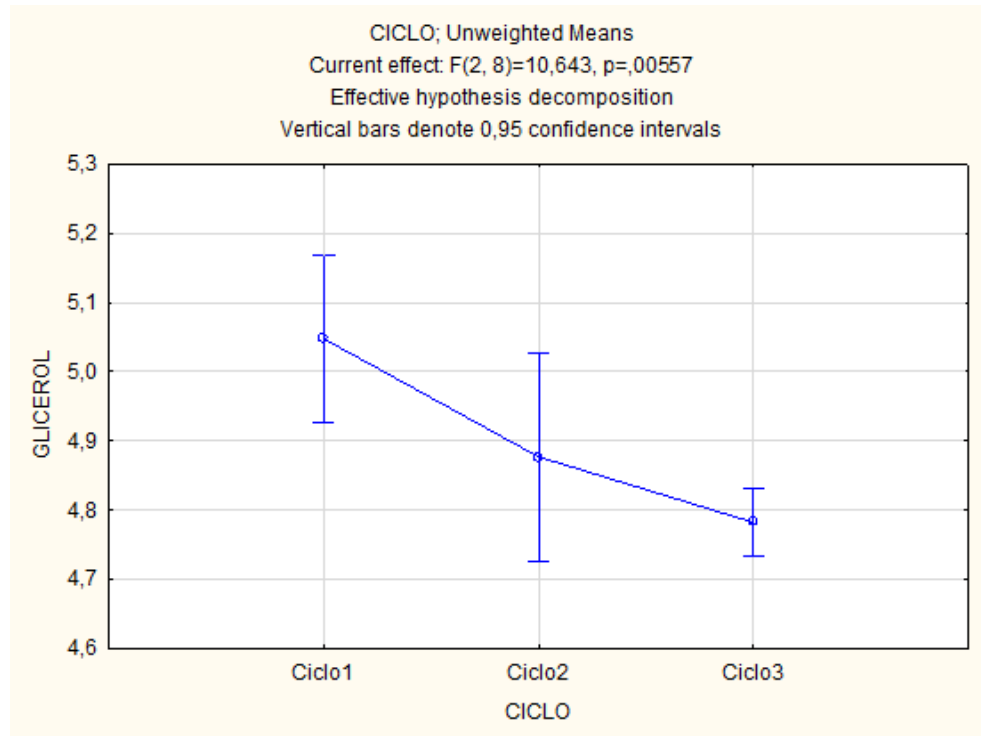


FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE GLICEROL COMPARADA ENTRE OS CICLOS
 FONTE: A autora (2015).

TABELA 4 - RESULTADOS DE ANOVA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

EFEITO	SS	GL	MS	F	p
LEVEDURA	,006	1	,006	71,48	,001*
CICLO	,003	2	,001	32,18	,000*
CICLO*LEVEDURA	,001	2	,000	5,89	,027*

FONTE: A autora (2015).

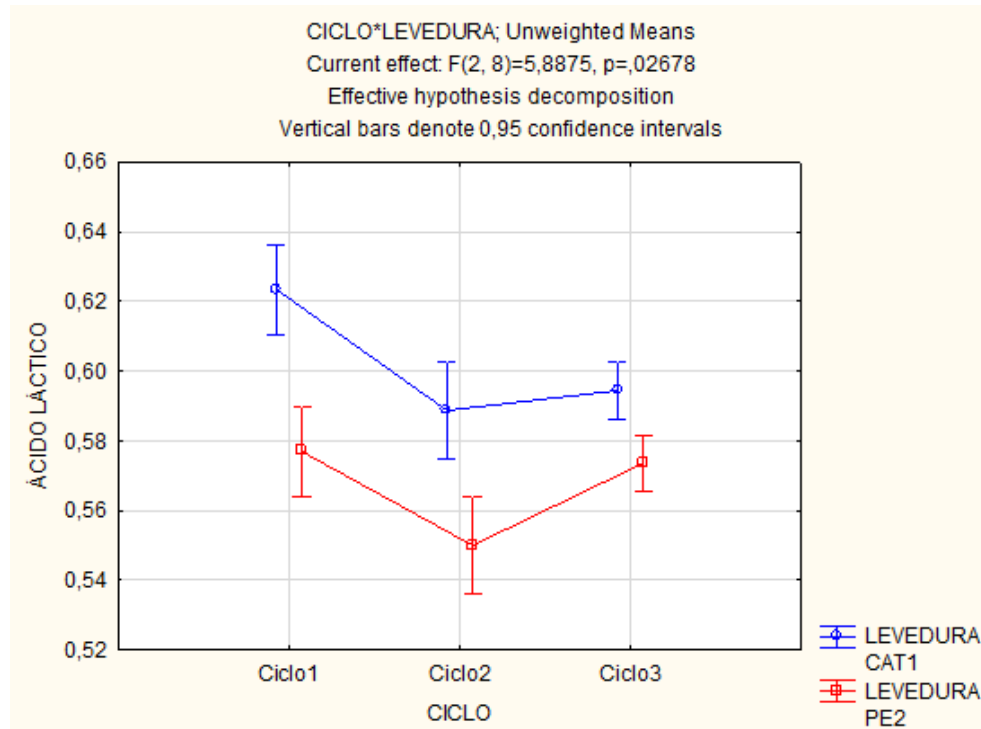


FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

TABELA 5 - RESULTADOS DE ANOVA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2

EFEITO	SS	GL	MS	F	p
LEVEDURA	,027	1	,027	103,5	,001*
CICLO	,007	2	,004	16,8	,001*
CICLO*LEVEDURA	,000	2	,000	,4	,693

FONTE: A autora (2015).

