

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM ENERGIA DA**  
**BIOMASSA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ETANOL**

**KAROLLINA SIQUEIRA MOURA**

**USO DE LEVEDURA DO PROCESSO FERMENTATIVO COMO FONTE DE**  
**DIVERSIDADE PARA SELEÇÃO DE MULTIRRESISTÊNCIA**

**Rio Largo**

**2016**

**KAROLLINA SIQUEIRA MOURA**

**USO DE LEVEDURA DO PROCESSO FERMENTATIVO COMO FONTE DE  
DIVERSIDADE PARA SELEÇÃO DE MULTIRRESISTÊNCIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Profissionalizante em Energia da Biomassa da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Energia da Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior.

**Rio Largo**

**2016**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

M929u Moura, Karollina Siqueira.  
Uso de levedura do processo fermentativo como fonte de diversidade para  
seleção de multiresistência / Karollina Siqueira Moura. – 2016.  
64 f. : il.

Orientador: Gildemberg Amorim Leal Júnior.  
Dissertação (Mestrado Profissional em Energia da Biomassa) – Universidade  
Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação em Energia da Biomassa.  
Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

Bibliografia: f. 59-64.

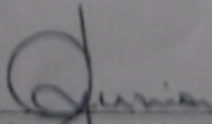
1. Levedura. 2. Etanol. 3. Multirresistência. 4. Diversidade. 5. GTG5.  
I. Título.

CDU: 664.642:661.722

KAROLLINA SIQUEIRA MOURA

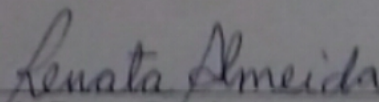
USO DE LEVEDURA DO PROCESSO FERMENTATIVO COMO  
FONTE DE DIVERSIDADE PARA SELEÇÃO DE  
MULTIRESTÊNCIA

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação Profissional em Energia da Biomassa da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 09 de maio 2016.

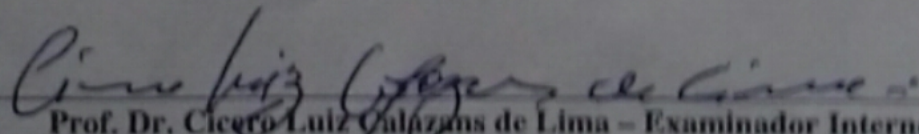


Prof. Dr. Gildeberg Amorim Leal Júnior – Orientador  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

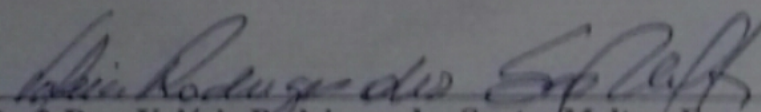
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida - Examinadora Interna  
Universidade Federal de Alagoas – CTEC - UFAL



Prof. Dr. Cicero Luiz Calazans de Lima – Examinador Interno  
Universidade Federal de Alagoas – CECA- UFAL



Prof. Dra. Valéria Rodrigues dos Santos Malta – Examinadora Externa  
Universidade Federal de Alagoas – IQB- UFAL

***DEDICO***

Ao Theo, meu filho, por ser a motivação maior de todo este meu esforço. E a minha família pela ajuda irrestrita para a obtenção deste objetivo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Alagoas – (UFAL) e ao Centro de Ciências Agrárias – (CECA) pela aquisição de conhecimento pelo corpo docente fundamental para a minha construção profissional e pessoal.

Ao meu orientador Gildemberg Leal Amorim Júnior pela confiança e paciência.

Aos meus amigos da Clínica de Fitossanitária do Centro de Ciências Agrárias - (UFAL) em especial: Ana Paula Maria da Silva, Ana Paula Vieira e Kledson Lopes Barbosa pela colaboração substancial para a obtenção dos resultados;

Aos diretores e funcionários das unidades agroindustrial das destilarias da Usina Santa Clotilde S/A, Usina Coruripe e Alambique Joaquim Gomes pela disponibilização de material biológico e dos subprodutos da cadeia produtiva do etanol e da cachaça;

À Clínica de Fitossanitária do Centro de Ciências Agrárias – (UFAL) por facultar recursos que possibilitaram o cumprimento dos objetivos desta dissertação;

Ao Laboratório de Microbiologia aplicada – BIOGEN (UFAL) pela concessão do laboratório para realização das análises por biologia molecular vital para a discriminação das linhagens de leveduras;

Ao Laboratório Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias – (UFAL) pela disponibilização dos equipamentos indispensáveis na obtenção dos resultados;

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“O êxito ou o fracasso de sua vida não depende de quanta força você põe em uma tentativa, mas da persistência do que fizer” (Autor desconhecido).

## RESUMO

A destilaria é um ambiente de grande diversidade de leveduras que podem apresentar características desejáveis e indesejáveis para o processo fermentativo. O monitoramento por técnicas clássicas e moleculares permite conhecer a diversidade da população de leveduras que serão selecionadas quanto à resistência aos fatores de estresse. As leveduras presentes na Usina Coruripe na Safra 2013/2014 foram selecionadas através do incremento do teor de °Brix buscando o desenvolvimento de linhagens. Primeiramente, a população inicial de leveduras foi caracterizada pela macromorfologia e pelo polimorfismo da região do genoma *ITS* (*Internal Transcribed Sequence*) e de regiões repetitivas do genoma. A seleção constituiu de fermentações consecutivas iniciadas com 17 de °Brix aumentando o teor a cada cinco fermentações até o grau 22. As leveduras identificadas antes e após o processo de seleção foram avaliadas para a capacidade de crescimento pelo parâmetro do  $\mu_{M\acute{a}x}$  (Taxa de crescimento específica). As linhagens com maior  $\mu_{M\acute{a}x}$  foram submetidas aos testes fisiológicos, a fim de identificar a resistência à temperaturas, pH, glicose e etanol. Trinta e três linhagens de leveduras distribuídas em 12 morfotipos foram obtidas durante o processo de seleção, resultando em 26 cepas. Vinte e duas das 33 linhagens apresentaram colônias com textura lisa. O tamanho do fragmento amplificado referente à região ITS identificou linhagens de levedura do gênero *Saccharomyces* e grupos genéticos foram obtidos com o microssatélite  $GTG_5$ , sendo quatro perfis genéticos obtidos antes da seleção e quatro após pressão de seleção. Nove isolados apresentaram alta performance em relação a multiplicação celular com destaque para o isolado C2(4F) com desempenho semelhante a linhagem controle CAT-1 respectivamente,  $0,7817\text{ h}^{-1}$  e  $0,8630\text{ h}^{-1}$ . Os isolados C2(6F) e C3(6F) apresentam resistência à glicose e a temperatura. O isolado C2(3I) obtido antes da seleção foi o mais resistente considerando todos os parâmetros analisados. Os resultados encontrados revelam a importância de melhor investigar as leveduras obtidas durante o experimento, visto que a melhor performance frente aos principais fatores de estresse da fermentação alcoólica foi encontrada na linhagem isolada na destilaria.

Palavras-chave: Levedura; Etanol, Multirresistência, Diversidade,  $GTG_5$ .



## ABSTRACT

Distillery is an environment of yeast great diversity which may have desirable characteristics for the fermentation process. Monitoring by classical and molecular techniques allows to know the diversity of the population of which will be selected as the resistance to stress factors that compromise qualitative and quantitative production of ethanol. Looking for the diversity contribution of plant in the developing lines process, the yeasts present in Usina Coruripe in Safra 2013/2014 were selected through of °Brix. Firstly, the population initial of yeast was characterized by macromorphology and the polymorphism genome ITS region (Internal Transcribed sequence) and intercalated to the microsatellite regions. The selection is consecutive fermentations started with 17 ° Brix increasing content every five fermentations up to grade 22. Yeasts identified before and after the selection process were evaluated for growth capacity by  $\mu_{M\acute{a}x}$  (The specific growth rate) parameter. Strains with greater  $\mu_{M\acute{a}x}$  were subjected to physiological testing to identify the temperature resistance, pH, glucose and ethanol. Thirty-three yeast strains distributed in 12 morphotypes were obtained during the selection process, resulting in 26 strains. Twenty two of the 33 strains showed colonies with smooth texture. The fragment size amplified referring to the region ITS identified yeast strains of the genus *Saccharomyces* and genetic groups were obtained with the GTG<sub>5</sub> microsatellite, four genetic profiles were obtained before selecting and four after selection pressure. Nine isolates showed high performance in relation to cell proliferation highlighting the isolated C2 (4F) with similar performance lineage CAT-1 control respectively, 0.7817 h<sup>-1</sup> and 0.8630 h<sup>-1</sup>. The isolated C2 (6F) and C3 (6F) are resistant to glucose and temperature. The isolated C2 (3I) obtained before the selection was the toughest considering all parameters analyzed. The results reveal the importance of investigate better the yeast obtained during the experiment, since the best performance front to the main stress factors of alcoholic fermentation was found in the strain isolated in the distillery.

Keywords: Yeasts, Ethanol, Multi-resistance, Diversity, GTG<sub>5</sub>.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ilustração do número de morfotipos obtidos a partir das linhagens de leveduras isoladas antes e após pressão de seleção.....34
- Figura 2- Ilustração dos morfotipos isolados durante as fermentações para obtenção de linhagens de leveduras em mosto fermentado de melão.....35
- Figura 3 - Ilustração dos aglomerados celulares “pseudohifas” em microscopia óptica e em meio de cultivo ágar YEPD.....39
- Figura 4 - Ilustração da eletroforese em gel de agarose com o padrão de amplificação da região ITS do DNAr das linhagens de leveduras isoladas no início de safra.....40
- Figura 5 - Ilustração da eletroforese em gel de agarose com o padrão de amplificação da região ITS do DNAr das linhagens de leveduras isoladas no meio de safra.....41
- Figura 6 - Ilustração da eletroforese em gel de agarose com o padrão de amplificação da região ITS do DNAr das linhagens de leveduras isoladas no final de safra. ....42
- Figura 7 - Ilustração com os padrões genéticos das linhagens de leveduras antes a pressão de seleção através do microssatélite GTG<sub>5</sub>.....43
- Figura 8 - Ilustração com os padrões genéticos das linhagens de leveduras após a pressão de seleção através do microssatélite GTG<sub>5</sub>.....44
- Figura 9 - Gráfico com as frequências dos perfis genéticos para o microssatélite GTG<sub>5</sub> das linhagens de leveduras obtidas antes e após a pressão de seleção.....45
- Figura 10 - Gráfico com a distribuição dos grupos genéticos das linhagens de leveduras obtidas após a pressão de seleção.....46
- Figura 11 - Gráfico com as comparações dos valores do  $\mu$ Máx das linhagens de leveduras isoladas da coleta um, antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.....47
- Figura 12 - Gráfico com as comparações dos valores do  $\mu$ Máx das linhagens de leveduras isoladas da coleta dois, antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.....48
- Figura 13 - Gráfico com as comparações dos valores do  $\mu$ Máx das linhagens de leveduras isoladas da coleta três, antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.....49

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Determinação dos isolados selecionados com melhores desempenhos para a diluição $10^{-4}$ frente aos parâmetros etanol, glicose, temperatura e pH.....	58
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do número de morfotipos obtidos nos diferentes períodos de safra 2013/2014 antes e após pressão de seleção.....	36
Tabela 2 - Distribuição do número de linhagens de leveduras por coleta antes e após os ensaios fermentativos com pressão de seleção.....	37
Tabela 3 - Linhagens de leveduras isoladas do processo fermentativo antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.....	38
Tabela 4 - Relação do $\mu_{M\acute{a}x}$ e do $R^2$ das linhagens isoladas durante a seleção de leveduras.....	50
Tabela 5 - Médias do número de colônias nas diluições $10^{-3}$ e $10^{-4}$ crescidas após cultivo em meio WLN com etanol nas concentrações 0%, 1,0% e 2,0%.....	51
Tabela 6 - Médias do número de colônias nas diluições $10^{-3}$ e $10^{-4}$ crescidas após cultivo em meio WLN com etanol nas concentrações 100g/L e 200 g/L.....	53
Tabela 7 - Médias do número de colônias nas diluições $10^{-3}$ e $10^{-4}$ crescidas após cultivo em meio WLN a 30°C, 35°C e 40°C.....	55
Tabela 8 - Médias do número de colônias nas diluições $10^{-3}$ e $10^{-4}$ crescidas após cultivo em meio WLN com pH 1,0, 3,0 e 5,0.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AL - Alagoas.

Atm - atmosfera.

ATP - adenosina Trifosfato.

° Brix - porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos numa solução.

BG-1 - linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isolada na Usina Barra Grande.

BSA - albumina do soro bovina.

CAT-1 - Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isolada na Usina Catanduva.

Cél/mL - células por mililitro.

CIA - clorofórmio mais álcool isoamílico.

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônia.

°C - graus Celsius.

DNA - ácido desoxirribonucleico.

dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados.

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético.

FT858L - Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* derivada da PE-2.

g - grama (unidade de medida de massa).

°GL - Gay Lussac (porcentagem em volume, % vol).

g/L - gramas por litro.

GTG5 - oligonucleotídeo GTGGTGGTGGTGGTG.

h<sup>-1</sup> - hora.

ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*.

ITS - região espaçadora transcrita interna.

L0 - Leitura inicial.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio.

mg - miligrama.

mL - mililitro.

mM - milimolar.

m/m - massa/massa.

nm - nanômetro.

NaCl - cloreto de sódio.

NADH - nicotinamida-adenina-dinucleotídeo.

PCR - reação em cadeia da polimerase.

PE-2 - linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isolada na Usina Pedra.

pH - potencial hidrogeniônico.

PVP - polivinilpirrolidona.

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação.

RFLP mtDNA - *Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism*.

rpm - rotação por minuto.

RNA - ácido ribonucleico.

RNA<sub>r</sub> - RNA ribossômico.

RNAse - enzima que degrada o ácido ribonucleico.

SA-1 - Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isolada na Usina Santa Adélia.

TAE - Tris acetato EDTA.

TE - tris-HCl e EDTA.

USP - Universidade de São Paulo.

v/v - volume/volume.

WLN - Wallerstein Laboratory Nutrient ágar.

YEPD - extrato de levedura, peptona de carne e dextrose.

μL - microlitro.

μM - milimolar.

μMáx: - taxa de crescimento específica.

pb - pares de bases.

kb - kilo bases.

% - por cento.

Σ - somatório.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2 Objetivo Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Aspectos Gerais: Etanol de cana-de-açúcar.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Microbiologia da Fermentação: Principais Linhagens de Leveduras.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Fatores Limitantes do Processo Fermentativo.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1 Etanol.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Alta Concentração de Glicose.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3 pH.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.4 Temperatura.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4. Biomonitoramento: Determinação das Linhagens Dominantes.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.1 Caracterização por Métodos Tradicionais.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.2 Caracterização por Biologia Molecular.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Seleção de Leveduras com Potencial Fermentativo.....</b>	<b>25</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Materiais Biológicos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Seleção das Linhagens de Leveduras.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1 Plaqueamento.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2 Isolamento, Purificação e Armazenamento das culturas de leveduras.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Taxa de Crescimento Específica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Análise Molecular.....</b>	<b>31</b>

<b>3.4.1 Extração de DNA Nuclear.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2 Amplificação do DNA Nuclear.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2.1 ITS 1 e 4.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2.2 Microsatélite GTG<sup>5</sup>.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Eletroforese.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Teste de Resistência Fisiológicos: etanol, glicose, temperatura e pH.....</b>	<b>33</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Diversidade Morfológica das Leveduras Isoladas Antes e Após Pressão de Seleção.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Caracterização por Biologia Molecular.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1 ITS 1 e 4.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.2 Microsatélite GTG<sub>5</sub>.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Avaliação da Taxa de Crescimento Específico.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Teste de Resistência Fisiológicos.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4.1 Etanol.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4.2 Glicose.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4.3 Temperatura.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4.4 pH.....</b>	<b>56</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Os sistemas fermentativos são caracterizados por uma vasta diversidade microbiológica, tendo nas leveduras do gênero *Saccharomyces* o principal microrganismo para a conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol. O processo fermentativo, mediado pelas leveduras, converte açúcares simples, hexoses, em etanol e dióxido de carbono. No entanto, um fator limitante na produção de etanol é a proliferação de bactérias e de linhagens de leveduras com baixa capacidade fermentativa (selvagens) devido à ineficiência no controle microbiológico ao longo do processo. Os microrganismos contaminantes competem alterando a atividade celular da levedura, desviando o substrato metabolizável para a síntese de produtos indesejados que depreciam de forma qualitativa e quantitativa a produção de etanol (SILVA-FILHO, 2005).

No Brasil, o processo fermentativo do tipo batelada conserva características artesanais apesar dos avanços tecnológicos, tornando-o vulnerável, ao ataque de microrganismos oportunistas que comprometem a produção de etanol. A determinação da microbiota permite identificar e selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens com a finalidade de aperfeiçoar o processo fermentativo, visto que, essa espécie de levedura apresenta aptidão em converter os açúcares fermentescíveis nas condições limitantes impostas pelo processo industrial de fermentação alcoólica (MOREIRA et al.; 2009). Frente a isso, técnicas moleculares são empregadas na obtenção da tipagem genética das leveduras presentes no fermentado de cana-de-açúcar, permitindo assim, inferir que os perfis genéticos encontrados são linhagens de leveduras selecionadas ou contaminantes do processo. Ao mesmo tempo, com a caracterização molecular das leveduras predominantes, linhagens com características de interesse biotecnológico podem ser selecionadas. O uso de marcadores moleculares representa uma ferramenta valiosa na discriminação de leveduras para fins fermentativos (SILVA-FILHO, 2003; ANTONANGELO, 2012;).

O biomonitoramento de linhagens de leveduras durante o período de safra permite compreender a dinâmica das populações de *Saccharomyces cerevisiae* nativas (selvagens) e outras, esclarecendo flutuações sobre o rendimento fermentativo. (HOWELL; 2004; SILVA-FILHO, et al.; 2005). No Brasil, a utilização do monitoramento genético para a determinação dos microrganismos envolvidos na produção de álcool carburante é insipiente, comparado ao número de plantas industriais, dado que, as técnicas clássicas baseadas nas características

morfofisiológicas ainda são as mais utilizadas na seleção de linhagens de leveduras para fins fermentativos. A imprecisão e a morosidade dos resultados nos sistemas tradicionais restringem a obtenção de conclusões assertivas e aplicáveis ao setor sucroalcooleiro. Logo, aplicar técnicas moleculares que são mais concisas e rápidas levam as técnicas tradicionais a serem utilizadas como coadjuvantes no estudo da diversidade microbiológica em sistemas fermentativos (TORRIANI et al.; 2004).

O sinergismo existente entre os fatores físico-químicos e biológicos do processo fermentativo refletem sobre a dinâmica das populações de leveduras. Sendo assim, para melhor caracterizar essas populações técnicas clássicas e de biologia molecular são empregadas de forma convergente. Pesquisas que contribuam na identificação de linhagens de leveduras isoladas de plantas industriais por técnicas tradicionais e moleculares, permitem caracterizar de forma mais abrangente os microrganismos dominantes. Nesse sentido, linhagens de leveduras mais aptas ao processo fermentativo podem ser selecionadas e submetidas a rigorosos testes para serem utilizadas como inóculo de partida em safras subsequentes, incrementando a produção de etanol. (SILVA-FILHO; 2003; BASÍLIO; 2008).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

Discriminar as leveduras presentes na produção de etanol, com a finalidade de identificar a diversidade de linhagens de leveduras e a sucessão durante o processo fermentativo.

### 1.1.2 Específicos

- Determinar o padrão *fingerprint* com o microssatélite GTG<sub>5</sub>, correlatando com a diversidade microbiana;
- Comparar a diversidade de leveduras identificadas pelos sistemas clássico e molecular;
- Submeter às leveduras mais frequentes no processo de seleção a testes de resistência fisiológicos;
- Diagnosticar a resiliência das leveduras predominantes, sugerindo-as como fermento de partida para a produção de etanol.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos Gerais: Etanol de cana-de-açúcar

Referência no cenário mundial desde o cultivo até a geração de etanol, o Brasil, domina o setor sucroalcooleiro com projeções de aumento na produção de cana-de-açúcar na ordem de 3,5% até a safra 2018/2019, o que corresponde, a 47,34 milhões de toneladas do produto. A cana-de-açúcar é produzida principalmente na região sudeste do país, ficando o Paraná, o Triângulo Mineiro e a Zona da Mata Nordestina como demais zonas de expressão na produção dessa cultura (MAPA; 2015). As projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015) é de que a produção de etanol para 2019 será de 58,8 bilhões de litros, representando mais que o dobro da produção registrada em 2008. O aumento do mercado interno associado a uma taxa de crescimento em torno de 4% ao ano contribuem para uso do etanol como alternativa energética.

O etanol é um álcool simples, incolor, volátil, de cheiro característico, inflamável com ponto de ebulição de 78°C e baixo ponto de fusão em torno de -144,1°C, sendo formado pela união de dois átomos de carbono, cinco átomos de hidrogênio e um grupamento hidroxila. O etanol pode ser originado por síntese química ou fermentativa, sendo a última a mais utilizada no Brasil (MACHADO; ABREU; 2006). A produção de etanol por via fermentativa é mediada por microrganismos produtores de enzimas específicas que convertem os carboidratos simples em etanol (LIMA et al.; 2001; BARRE et al.,2004). Na produção de etanol pela via fermentativa, os carboidratos potencialmente fermentescíveis são biotransformados em etanol e gás carbônico como metabólitos primários, e glicerol, ácido succínico, ácido acético, furfural e biomassa como produtos secundários.