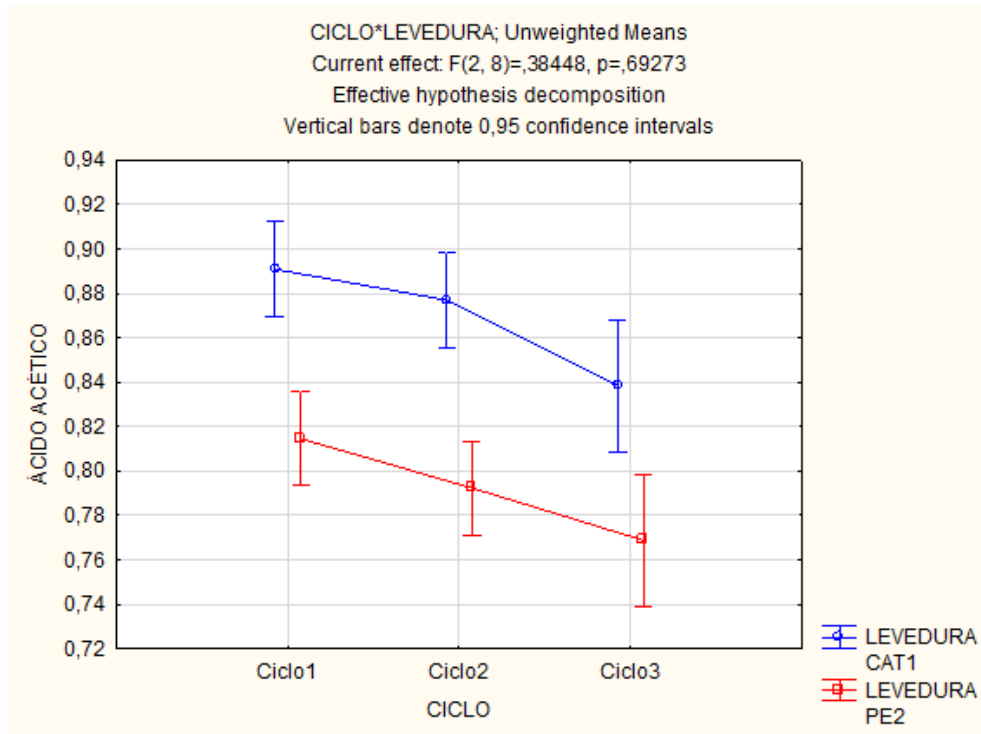


FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E PE-2
 FONTE: A autora (2015).

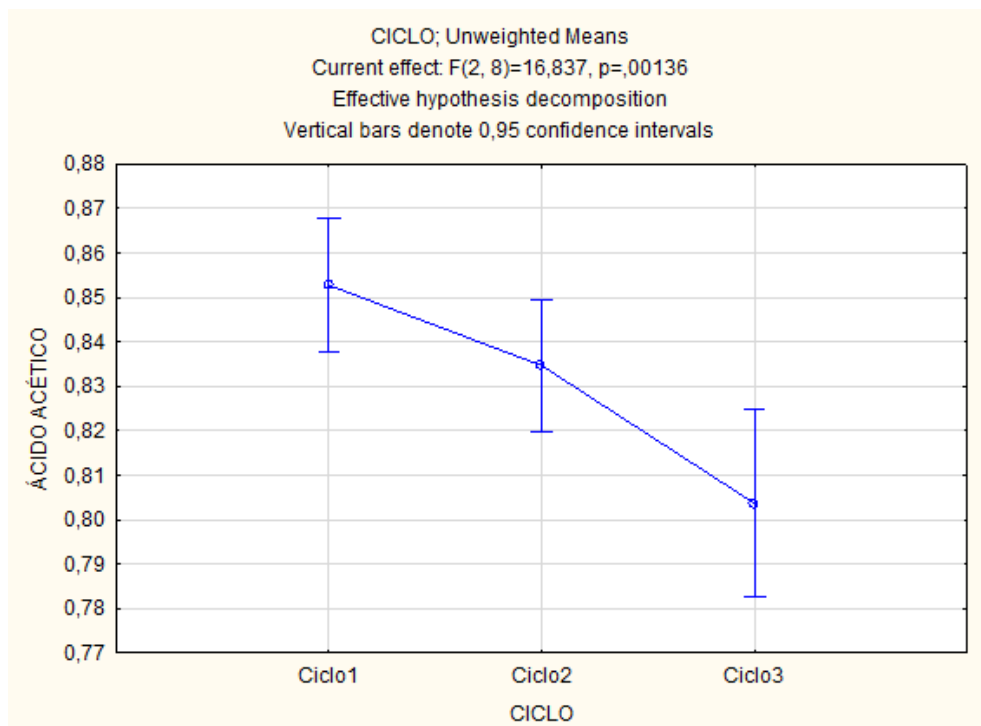


FIGURA 12 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO COMPARADA ENTRE OS CICLOS
 FONTE: A autora (2015).