A produção de etanol por metabolismo anaeróbico envolve a transformação da biomassa de origem açucarada, amilácea ou celulósica em álcool etílico e gás carbônico. A diferença entre as matérias-primas está nos resíduos de açúcares e no tamanho da molécula, sendo a biomassa de origem sacarínea, por exemplo, a cana-de-açúcar mais facilmente metabolizável em virtude dos monômeros de açúcares estarem mais facilmente disponíveis aos microrganismos. Couto e Sanromán (2005) citam as matérias-primas fermentadas como alternativas para a produção de etanol através da retirada do álcool de bebidas destiladas ou fermentadas. Esta alternativa é impraticável economicamente, sendo aplicada apenas diante da perecividade das bebidas para consumo humano.

No Brasil, o etanol é produzido na forma anidro e hidratado, apresentando 0,7% e 7% de água (m/m) em relação à massa alcóolica, respectivamente. O álcool anidro é empregado na indústria química e como aditivo a gasolina, enquanto o álcool hidratado abastece a demanda dos carros *flex-fuel* e a indústria de bebidas (SANTOS; 2014). A utilização dos resíduos na cogeração de energia somados a otimização das técnicas de manejo, fermentação, extração e destilação ratificam o uso do etanol de cana-de-açúcar como alternativa de matriz energética sustentável (MACHADO; ABREU; 2006; AQUINO; 2014).

## 2.2 Microbiologia da Fermentação: Principais Linhagens de Leveduras

A fermentação é um processo anaeróbico, catalisado por enzimas, que convertem os açúcares simples em etanol e gás carbônico como principais produtos metabólitos. Basicamente, os carboidratos são transformados em duas moléculas de piruvato ou ácido pirúvico, gerando ATP, molécula energética. Em seguida, cada molécula de piruvato sofre descarboxilação, catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído. Este, sob a ação da enzima álcool desidrogenase, é reduzido pela NADH a etanol (MADIGAN et al.; 2008).

Bactérias e fungos, em especial as leveduras, são microrganismos potencialmente fermentadores. Contudo, a tolerância das leveduras as altas concentrações de etanol e dióxido de carbono, associada ao crescimento rápido, induzem as mesmas a serem utilizadas como modelo de microrganismo para a produção de etanol em escala industrial (MACHADO; ABREU; 2006). As espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* são as leveduras mais utilizadas para a produção de etanol. *Kloeckera*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são gêneros de leveduras encontradas durante a fermentação do caldo de cana (GUERRA et al.; 2001; SCHWAN et al.; 2001). As espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* e *Schizosaccharomyces pombe* foram relatadas como agentes biotransformadores para a produção de etanol (ROSA et al.; 2002; PEJIN et al.; 2009).

A levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é predominante no processo fermentativo, sendo as linhagens melhoradas geneticamente e selvagens selecionadas largamente utilizadas nas destilarias para a produção de etanol no Brasil, por apresentarem características fisiológicas que permitem tolerar condições extremas (VENTURA; 2007). A

importância da levedura *S. cerevisiae* no processo industrial, deriva de um conjunto de aptidões que juntas convergem para o seu uso na produção de etanol. Entre elas, a alta capacidade fermentativa somada à tolerância as elevadas concentrações de etanol e aos inibidores produzidos ao longo do processo, resistência as altas temperaturas e baixo pH (ANDRIETTA et al.; 2006; MUSSATTO et al.; 2010). A condição do metabolismo facultativo, oxidativo e fermentativo, permite a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizar rotas metabólicas alternativas diante de condições de estresse, canalizando a energia produzida para a síntese de metabolitos secundários, por exemplo, a trealose e o glicerol, associados direta ou indiretamente a sua sobrevivência, como relatado por Tosetto (2008) e Ribeiro e Reis (2010).

A produção de etanol ainda conserva características artesanais que contribuem criando condições de estresse, induzindo a contaminação de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*. A falta de assepsia induz o aparecimento de cepas de leveduras não-*Saccharomyces* durante a produção de etanol (BERNARDI et al.; 2008). É notório que a falta de cuidados no controle do processo fermentativo contribui para o aumento da diversidade microbiológica, favorecendo estirpes selvagens com baixa capacidade fermentativa.

### **2.3 Fatores Limitantes do Processo Fermentativo**

A hostilidade que caracteriza o ambiente fermentativo induz as linhagens de leveduras a desenvolverem resposta celular frente às condições adversas, tornando-as mais resilientes e adaptáveis metabolicamente. As células das leveduras devem ser tolerantes aos múltiplos estresses, mantendo a capacidade de multiplicação celular em condição anaeróbica. A pressão de seleção exercida pela adversidade ambiental contribui para a seleção de estirpes mais aptas a produção de etanol, podendo assim, ser indicadas como inóculo de partida nos vários ciclos consecutivos da fermentação (MUSSATO et al.; 2010).

Linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* comerciais e não comerciais apresentam uma correlação entre a condição limitante e a resistência das linhagens comerciais durante o processo fermentativo. A seleção de linhagens de leveduras mais hábeis para a produção de vinho (CARRASOCO et al.; 2001; ZUZUARREGUI; OLMO; 2004) é fundamental para o aumento de rendimento do processo fermentativo. Produtos da via

metabólica podem ser utilizados como critérios de seleção no processo de melhoramento das linhagens. Há correlação da produção de trealose e glicerol por *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a condição de estresse, e as presenças desses compostos podem ser traduzidas como indicador de tolerância a ambiente adverso (SALVATO; 2010). O bom rendimento fermentativo está associado ao controle eficiente da temperatura, contaminação bacteriana, pH, aeração, concentração de etanol e disponibilidade dos nutrientes (SOUZA; 2009).

### 2.3.1 Etanol

O etanol representa o critério tradicionalmente empregado na seleção de leveduras, visto que a tolerância a elevadas concentrações desse álcool é fundamental para o aumento dos níveis de produção (CARRASOCO et al.; 2001). A produção de etanol está relacionada com o volume do produto produzido durante o processo fermentativo.

O etanol é o maior inibidor da viabilidade celular da levedura, já que, em altas concentrações, ele altera a camada lipídica, reduzindo à atividade metabólica em resposta a diminuição do transporte de glicose, causando estresse hídrico (OLIVA- NETO; 2011; FERNANDES et al.; 2008; PROTTI et al.; 2007). O teor alcóolico próximo 11,1 % (v/v) compromete a viabilidade celular e valores acima de 14,5% (v/v) inibem completamente a produção de etanol (SILVA et al.; 2008). Pondera-se trabalhar com o teor alcóolico de 8°GL, uma vez que valores acima já comprometem a integridade celular da levedura (ALVES; 2004). O crescimento e a viabilidade celular não é alterada em concentração de etanol inferior a 26 g/L. Contudo, quando atinge 68,5 g/L no meio de fermentação, ocorre a inibição total do desenvolvimento celular (SOUZA; 2009).

Os efeitos tóxicos da concentração de etanol no meio também afetam outras espécies de leveduras. A diminuição da viabilidade celular da levedura *Saccharomyces pombe* é reduzida quando tratada com etanol a 30% (v/v) por uma hora. Além da diminuição da viabilidade celular, ocorrem o aumento da permeabilidade na membrana plasmática e a alteração da forma celular (CANETTA et al.; 2006).

### 2.3.2 Alta Concentração de Glicose (ACG)

A glicose é o ponto de partida da fermentação alcoólica, sendo um monossacarídeo de sabor adocicado com forma molecular  $C_6H_{12}O_6$ , podendo ser encontrada na natureza na forma livre ou combinada. No Brasil, a sacarose da cana-de-açúcar é o carboidrato mais utilizado para a produção de etanol. A sacarose é um dissacarídeo de forma molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$  formado pela associação de uma glicose com uma frutose (TORTORA, 2010).

Altas concentrações de glicose refletem negativamente na viabilidade celular da levedura, em virtude do aumento da pressão osmótica e, conseqüentemente, pela elevada produção de álcool que por sua vez, desestabiliza a membrana plasmática (LOPES; 2006). Fermentações com elevadas concentrações de açúcar comprometem a qualidade da cachaça, sendo assim importante a correção do °Brix do caldo-de-cana (MARQUES; SERRA; 2004). Concentrações de açúcar acima de 16°Brix implicam em fermentações incompletas e valores abaixo de 16°Brix induzem a queda no rendimento em álcool. A correção da concentração de açúcar quando o grau estiver acima de 16 °Brix evita o comprometimento metabólico das leveduras do processo (COUTO; SANROMÁN; 2005).

### 2.3.3 pH

O pH é um fator limitante na fermentação alcoólica por determinar a proliferação de bactérias que competem pelo substrato com as leveduras, diminuindo o volume e a qualidade do etanol produzido. O pH ideal para a produção de etanol deve estar entre 4,5 – 5,0 (SOUZA; 2011). Neste pH, ocorre a inibição das bactérias sem que haja comprometimento das leveduras, assegurando assim a produção.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* exige pH 4,5. Neste caso, a acidificação deverá ser realizada antes a inoculação (CARDOSO; 2006). A manutenção da integridade metabólica das leveduras é mantida com o mosto apresentando faixa de pH de 5,0 – 6,0. O pH do mosto deve ser corrigido antes do início da fermentação. A falta de correção do pH também favorece a formação de metabólicos secundários pelas leveduras, induzindo-as a ativarem outras rotas metabólicas. O pH abaixo de 4,0 desvia o metabolismo da levedura para a produção de álcoois superiores, enquanto pH acima de 5,0, produz ácido acético e furfural (SOUZA; 2011).



### **2.3.4 Temperatura**

A temperatura ideal do mosto para que a fermentação alcoólica ocorra encontra-se no intervalo de 25 a 30°C. No entanto, no processo fermentativo, há liberação de calor causando o aquecimento da dorna. Valores de temperatura no intervalo de 25 a 30°C induzem a queda na viabilidade do fermento, aumento da microbiota bacteriana e perdas de álcool por evaporação. As altas temperaturas interferem na viabilidade celular, ou seja, na capacidade de conversão do substrato em etanol, que pode ser agravada com o aumento das concentrações de etanol ou com o baixo pH do mosto (SILVA-FILHO *et al.*; 2005). Temperatura abaixo do ótimo também compromete a viabilidade da levedura, contribuindo para a queda na conversão do substrato em etanol (CARDOSO; 2006). O intervalo de temperatura entre 28 – 32 °C é ideal para a produção de etanol (CABRAL *et al.*; 2006; RIBEIRO; 2006; MORAES; 2001). É importante ressaltar, que as unidades produtoras de etanol na sua maioria não apresentam controle efetivo da temperatura, apresentando fermentações em torno de 38°C, o que diretamente influencia na atividade celular da levedura.

## **2.4 Biomonitoramento: Determinação das Linhagens Dominantes**

O processo fermentativo do mosto inicia com a multiplicação do fermento selecionado, podendo ser uma linhagem comercial ou oriunda da seleção durante o período de safra. A levedura é adicionada juntamente com o mosto a dorna. O processo é repetido várias vezes durante a safra. As condições de fermentação por batelada, tratamento da dorna para evitar contaminação por bactérias e o mosto não ser estéril, favorecem a constante sucessão microbiológica, resultando em linhagens dominantes no processo fermentativo. Apesar de resistirem ao processo, muitas das leveduras dominantes são ineficientes fermentativamente se comparadas ao inóculo inicial. Outras leveduras, em menor frequência na população, são resistentes ao processo, podendo assim, vir a serem utilizadas como inóculo de partida em substituição ao fermento introduzido inicialmente no processo.

### **2.4.1 Caracterização por Métodos Tradicionais**

O uso do meio de cultura como ferramenta para a seleção de linhagens de leveduras industriais através da macromorfologia da colônia permite identificar morfotipos com alta frequência durante a safra. Ao mesmo tempo, leveduras dominantes podem ser submetidas a testes fisiológicos, a fim de determinar os melhores desempenhos em condições limítrofes. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens podem ser caracterizadas quanto a resistência ao etanol, temperatura, pH, concentração de glicose e actiodione (REIS; 2011).

A resistência ao etanol, temperatura e acidez de linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram analisadas através do crescimento em meio de cultura YEPD - ágar associado à condição de estresse, permitindo identificar linhagens de leveduras *S. cerevisiae* para serem utilizadas na produção de álcool combustível (HARASHIMA et al.; 2012). Zhao et al.; (2011) analisaram a performance das cepas de *S. cerevisiae* frente aos fatores de estresse para a produção bioetanol, utilizando testes em placa de Petri com meio ágar -YEPD.

#### **2.4.2 Caracterização por Biologia Molecular**

As exigências do mercado induzem à utilização das técnicas moleculares em substituição as análises morfológicas e fisiológicas. A caracterização dos microrganismos é de suma importância, seja para identificar uma levedura contaminante ou para selecionar uma linhagem de levedura com características desejáveis a produção de etanol. As metodologias apoiadas no polimorfismo dos ácidos nucleicos são mais reproduzíveis frente aos métodos clássicos, que dependem do estado fisiológico das células (GUEROLA; 2006). Os métodos moleculares apresentam simplicidade metodológica, alta precisão e discriminação.

Diversas técnicas moleculares podem ser empregadas na discriminação da microbiota fermentativa, entre elas, as que utilizam a amplificação de sequências simples entre repetições do DNA (SILVA-FILHO et al.; 2005). A cariotipagem e o DNA mitocondrial são técnicas de biologia molecular mais utilizadas na discriminação e no monitoramento das linhagens dominantes durante o período de safra (AMORIM et al.; 2011). A PCR representa uma técnica importante para estudos genético-moleculares. A PCR multiplica regiões da molécula de DNA através da atividade da DNA polimerase, uma enzima termotolerante com a função de sintetizar regiões do DNA a partir de uma fita molde, utilizando dNTP e um par de

fragmento de DNA que são complementares a região alvo a ser amplificadas (*primers*). Os fragmentos de DNA obtidos podem ser visualizados após eletroforese em gel de agarose como uma banda (FERREIRA; 2002), formando um padrão muitas vezes específico para os indivíduos avaliados. O polimorfismo é caracterizado pela variação no tamanho e quantidade dos fragmentos amplificados (LATOUCHE et al.; 1997; SILVA-FILHO et al.; 2005).

Os padrões específicos do DNA *fingerprint* são gerados utilizando sequências iniciadoras que refletem o polimorfismo da variabilidade genômica entre indivíduos de espécie diferente ou da mesma espécie (LUCENA; 2004). A taxonomia das leveduras pode ser determinada através da amplificação da região do DNA que codifica para o RNA ribossômico. A amplificação de sequências simples entre repetições de DNA permite discriminar intraespecificamente linhagens de leveduras. A sucessão e a dominância das leveduras durante a produção de etanol foi avaliada a partir da caracterização da região repetitiva do DNA genômico com o microssatélite GTG<sub>5</sub> (SILVA-FILHO et al.; 2005; ANTONANGELO; 2012).

## **2.5 Seleção de Linhagens de Leveduras com Potencial Fermentativo**

O sinergismo das técnicas tradicionais e moleculares subsidia a prospecção de novas cepas de leveduras, portadoras de características desejáveis a produção de etanol. Essas linhagens, “personalizadas”, otimizam o processo fermentativo, uma vez que inibem leveduras com baixa taxa de conversão do substrato em etanol (selvagem). Na safra 2011/2012, aproximadamente 170 unidades produtoras de álcool utilizam linhagem selecionada, o que representa 70% do etanol produzido no Brasil (AMORIM et al.; 2011).

A produção de etanol no Brasil está relacionada com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, FT858L, CAT-1, BG1 e SA1 isoladas inicialmente nas dornas das usinas. As linhagens CAT-1 e PE-2 foram isoladas das Usinas Virgolino de Oliveira e Usina da Pedra, respectivamente, representando 70% das leveduras selecionadas para a produção de álcool no mercado interno. As “super linhagens” decorrem da alta persistência e dominância, mantendo a viabilidade celular frente aos ciclos fermentativos, como baixa floculação e produção de espumas somada à elevada taxa de conversão (AMORIM et al.; 2011; AMORIM; LOPES, 2013).

A linhagem Fermel foi desenvolvida para fermentações a base de melão, descende da PE-2, é uma levedura que suporta as oscilações do processo fermentativo, sem perder a capacidade de conversão. Um ponto alto dessa levedura é a dominância comparada às estirpes selvagens que depreciam a fermentação. Com a vigência do Protocolo Agroambiental do Setor Sucroenergético de 2007, as queimadas serão substituídas pela colheita manual ou mecanizada, aumentando assim a diversidade de microrganismos dentro do processo. Neste contexto, a Fermel, representa uma alternativa de ganhos de rendimento, atendendo as exigências do mercado (RPA NEWS: CANA & INDÚSTRIA; 2014).

No processo de geração de novas linhagens, ensaios fermentativos, utilizando as condições do ambiente industrial, demonstram a supremacia das linhagens selecionadas frente ao fermento industrial com aumento no rendimento em torno de 3% (AMORIM; BASSO; LOPES; 2009). Em termos práticos, o valor aparentemente baixo pode representar grande significância em litros de etanol produzido. Por exemplo, uma destilaria que produz um milhão de litros álcool/dia pode incrementar a produção em 30.000 litros a mais. Este cenário ratifica o uso de linhagens selecionadas frente ao fermento industrial, apesar do uso frequente de linhagens de laboratório, cervejarias, panificação e de outras origens para a produção de álcool (VICENTE; 2015).

As destilarias brasileiras apresentam uma vasta diversidade de leveduras para uso em fermentações industriais. Contudo, as linhagens isoladas de outros processos fermentativos, assim como de laboratório ou de uso doméstico, não sobrevivem diante das condições adversas encontradas na produção de etanol, sendo substituída pelas estirpes selvagens em aproximadamente um mês. (BASSO et al.; 2008). Leveduras selvagens podem contribuir com a diversidade genética, podendo ser utilizadas como ponto de partida para a seleção de características que favoreçam maior dominância e rendimento fermentativo. As fermentações para a produção de cachaça podem representar um reservatório de biótipos de leveduras com aplicabilidade ao processo industrial. A prospecção de leveduras no ambiente industrial deve ser o ponto de partida na busca de estirpes com potencial fermentativo (SILVA; 2009). No entanto, linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam fenótipo complexo, tornando um desafio à obtenção do organismo ideal para a produção de etanol de primeira geração (AMORIM et al.; 2011).

O monitoramento genético da microbiota fermentativa oriunda do mosto fermentado durante o período de safra revela a dominância existente entre as espécies e linhagens de

leveduras, contribuindo assim, para a caracterização de cepas de referência para a produção de etanol em escala industrial. O sequenciamento do DNA, associado às pesquisas com proteômica, metabolômica, expressão gênica, fisiologia e processo industrial, são imprescindíveis para o entendimento sobre a resiliência de linhagens de leveduras, permitindo assim, compreender como as linhagens sobrevivem mesmo quando submetidas a inúmeros ciclos fermentativos e as condições de estresse (ESTRUCH; 1993). A caracterização precisa das estirpes dominantes contribui para o uso como fermento iniciador, atendendo assim, as peculiaridades de cada processo.

### 3 METODOLOGIA

Neste estudo foi investigada a diversidade de linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* oriundas do processo fermentativo, com a finalidade de selecionar linhagens multirresistentes aos fatores limitantes da produção de etanol. As etapas experimentais foram conduzidas na Clínica de Diagnóstico Vegetal situada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

#### 3.1 Materiais Biológicos

A determinação da diversidade das leveduras no mosto fermentado foi realizada com amostras da Safra 2013/2014 do processo fermentativo coletadas durante os meses de dezembro, fevereiro e abril na destilaria da Usina Coruripe, Coruripe-AL. A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1), utilizada como controle na tipagem genética e nos testes de resistência fisiológicos, foi cedida da coleção de cultura da Universidade de São Paulo – USP. A cultura controle foi mantida a glicerol 15% a -80 °C.

#### 3.2 Seleção das Linhagens de Leveduras

O aumento do °Brix foi o parâmetro de pressão de seleção utilizado para a obtenção de linhagens de leveduras predominantes na fermentação alcoólica. Cada ensaio fermentativo foi composto por 20 fermentações em batelada com reciclo de células. A cada cinco fermentações ocorriam o aumento percentual do °Brix que foi inicialmente 15, e seguiu a sequência de incremento de 17, 18,5 finalizando com 22 %. A calibração do mosto de alimentação foi através de refratômetro analógico (marca Digit). Após 24 horas de fermentação, o volume fermentado foi transferido para tubo plástico de 15 mL, contendo aproximadamente 10g de massa celular e 200 mL de mosto estéril. A suspensão foi centrifugada por 3400 rpm durante 5 minutos (Centrifuga Clinica, modelo 80-2B – 15 mL). O centrifugado foi tratado com água e ácido clorídrico (pH 2 - 3,2) por uma hora. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas e lavadas em solução salina estéril 0,85 % para posteriormente serem ressuspensas em mosto de alimentação autoclavado constituído por

melaço, 3 g.L<sup>-1</sup> ácido láctico, 0,66 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético e 6,7 % (v/v) de etanol. O mosto foi autoclavado a 120 °C a 1atm por 20 minutos.

### 3.2.1 Plaqueamento

O plaqueamento foi realizado após a coleta das amostras na usina e ao término da fermentação de cada ciclo de seleção. Uma alíquota do fermentado foi dissolvida por diluição seriada até 10<sup>-3</sup> cel.mL<sup>-1</sup> e semeada com alça de Drygalsk em meio de cultura ágar YEPD (extrato de levedura a 1%, peptona de carne a 2%, dextrose a 2% e ágar-ágar a 2%) autoclavado e acrescido de amoxicilina. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C a 1atm por 20 minutos. As placas foram incubadas em duplicatas a 30 °C por 120 horas. Finalizada a incubação, as placas foram analisadas e os morfotipos foram selecionados conforme as características macroscópicas.