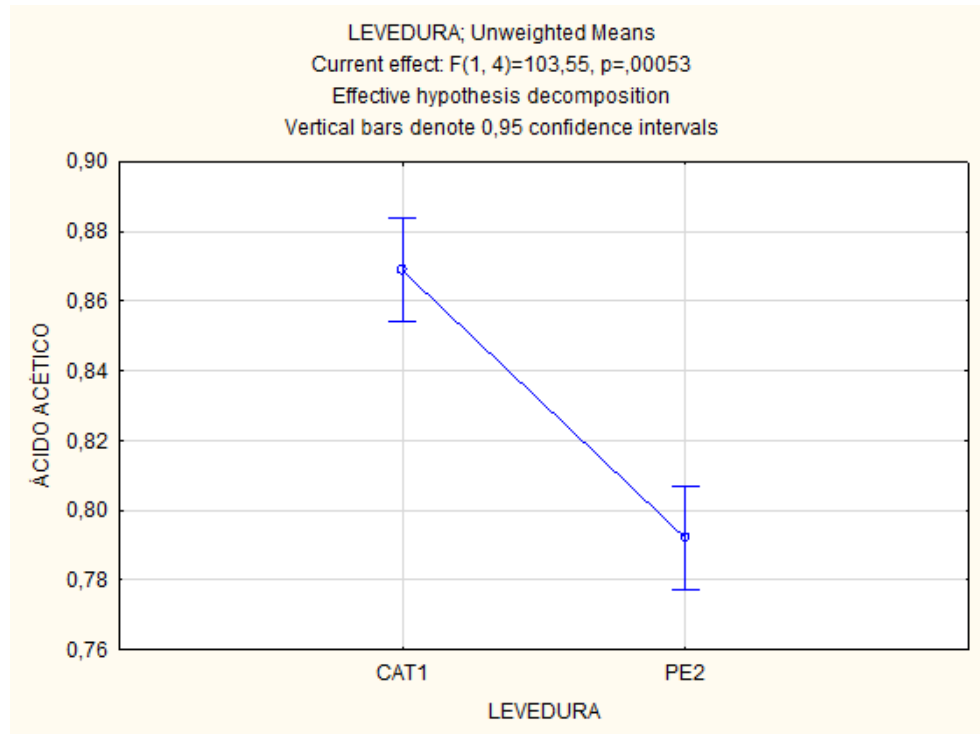


FIGURA 13 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO COMPARADA ENTRE LEVEDURAS
FONTE: A autora (2015).

APÊNDICE B - ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT NO MELAÇO B

TABELA 1 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE ANOVA PARA VIABILIDADE CELULAR

FATOR	SS	GL	MS	F	p
LEVEDURA	,006	1	,006	56,77	,002*
CICLO	,027	2	,014	32,38	,000*
CICLO*LEVEDURA	,006	2	,003	7,48	,015*

FONTE: A autora (2015).

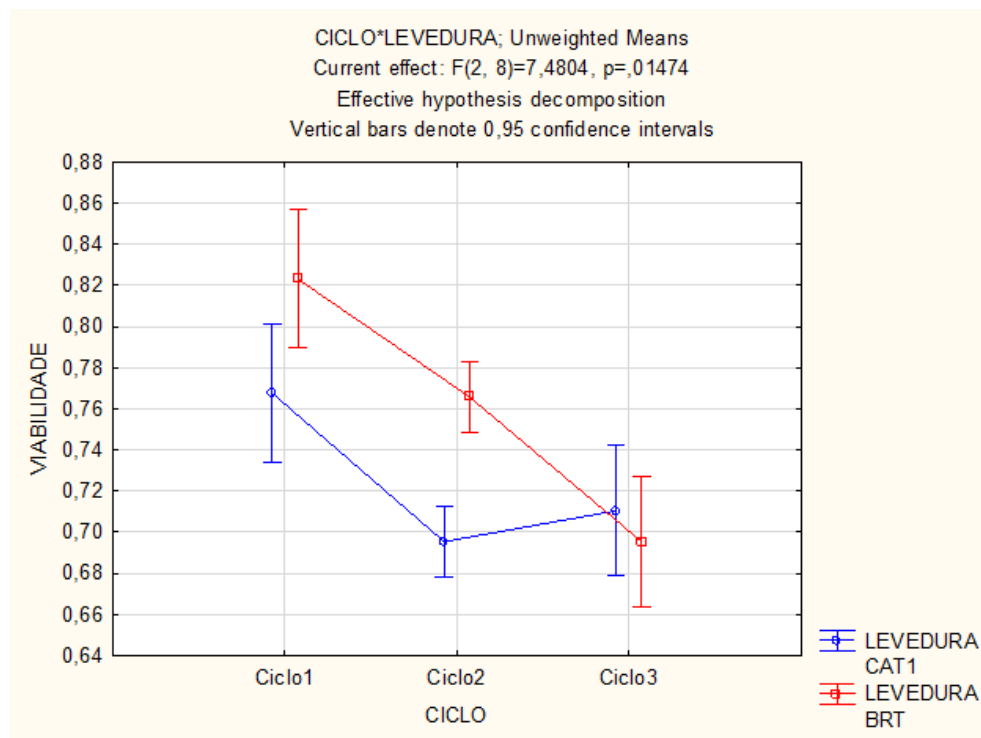


FIGURA 1 - VIABILIDADE CELULAR AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT

FONTE: A autora (2015).

TABELA 2 - RESULTADOS DE ANOVA PARA RENDIMENTO EM ETANOL

FATOR	SS	GL	MS	F	p
LEVEDURA	,001	1	,001	,135	,732
CICLO	,001	2	,000	3,576	,078
CICLO*LEVEDURA	,000	2	,000	1,535	,273

FONTE: A autora (2015).

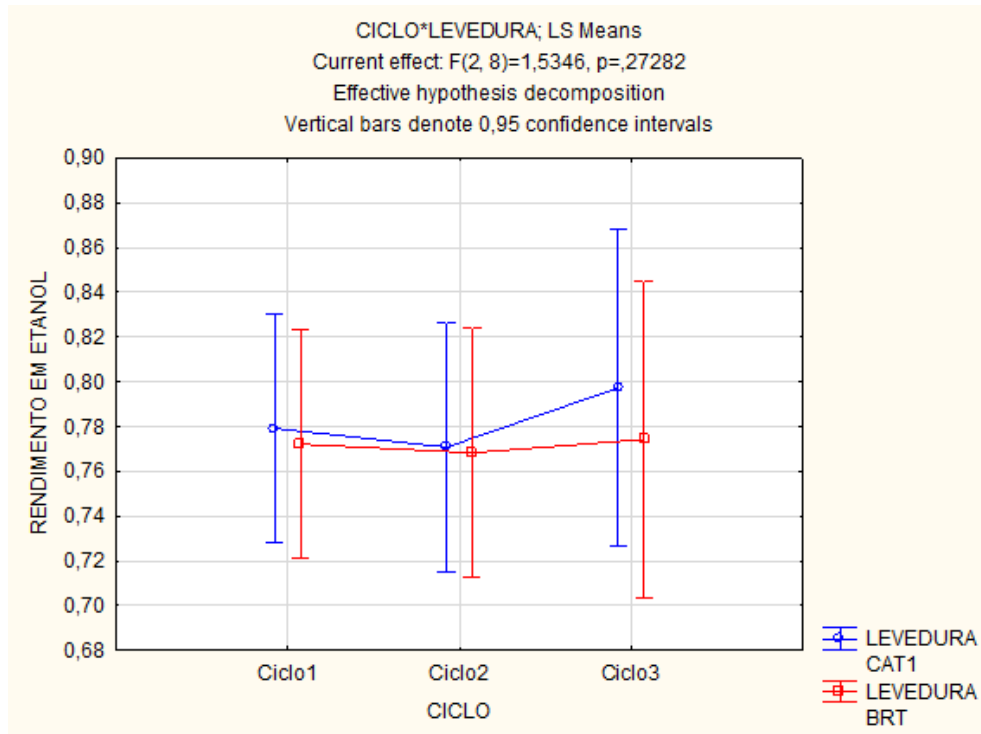


FIGURA 2 - RENDIMENTO EM ETANOL AO LONGO DOS CICLOS PARA AS LEVEDURAS CAT-1 E BRT
 FONTE: A autora (2015).

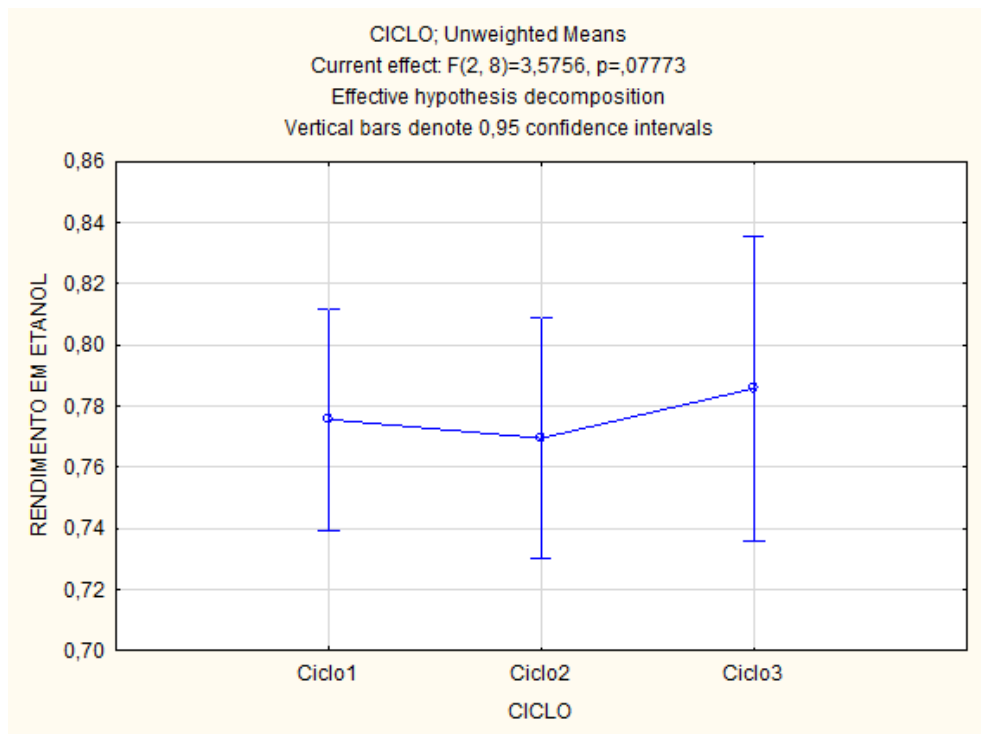


FIGURA 3 - RENDIMENTO EM ETANOL COMPARADO ENTRE CICLOS
 FONTE: A autora (2015).