### 3.2.2 Isolamento, Purificação e Armazenamento das culturas de Leveduras

A macromorfologia foi o critério adotado para determinar a diversidade de leveduras, reduzindo assim, o material biológico submetido às análises moleculares e aos testes de resistência fisiológicos. Foram escolhidas as placas com até 100 colônias. Com auxílio de alça em níquel-cromo removeu parte da colônia, transferindo-a em seguida, para tubo de ensaio com 2 mL de solução salina 0,85 % estéril, a fim de obter concentração celular de 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> cel/mL. A determinação da concentração celular ocorreu por contagem de células em câmara de Neubauer através da seguinte expressão: ( $\Sigma$ 5 quadrantes) x (5x10<sup>4</sup>) x (diluição). O resultado foi expresso em número de células por mL.

Após a seleção das colônias, uma alíquota da suspensão celular foi plaqueada por semeadura com estrias em meio ágar YEPD suplementado com amoxicilina. As culturas foram incubadas a 30 °C por 120 horas. A purificação foi confirmada através da predominância do padrão do morfotipo previamente isolado.

Confirmada a pureza das culturas de leveduras, repiques das colônias foram realizados, a fim de obter massa celular para a formação do banco de culturas de coleção e

trabalho. As culturas de coleção foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL, contendo 800  $\mu$ L da cultura e 200  $\mu$ L de glicerol estéril, sendo mantidas em ultra-refrigeração a -80 °C. A coleção de trabalho foi mantida em tubos de ensaio 10x100 mm, contendo meio ágar YEPD inclinado e armazenados a -4 °C. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C a 1atm por 20 minutos. As culturas de trabalho e coleção foram mantidas em duplicatas.

Cada isolado foi identificado com um código constituído pela coleta seguido do número da colônia acrescido de I (inicial) para o isolado obtido no mosto da destilaria e F (final) para o isolado obtido após o ciclo de seleção no laboratório. O código foi utilizado para todas as análises.

### **3.3 Taxa Específica de Crescimento Máxima**

A taxa de crescimento foi determinada pelo teste turbidimétrico tendo a densidade óptica como parâmetro discriminatório. A velocidade de multiplicação das células foi determinada por espectrofotômetro (WPA/marca Analítica) com comprimento de onda 600nm, e leitura em absorbância segundo proposto por Hiss (2001). Para a obtenção de massa celular, foi realizada uma pré-fermentação utilizando para cada isolado dois tubos de ensaio 10x100mm com 10 mL de meio YEPD com 4% de dextrose em cada um. Em seguida, as culturas foram incubadas por 48 horas. Após a incubação, transferiu-se o volume fermentado para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio YEPD líquido estéril. Ao mesmo tempo, fez-se a leitura inicial (L0) com espectrofotômetro em absorbância com comprimento de onda 600nm. Em seguida, as culturas foram incubadas em agitador orbital (modelo MA832/marca Marconi) a 30 °C sob agitação de 120 rpm. A cada hora foram feitas coletas do cultivo e aferições do crescimento da cultura. Para a construção da curva de crescimento foram feitas nove coletas, a fim de determinar a fase exponencial. Os dados foram tabulados no programa Microsoft Office Excel versão 2015 (Microsoft Corporation), gerando um gráfico de curva de regressão linear e, a partir do cálculo da equação linear de primeiro grau ( $y=ax+b$ ), encontrou-se o  $\mu_{m\acute{a}x}$ .

### **3.4 Análise Molecular**



As colônias selecionadas foram submetidas às técnicas moleculares com a finalidade de obter o padrão genético e, por conseguinte, a sua predominância durante o processo fermentativo.

### **3.4.1 Extração do DNA**

O DNA foi extraído utilizando o protocolo modificado descrito por Doyle; Doyle (1987). Em microtubo de 2 mL adicionou-se 150 mg de massa celular. Em seguida, foi acrescentado 750µL de tampão CTAB 2% (Tris-HCl pH 8,0; EDTA 70 µM; NaCl 2M; PVP 2%; β-mercaptoetanol 0,2%, CTAB 2%; proteinase K 50µL) e 4 µL da enzima lisozima por amostra, incubando-as a 65°C por 30 minutos em banho-maria digital médio, marca nova técnica. Decorrido o tempo, resfriou-se a amostra e adicionou 750 µL de CIA (24:1 clorofórmio e álcool isoamílico). A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL, adicionando o mesmo volume de isopropanol gelado. Logo após, as amostras foram armazenadas a -20°C por 30 minutos. Transcorrido o tempo, centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 15 minutos, descartando a fase líquida. Em seguida, lavou-se o *pellet* com etanol 70% gelado, centrifugando a 11000 rpm por 5 minutos. Por fim, secou-se o *pellet* em temperatura ambiente para depois ressuspender o DNA em 30 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) com RNase. O DNA foi armazenado em freezer a -20°C.

### **3.4.2 Amplificação do DNA Nuclear**

O material genético alvo do genoma das leveduras foi amplificado por PCR, utilizando o Termociclador Rotor Gene-Q (QUIAGEN) e, visualizados, após eletroforese com o fluoróforo *Syber Green* com auxílio do sistema de fotodocumentação L-PIX (LOCCUS Biotecnologia).

#### **3.4.2.1 ITS 1 e 4**

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) das linhagens de leveduras selecionadas foi amplificada para avaliação do tamanho da sequência com os iniciadores ITS 1 e 4. O protocolo de PCR com volume reacional final de 25 µL foi constituído por 4 µL do DNA da colônia selecionada, 12,3 µL de água ultra pura estéril, 0,5 µM do iniciador ITS 1 e a mesma concentração para o iniciador ITS4, 5 µL de dNTP, 2,5 µM de tampão de PCR e 0,2 µL taq polimerase (SILVA-FILHO, 2005). A região ITS 1 e 4 foram amplificadas pela ciclagem a seguir: um ciclo de desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundo, anelamento a 52,5 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos, com extensão final a 72 °C por quatro minutos (SILVA-FILHO, 2005).

#### **3.4.2.2 Microsatélite GTG5**

O microsatélite GTGGTGGTGGTGGTG foi amplificado por PCR com volume reacional final de 25 µL conforme metodologia descrita por Silva-Filho (2005). Com volume reacional final de 25 µL, a sequência foi amplificada com 4 µL do DNA da colônia selecionada, 2,5 µL do tampão de PCR, 2,5 µL de BSA, 2,5 µL e 5 µL do iniciador, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 0,25 µL de taq polimerase. Para a obtenção do volume final foi utilizada água ultra pura estéril. O iniciador GTG<sub>5</sub> foi amplificado por PCR através da programação a seguir: um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 15 segundos a 94 °C, anelamento a 45 segundos a 55 °C, extensão a 90 segundos a 72 °C, com extensão final de seis minutos a 72 °C (SILVA-FILHO, 2005).

### **3.5 Eletroforese**

As sequências amplificadas pelo iniciador GTG<sub>5</sub> foram separadas por eletroforese em gel de agarose 2,0 % sob voltagem de 90 volts por 150 minutos em tampão TAE 1X (Tris acetato 40 mM e EDTA1 mM). Os produtos da amplificação das regiões ITS1 e 4 foram discriminados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, submetidos a 70 volts por 120 minutos em tampão TAE 1X. Os primers GTG<sub>5</sub> e ITS1 e 4 foram corados com *syber green* e visualizados em sistema de fotodocumentação modelo L-Pix ex, marca Loccus biotecnologia.

### 3.6 Testes de Resistência Fisiológicos: etanol, glicose, temperatura e pH.

As linhagens de leveduras selecionadas pela tipagem genética foram submetidas a testes de resistência fisiológicos, com a finalidade de determinar a resiliência das linhagens frente aos principais fatores limitantes do processo fermentativo. Para a execução dos testes de resistência foi utilizado o meio de cultura WLN composto por 4 g de extrato de levedura, 5 g triptona, 20 g dextrose, 0,55 g fosfato de potássio mono, 0,125 g sulfato de magnésio, 0,425 g cloreto de potássio, 0,125 g cloreto de cálcio, 0,0025 g cloreto de ferro, 0,0025 g sulfato de magnésio suplementado com 0,0220 g verde de bromocressol para o preparo de um litro de meio de cultura. Adicionado à solução nutritiva, acrescentou-se 20 g de ágar. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C a 1 atm por 20 minutos. As leveduras com as maiores taxas de crescimento foram selecionadas e dispostas em três grupos, sendo cada um composto por três isolados selecionados e a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* controle (CAT-1).









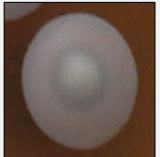

A resistência ao etanol, glicose, temperatura e pH foram determinadas conforme o protocolo modificado de Reis (2011). Uma alçada da colônia da levedura foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,85 % estéril. Em seguida, a cultura foi homogeneizada e a concentração celular ajustada para  $1 \times 10^8$  cel/mL em câmara de Neubauer. Após a calibração da concentração celular, uma alíquota de 5 µL da solução foi depositada de forma puntiforme sobre a superfície do meio de cultura WLN. Os isolados foram testados através de diluição seriada. Para a determinação da suscetibilidade ao etanol foram testadas concentrações de álcool absoluto nas proporções de 0 %, 11% e 22% (v/v), sendo as placas incubadas a 30 °C por quatro dias. Para a glicose, foram analisadas as concentrações de 100 e 250 g/L com incubação conforme citada anteriormente. A tolerância à temperatura foi determinada com a incubação dos isolados a 30 °C, 35 °C e 40 °C por quatro dias. Por fim, a resistência ao pH foi observada com o ajuste do meio de cultura para 1,0, 3,0 e 5,0 com incubação a 30 °C por sete dias. Todos os testes foram realizados em duplicata. Após a incubação, os pontos foram analisados e a resistência determinada através da média do crescimento da massa celular.

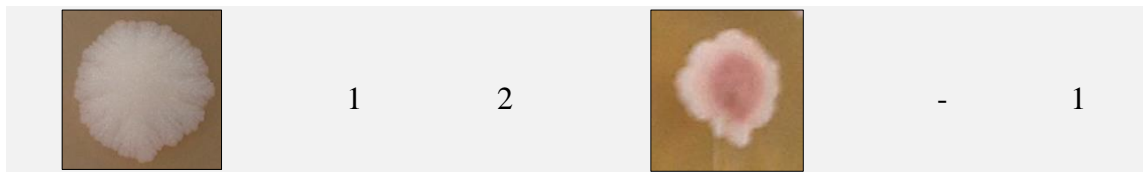
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade morfológica das leveduras isoladas antes e após de pressão de seleção

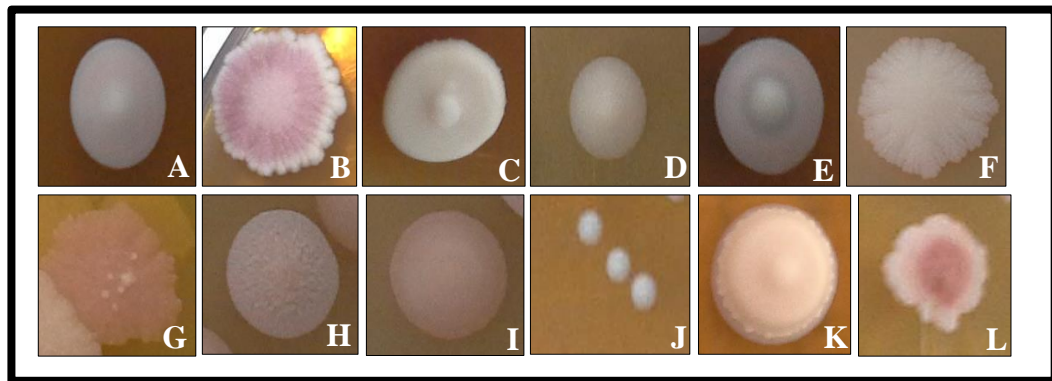
As leveduras isoladas inicialmente do mosto fermentado coletado na usina Coruripe em três momentos durante a safra 2013/2014 foram caracterizadas de acordo com a morfologia. Os morfotipos variaram em cor, borda, textura e tamanho, resultando em 16 linhagens de leveduras divididas em oito morfotipos (Figura 1). A sucessão das populações de leveduras durante os ciclos fermentativos ao longo da safra foi avaliada considerando o surgimento dos morfotipos. A diversidade do padrão de colônia das linhagens de leveduras entre os períodos de safra pode ser utilizada como parâmetro para o entendimento da variedade e predominância existente entre as linhagens de leveduras ao longo do processo fermentativo (Figura 2).

**Figura 1 – Ilustração do número de morfotipos obtidos a partir das linhagens de leveduras antes e após pressão de seleção.**

Morfotipo	Antes	Após	Morfotipo	Antes	Após
	4	2		1	-
	2	1		-	1
	2	2		-	1
	4	3		1	2
	1	1		-	1

**Figura 1 - continuação**

Fonte: Autor; 2016.

**Figura 2 - Ilustração dos morfotipos isolados durante as fermentações para obtenção de linhagens de leveduras em mosto fermentado de melaço.**

**Legenda:** As colônias A, C, D, E, J, K (morfotipo liso); B, F, G, H, I, L (morfotipo rugoso).

Fonte: Autor; 2016.

O início de safra é caracterizado por um único tipo de levedura que em grande número conduzirão a fermentação inicial. À medida que o processo avança ocorrem sucessões populacionais com redução no número de linhagens de leveduras em resposta as adaptações ao processo fermentativo. O padrão de diversidade dos morfotipos no início e meio de safra demonstra a dominância do morfotipo identificado no início do processo fermentativo. Provavelmente, a levedura iniciadora tolera as intempéries do processo fermentativo, mantendo elevada a frequência populacional. Tal fato pode ser explicado pela constante reposição do fermento selecionado ao longo da safra, assim como, pela integridade do processo e o eficiente controle microbiológico, o que explicaria o comportamento no início e metade da safra com menor número de morfotipo obtidos na destilaria. No final da safra, verificou-se um aumento no número de morfotipos possivelmente associado ao período de coleta da amostra, ou seja, fim de safra, muitas vezes caracterizado por um menor controle

dos fatores limitantes do processo em resposta aos longos dias de fermentação, induzindo contaminações por leveduras nativas (Tabela 1).

**Tabela 1 - Distribuição do número de morfotipos obtidos nos diferentes períodos de safra 2013/2014 antes e após pressão de seleção.**

<b>Período da Safra</b>	<b>Destilaria</b>	<b>Ensaio Fermentativo</b>
<b>Início</b>	2	3
<b>Meio</b>	2	6
<b>Fim</b>	4	2

Fonte: Autor; 2016.

O processo de seleção com aumento gradual do °Brix, utilizando como inóculo a população presente no mosto fermentado nos três períodos da safra, gerou 17 cepas de leveduras distribuídas em 11 morfotipos. O mesmo critério pode ser adotado para inferir sobre os efeitos da pressão de seleção *in vitro* na população original.

O comportamento do número de morfotipos após a pressão de seleção revela um aumento na diversidade das colônias nas coletas que amostravam a população do período do início e meio de safra. O potencial destas populações em gerar maior diversidade foi possível observar-se na amostragem do final de safra. A situação de pressão de seleção busca aplicar condições que mimetizem as condições químicas da dorna e novamente mostra a capacidade desta população em gerar diversidade. No entanto, a população já adaptada, final da safra, não sofre com a pressão de seleção que mimetiza as condições as quais elas já estão adaptadas, não havendo incremento na diversidade. A comparação dos resultados mostra que o período do meio de safra seria o melhor momento para amostragem. O período inicial, por ter uma alta concentração do inóculo, compromete a diversidade e inviabiliza a pressão de seleção por não ter um alto grau de polimorfismo a ser explorado.

No estudo foi adotado o padrão da textura e borda da colônia, discriminando as leveduras em rugosa ou lisa, visto que estas características são condicionantes na seleção de

leveduras para uso em fermentação alcoólica. A maior predominância de leveduras com morfotipo liso ocorreu no mosto fermentado coletado na destilaria, contabilizando 12 linhagens correspondendo 75 % entre os isolados obtidos antes a pressão de seleção. Após a seleção, observou-se 59 % de leveduras lisas isoladas após os ensaios fermentativos. Os padrões de colônia branca e rosa com textura e borda rugosa foram os de maior frequência entre os morfotipos rugosos com 27,27 % para cada, sendo a maior incidência do morfotipo de coloração branca após a pressão de seleção. As análises moleculares e os testes de resistência fisiológicos foram realizados em 26 das 33 linhagens de leveduras selecionadas (Tabela 2).

**Tabela 2 – Distribuição do número de linhagens de leveduras por período da safra antes e após os ensaios fermentativos com pressão de seleção.**

Período de Safra	Seleção		Total
	Antes	Depois	
<b>Início</b>	4	3	7
<b>Meio</b>	6	7	13
<b>Fim</b>	6	7	13
			<b>33</b>

Fonte: Autor; 2016.

O aumento do padrão de colônia rugosa ao longo da safra 2013/2014 foi verificado durante a distribuição dos morfotipos ao longo das coletas antes e também após a pressão de seleção. O aumento progressivo no número de morfotipos rugosos em relação ao liso após os ensaios em batelada pode ser atribuído às alterações morfológicas em virtude do parâmetro adotado para a obtenção de diversidade, visto que, o aumento do °Brix induz a deformações na membrana plasmática em virtude as altas concentrações de glicose e, conseguinte, de etanol no meio (LOPES, 2006). Vinte e duas das 33 colônias de leveduras selecionadas apresentaram textura lisa, correspondendo a 66,6 %. A maioria das leveduras rugosas foram obtidas após a pressão de seleção (Tabela 3).

**Tabela 3 - Linhagens de leveduras isoladas do processo fermentativo antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.**

Isolados	Textura da colônia
<b>C1(1I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C1(2I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C1(2.1I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C1(3I)</b>	<b>Rugosa</b>
C1(1F)**	Lisa
C1(2F)**	Lisa
C1(3F)	Lisa
<b>C2(1I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C2(1.1I)</b>	Lisa
<b>C2(2I)</b>	<b>Rugosa</b>
<b>C2(3I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C2(4I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C2(4.1I)</b>	<b>Rugosa</b>
C2(1F)	Rugosa
C2(2F)	Lisa
C2(3F)	Lisa
C2(3.1F)	Lisa
C2(4F)	Lisa
C2(5F)	Rugosa
C2(6F)	Rugosa
<b>C3(1I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C3(2I)**</b>	<b>Lisa</b>
<b>C3(3I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C3(3.1I)</b>	<b>Lisa</b>
<b>C3(4I)**</b>	<b>Lisa</b>
<b>C3(5I)</b>	<b>Rugosa</b>
C3(1F)**	Rugosa
C3(2F)**	Lisa
C3(3F)	Lisa
C3(4F)**	Lisa
C3(4.1F)	Rugosa
C3(5F)	Rugosa
C3(6F)	Rugosa
CAT-1*	Lisa

C1: coleta 1; C2: coleta 2; C3: coleta 3; \* Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* controle; \*\* Linhagem de Levedura contaminada por fungo filamentosos. Isolados com grifo obtidos na destilaria e sem grifo oriundos após o processo de seleção. Fonte: Autor; 2016.

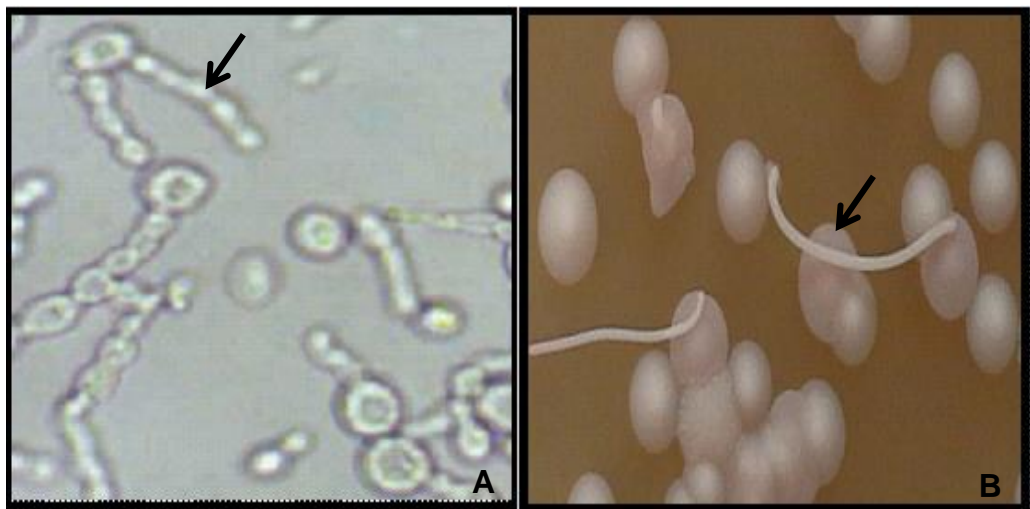
Outro fator que contribuí para a mudança do morfotipo é a elevação da temperatura durante os ensaios em batelada com aumento gradual do °Brix, visto que, oscilações acima do ótimo de crescimento induzem a modificações na textura da colônia, tornando-se rugosa.



Células de leveduras com textura rugosa tendem a formar aglomerados celulares em resposta ao não desprendimento dos brotos com a célula mãe, gerando perdas de rendimento fermentativo pela diminuição da superfície celular destinada ao transporte dos açúcares fermentescíveis (VIANA; 2015). Apesar das condições hostis do ensaio fermentativo para seleção de linhagens de leveduras, 22 isolados apresentaram o morfotipo liso, característica desejável ao processo fermentativo. Contudo, outros fatores devem ser melhor investigados, com a finalidade de uso como linhagem iniciadora para a produção de etanol em escala industrial.