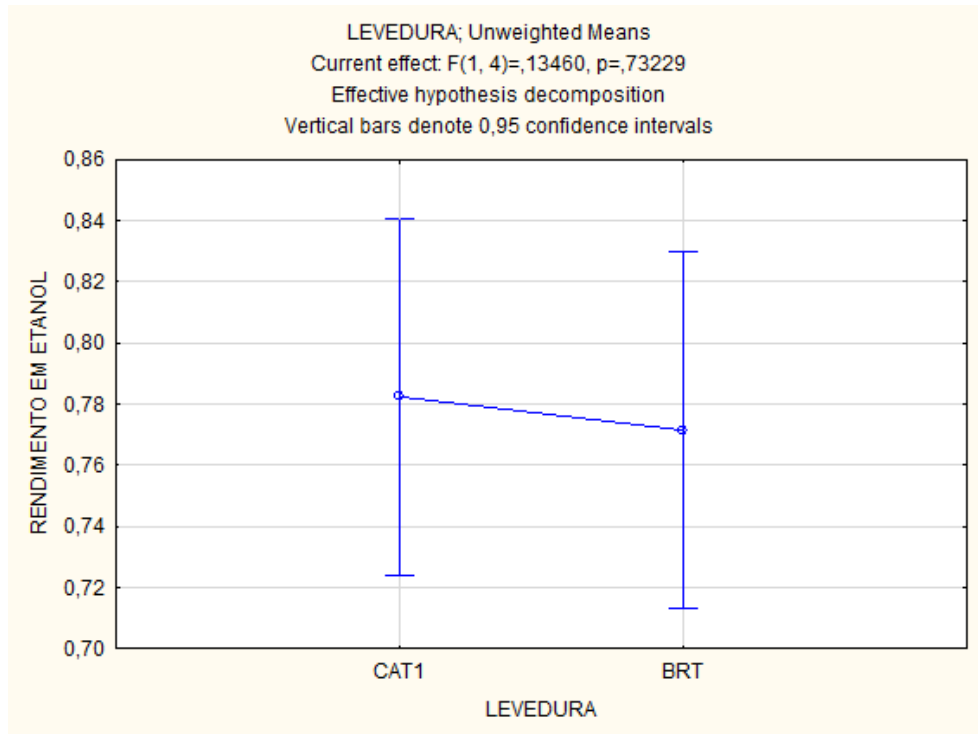


FIGURA 4 - RENDIMENTO EM ETANOL COMPARADO ENTRE LEVEDURAS
FONTE: A autora (2015).

APÊNDICE C - ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE MELAÇOS A E B PARA A LINHAGEM CAT-1

TABELA 1 - RESULTADO DE ANOVA PARA VIABILIDADE CELULAR

FATOR	SS	GL	MS	F	p
MELAÇO	,158	1	,158	2949,	,000*
CICLO	,004	2	,002	19,	,001*
CICLO*MELAÇO	,005	2	,003	25,	,000*

FONTE: A autora (2015).

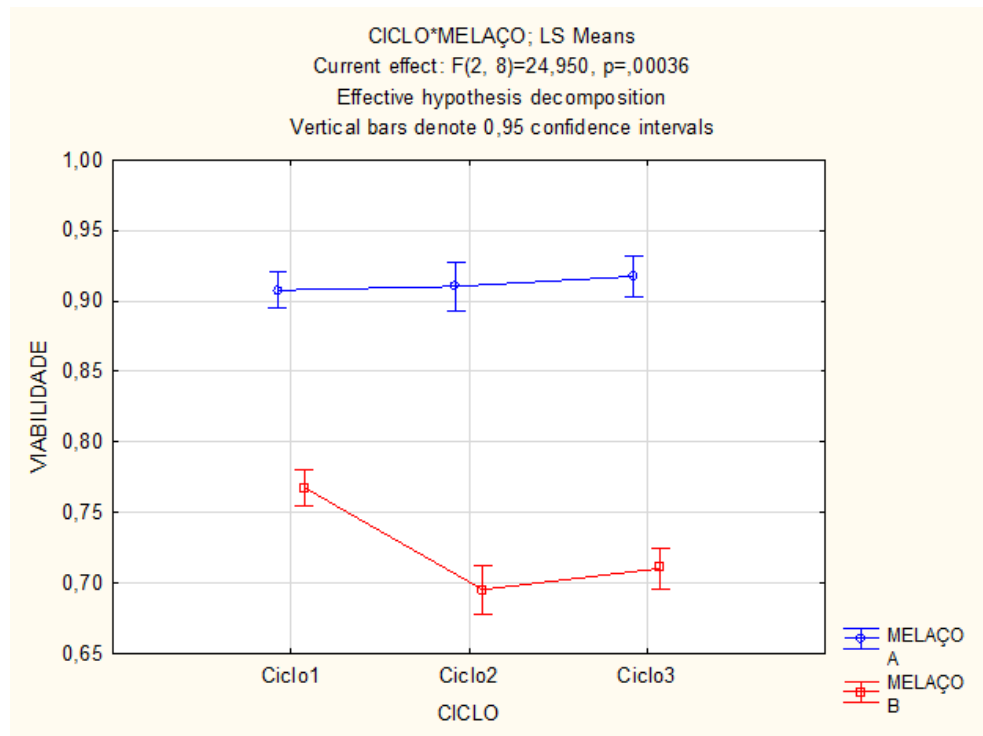


FIGURA 1 - VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B

FONTE: A autora (2015).

TABELA 2 - RESULTADOS DE ANOVA PARA RENDIMENTO EM ETANOL

FATOR	SS	GL	MS	F	p
MELAÇO	,043	1	,043	917,9	,000*
CICLO	,004	2	,002	88,6	,000*
CICLO*MELAÇO	,003	2	,002	73,5	,000*

FONTE: A autora (2015).