No isolamento das leveduras do mosto fermentado oriundo do processo de seleção, foram verificadas projeções de massa celular sobre o meio de cultura ágar YEPD após o plaqueamento. A microscopia dos filamentos verificou aglomerados celulares em células típicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3).

**Figura 3 - Ilustração dos aglomerados celulares “pseudohifas” em microscopia óptica e em meio de cultivo ágar YEPD.**



Legenda: (A) pseudohifas em microscopia (seta); (B) pseudohifas em meio ágar YEPD (seta).

Fonte do autor; 2016.

A presença das “hifas gigantes” está relacionada a fermentações com estresse de nitrogênio (SILVA; CECCATO-ANTONINI; 2002) e elevadas concentrações de álcoois superiores. Na ausência de nitrogênio e presença de álcoois, há o dimorfismo com

crescimento filamentososo em *Saccharomyces cerevisiae* com invasividade do ágar (SUDBERY; CECCATO-ANTONINI; 2004).

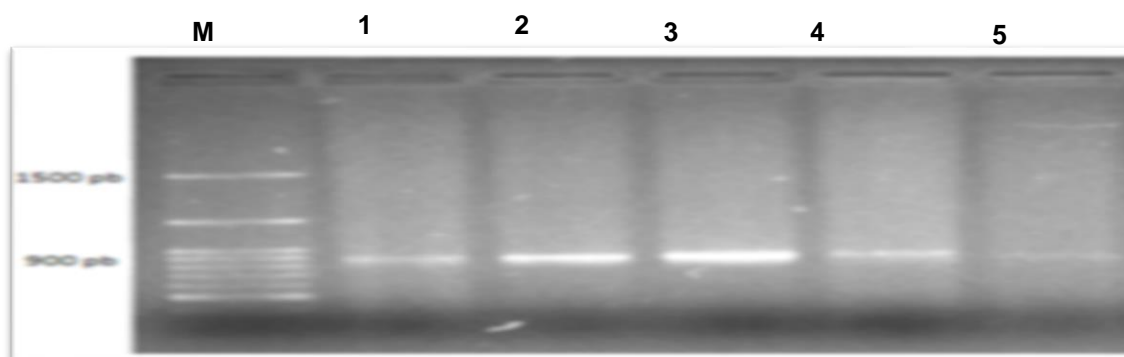
O mosto de melão de cana acrescido de açúcares solúveis podem ter induzido as linhagens ao crescimento filamentososo. O aumento gradual do °Brix induz a multiplicação celular ao mesmo tempo em que decaem os níveis de glicose, tornando o meio improdutivo. A baixa concentração de glicose no meio fermentativo contribui para o crescimento dimórfico (CULLEN; SPRAGUE JR; 2000). A proporcionalidade direta existente entre a concentração de açúcar e a produção de etanol pode ter conduzido as leveduras a metabolizarem esse produto como fonte de carbono em resposta a queda abrupta da glicose no meio (DICKISON; 1996).

## 4.2 Caracterização por Biologia Molecular

### 4.2.1 ITS 1 e 4

A análise do padrão eletroforético da amplificação das regiões que codifica para o RNA ribossomal das linhagens de leveduras obtidas no início de safra revelou apenas um perfil genético, inferindo se tratar de leveduras do gênero *Saccharomyces* (Figura 4). Os resultados obtidos são condizentes aos encontrados por Antonangelo (2012) que isolou 138 colônias de leveduras com comprimento de banda aproximadamente 800pb, indicando ser da espécie *S. cerevisiae*.

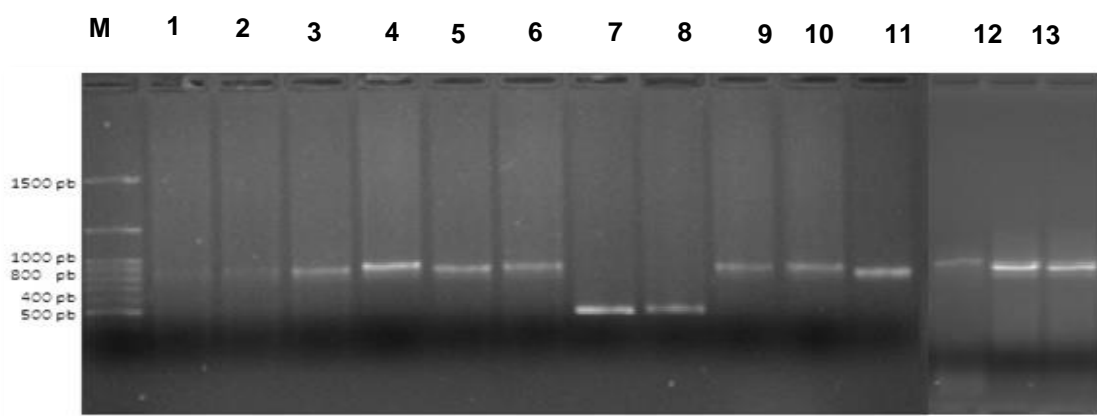
**Figura 4 - Ilustração da eletroforese em gel de agarose com o padrão de amplificação da região ITS do DNAr das linhagens de leveduras isoladas no início da safra.**



Legenda: (M) marcador molecular 100pb; Linhagens de leveduras (1) C1(1I); (2) C1(3I); (3) C1(2I); (4) C1(2.1I); (5) C1(3F). Gel de agarose de agarose 1,5%, submetidos a 70 volts por 120 minutos em tampão TAE 1X e corados com *syber green*. Fonte: Autor; 2016.

As ampliações com as leveduras isoladas no meio de safra apresentaram dois perfis genéticos baseados no tamanho do fragmento amplificado (Figura 5). Foi observado um padrão com fragmento com tamanho entre 800 a 1000pb e outro com tamanho entre 400 a 500pb. Os isolados de 1 a 6 e 9 a 14 apresentaram aproximadamente 800pb, indicando ser do gênero *Saccharomyces*. Os poços 7 e 8 correspondem a um gênero de levedura não-*Saccharomyces*, visto que apresentaram bandas com comprimento inferior ao esperado para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

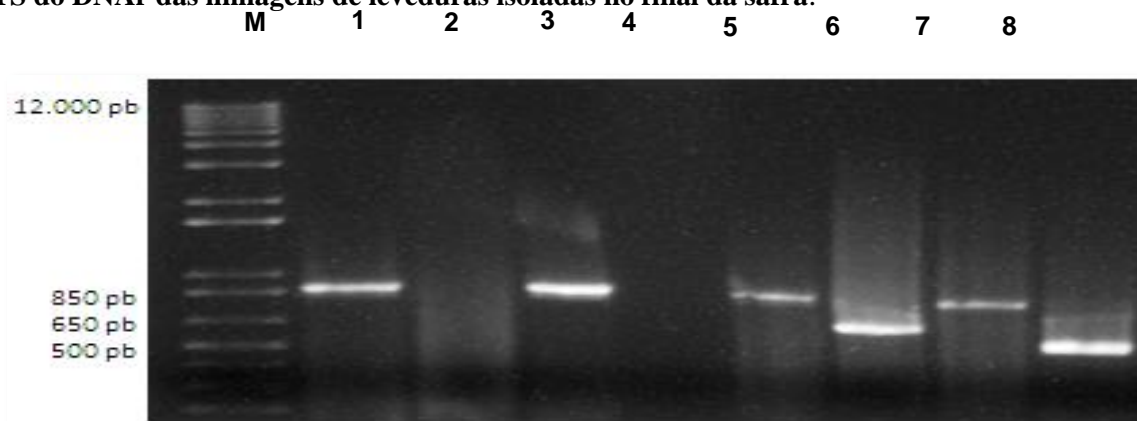
**Figura 5 - Ilustração da eletroforese em gel de agarose com o padrão de amplificação da região ITS do DNAr das linhagens de leveduras isoladas no meio da safra.**



Legenda: (M) marcador molecular 100pb; Linhagens de leveduras (1) C2(1I); (2) C2(1.1I); (3) C2(2I); (4) C2(3I); (5) C2(4I); (6) C2(4.1I); (7) C2(1F); (8) C2(2F); (9) C2(3F); (10) C2(3.1F); (11) C2(4F); (12) C2(5F); (13) C2(6F). Gel de agarose de agarose 1,5%, submetidos a 70 volts por 120 minutos em tampão TAE 1X e corados com *syber green*. Fonte: Autor; 2016.

Na coleta do final de safra, a maior diversidade de padrões de bandeamento foi verificada com três comprimentos de banda aproximadamente 850, 600 e 500pb (Figura 6). Os poços 1, 3, 5 e 7 apresentaram comprimento de banda compatível com o gênero *Saccharomyces*. Os padrões de amplificação das regiões ITS 1 e 4 dos isolados 6 e 8 não são compatíveis com a espécie *S. cerevisiae*. Nos poços 2 e 4 não foram verificados os padrões de amplificação para as regiões ITS analisadas.

**Figura 6 - Ilustração da eletroforese em gel de agarose com o padrão de amplificação da região ITS do DNAr das linhagens de leveduras isoladas no final da safra.**



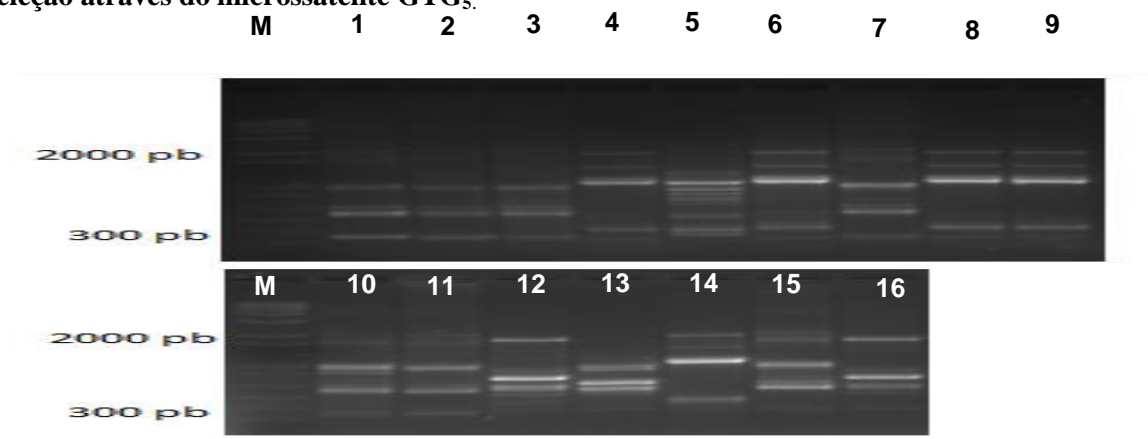
Legenda: (M) marcador molecular 100pb; Linhagens de leveduras (1) C3(1I); (2) C3(3I); (3) C3(3.1I); (4) C3(5I), (5) C3(3F); (6) C3(4.1F); (7) C3(5F); (8) C3(6F). Gel de agarose de agarose 1,5%, submetidos a 70 volts por 120 minutos em tampão TAE 1X e corados com *syber green*. Fonte: Autor; 2016.