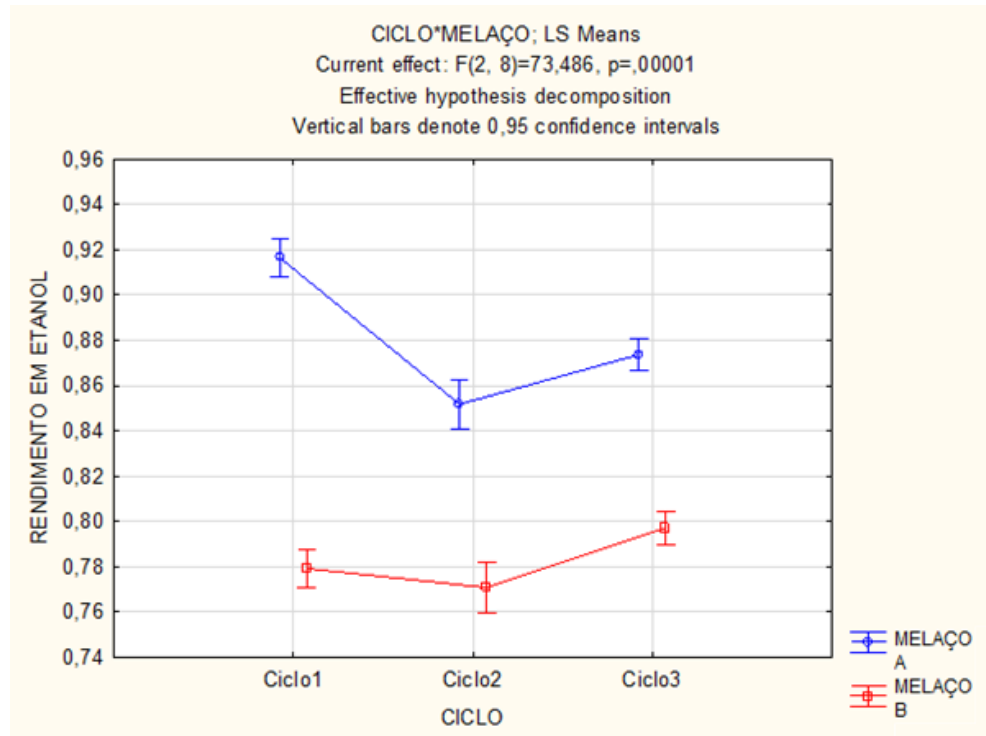


FIGURA 2 - RENDIMENTO EM ETANOL DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).

TABELA 3 - RESULTADOS DE ANOVA PARA PRODUÇÃO DE GLICEROL PELA LINHAGEM CAT-1 NOS MELAÇOS A E B

FATOR	SS	GL	MS	F	p
MELAÇO	,675	1	,675	53,83	,002*
CICLO	,016	2	,008	,46	,646
CICLO*MELAÇO	,279	2	,139	7,95	,013*

FONTE: A autora (2015).

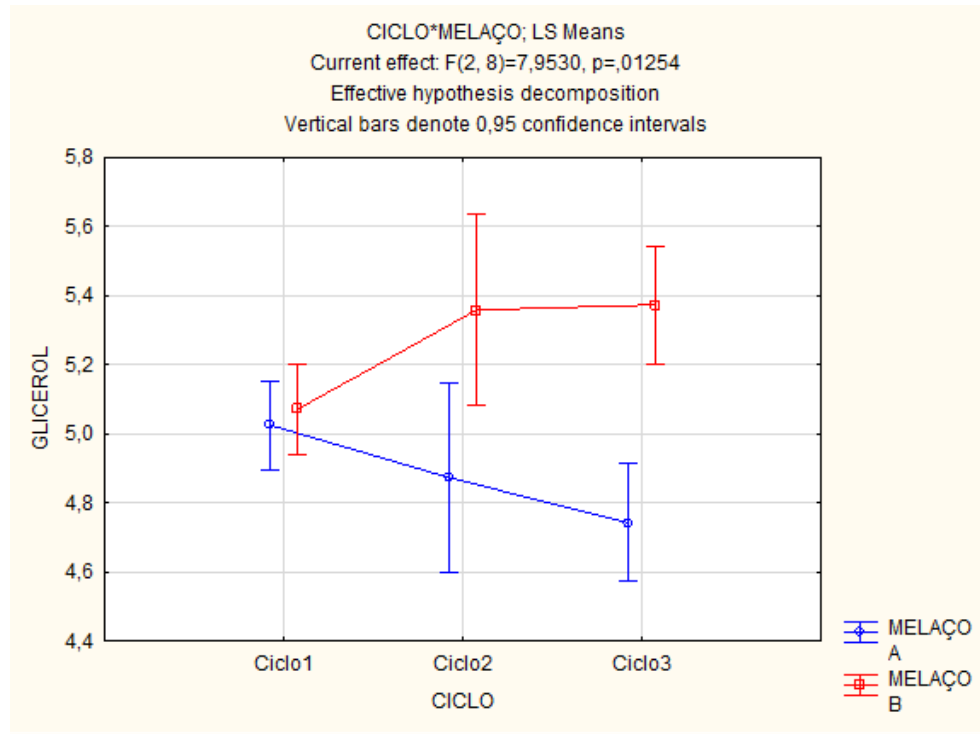


FIGURA 3 - PRODUÇÃO DE GLICEROL (GL/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).

TABELA 4 - RESULTADOS DE ANOVA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

EFEITO	SS	GL	MS	F	p
MELAÇO	,133	1	,133	1064,	,000*
CICLO	,001	2	,000	5,	,040*
CICLO*MELAÇO	,001	2	,001	7,	,019*

FONTE: A autora (2015).

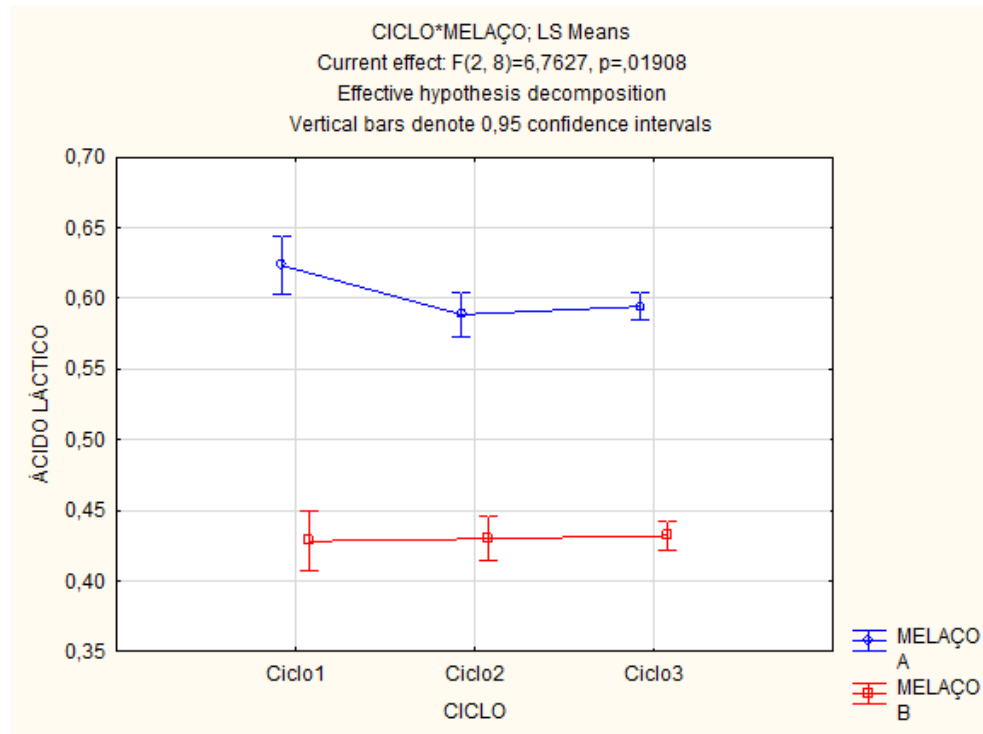


FIGURA 4 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).

TABELA 5 - RESULTADOS DE ANOVA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO

FATOR	SS	GL	MS	F	p
MELAÇO	1,363	1	1,363	437,1	,000*
CICLO	,003	2	,001	,7	,543
CICLO*MELAÇO	,004	2	,002	1,0	,406

FONTE: A autora (2015).

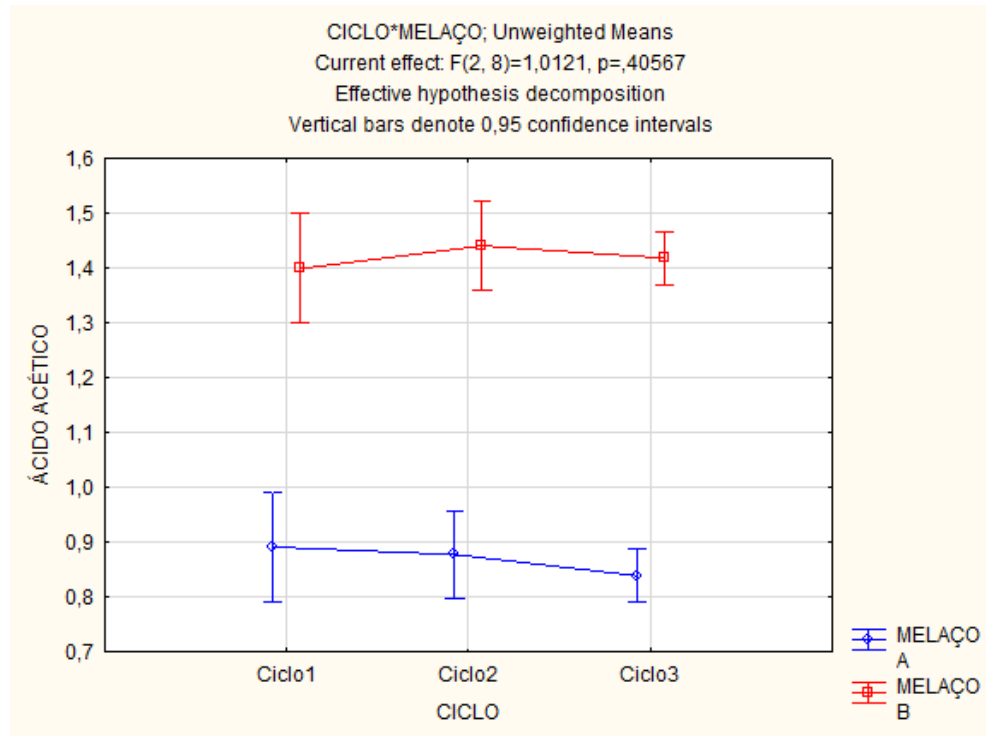


FIGURA 5 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (G/L) DA LINHAGEM CAT-1 AO LONGO DOS CICLOS PARA OS MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).

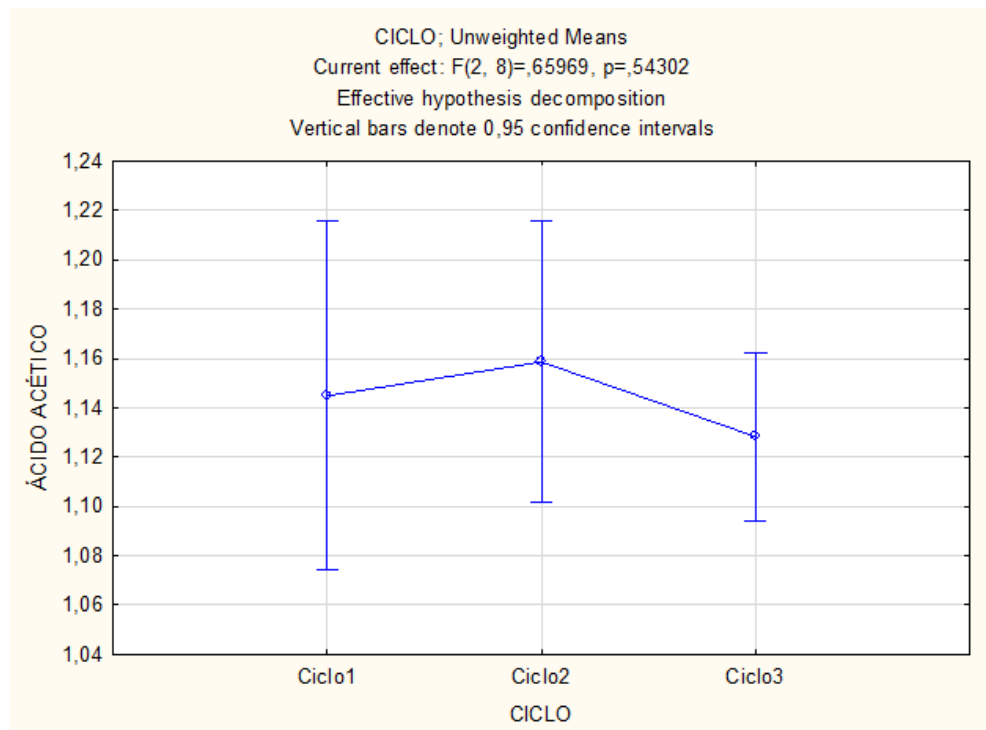


FIGURA 6 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO PELA LINHAGEM CAT-1 NOS MELAÇOS A E B, COMPARADA ENTRE CICLOS
FONTE: A autora (2015).

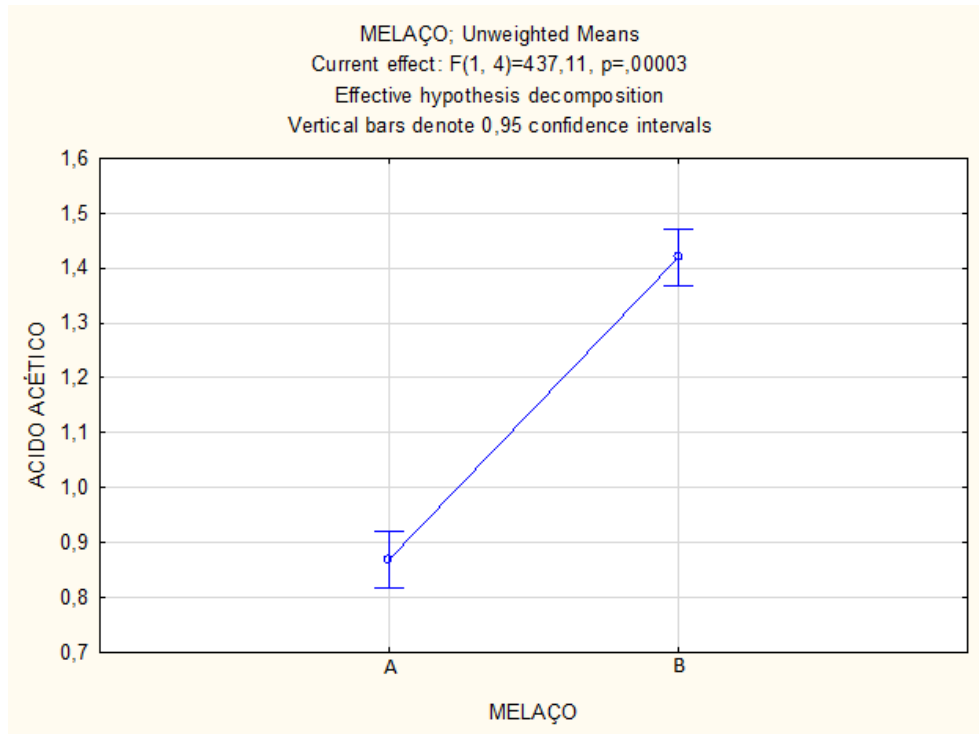


FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO DA LINHAGEM CAT-1 COMPARADA ENTRE MELAÇOS A E B
FONTE: A autora (2015).