A maior variabilidade de perfis no final da safra demonstra estreita relação com o período de coleta da amostra, visto que as condições do processo já não conservam as características essenciais para a predominância das leveduras do gênero *Saccharomyces*, contribuindo assim para a contaminação de leveduras não-*Saccharomyces*. A comparação dos fragmentos gerados das regiões ITS antes e após a pressão de seleção revelou baixa diversidade de levedura, indicando a dominância do gênero *Saccharomyces* ao longo do processo fermentativo.

#### 4.2.2 Microssatélite GTG<sub>5</sub>

A amplificação do DNA genômico com o microssatélite GTG<sub>5</sub> permitiu caracterizar as linhagens de leveduras em oito perfis genéticos, sendo quatro perfis encontrados nas linhagens isoladas durante a safra na destilaria e quatro perfis nas cepas oriundas após pressão de seleção. Os padrões genéticos para as linhagens isoladas do mosto fermentado durante a safra foram denominados de grupo A (1, 2, 3, 7, 10, 11, 13 e 15); grupo B (4, 6, 8, 9 e 14); grupo C (5); grupo D (12 e 16). A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* controle CAT-1 apresentou o padrão de bandejamento encontrado no grupo D (Figura 7).

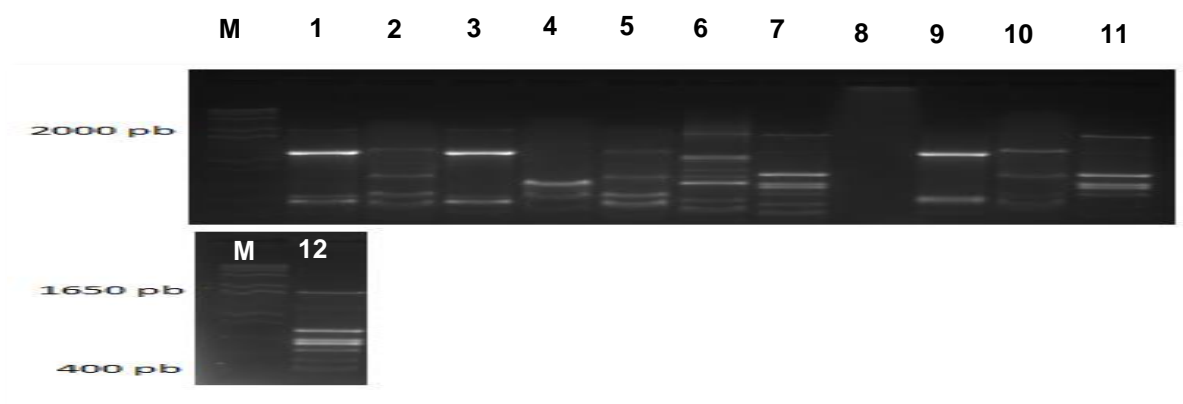
**Figura 7 - Ilustração com os padrões genéticos das linhagens de leveduras antes a pressão de seleção através do microssatélite  $GTG_5$ .**



Legenda: (M) marcador molecular 1kb *plus*; Linhagens de leveduras (1) C1(1I); (2) C1(2I); (3) C1(2.1I); (4) C1(3.1I); (5) C2(1I); (6) C2(1.1I); (7) C2(2I); (8) C2(3I); (9) C2(4I). Segundo gel (M) marcador molecular 1kb *plus*; (11) C2(4.1I); (12) C3(1I); (13) C3(3I); (14) C3(3.1I); (15) C3(5I); (16) CAT-1. Gel de agarose 2,0 % sob voltagem de 90 volts por 150 minutos em tampão TAE 1X (Tris acetato 40 mM e EDTA1 mM) e corados com *Syber green*. Fonte: Autor; 2016.

Nas leveduras obtidas após a pressão seleção sobre as diferentes populações dos mostos fermentados coletados durante a safra, foi possível discriminar quatro grupos genéticos. O isolado oito não gerou o padrão de amplificação para o marcador genético. As linhagens de leveduras oriundas após os ensaios em batelada foram agrupadas conforme o padrão de bandeamento eletroforético em gel de agarose, sendo o grupo E (1, 3 e 9); grupo F (2, 4, 5 e 10); grupo G (6); grupo H (7, 11 e 12) conforme verificado na figura 8.

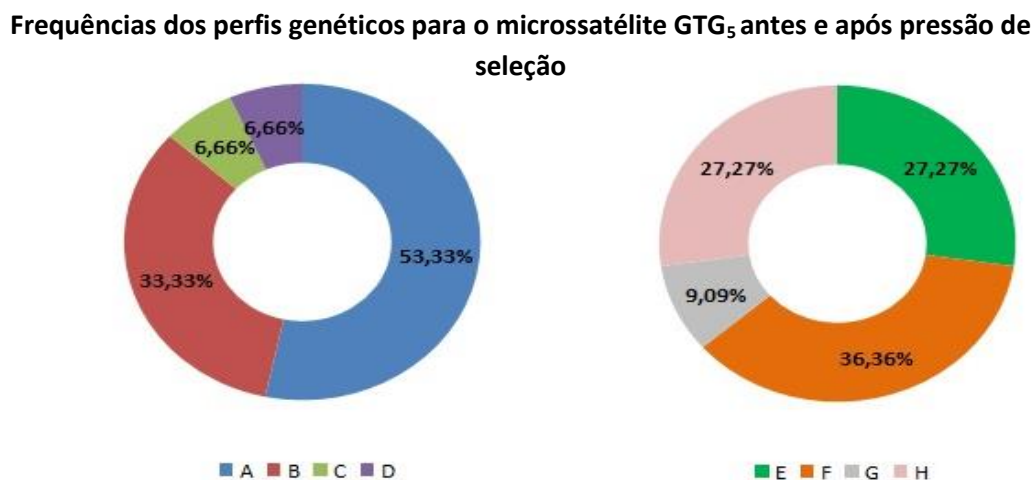
**Figura 8 - Ilustração com os padrões genéticos das linhagens de leveduras após a pressão de seleção através do microssatélite  $GTG_5$ .**



Legenda: (M) marcador molecular 1kb *plus*; Linhagens de leveduras (1) C1(3F); (2) C2(1F); (3) C2(2F); (4) C2(3F); (5) C2(3.1F); (6) C2(4F); (7) C2(5F); (8) C2(6F); (9) C3(3F), (10) C3(4.1F); (11) C3(5F). Segundo gel (M) marcador molecular 1kb *plus*; (12) C3(6F). Gel de agarose 2,0 % sob voltagem de 90 volts por 150 minutos em tampão TAE 1X (Tris acetato 40 mM e EDTA1 mM) e corados com *Syber green*. Fonte: Autor; 2016.

As frequências dos grupos genéticos com o microssatélite  $GTG_5$  variaram entre as populações de leveduras durante a safra 2013/2014 (Figura 9). Dos quatro grupos genéticos obtidos através do padrão de bandamento de linhagens provenientes da destilaria, o grupo A apresentou a maior frequência, com 53,33 %, seguido do grupo B com 33,33 %. Os menores valores foram encontrados nos grupos C e D com 6,66 % de frequência para cada grupo. O estudo da diversidade de leveduras industriais por PCR-*fingerprint* vem sendo largamente utilizado como metodologia para o monitoramento de leveduras ao longo da safra (SILVA-FILHO et al.; 2005; BASÍLIO et al.; 2008).

**Figura 9 - Gráfico com as frequências dos perfis genéticos para o microssatélite antes e após a pressão de seleção.**

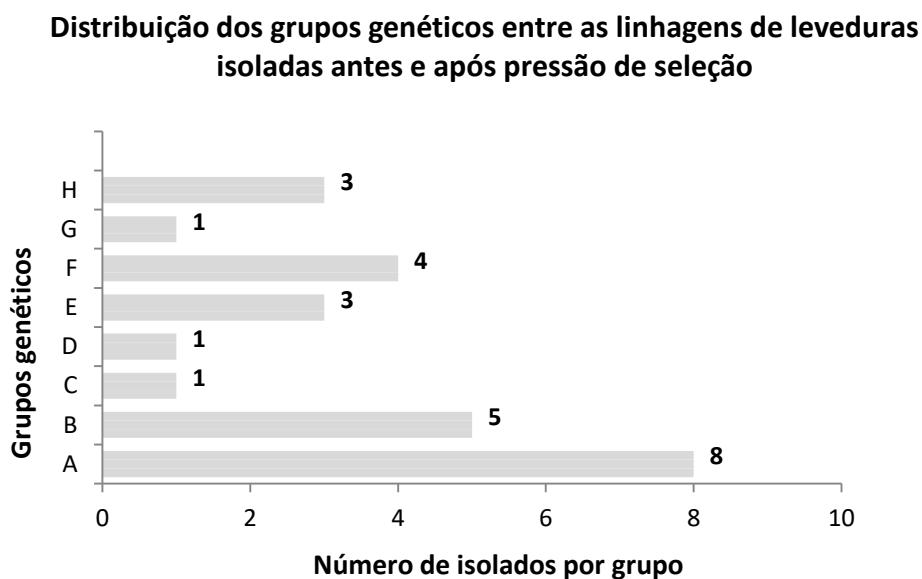


Fonte: Autor; 2016.

Dos quatro padrões genéticos gerados pela amplificação com microssatélite GTG<sub>5</sub> após pressão de seleção, apenas o grupo F exibiu maior frequência com 36,36%. Os grupos E e H apresentaram 27,27% cada, enquanto o grupo G foi o de menor frequência com 9,09%. A diversidade de leveduras isoladas de alambique para a produção de cachaça foi verificada a partir das técnicas ISSR com o microssatélite GTG<sub>5</sub>, e por RFLPmtDNA discriminando 32 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A técnica ISSR discriminou 22 perfis, enquanto a RFLP apresentou sete tipos (GONÇALVES et al.; 2009). A análise comparativa do número de grupos genéticos obtidos na destilaria e após as fermentações em bateladas indicou o grupo A como o de maior valoração com oito isolados, seguidos dos grupos B e F com cinco e quatro isolados, respectivamente. Os grupos E e H apresentaram três isolados cada. Os menores valores foram encontrados para os grupos C, D e G com um isolado cada. (Figura 10).

A caracterização das linhagens de leveduras pelo sistema clássico permitiu discriminar 12 morfotipos de colônias e oito grupos genéticos. O bandeamento gerado pelo microssatélite GTG<sub>5</sub> foi definitivo na discriminação das linhagens de leveduras através do padrão *fingerprint* esperado para o marcador. Os resultados obtidos entre as técnicas tradicionais e moleculares ratificam a importância do uso sinérgico entre elas, a fim de obter resultados mais acertados e aplicáveis ao setor sucroenergético.

**Figura 10 - Gráfico com a distribuição dos grupos genéticos das linhagens de leveduras obtidas após a pressão de seleção.**



Fonte: Autor; 2016.

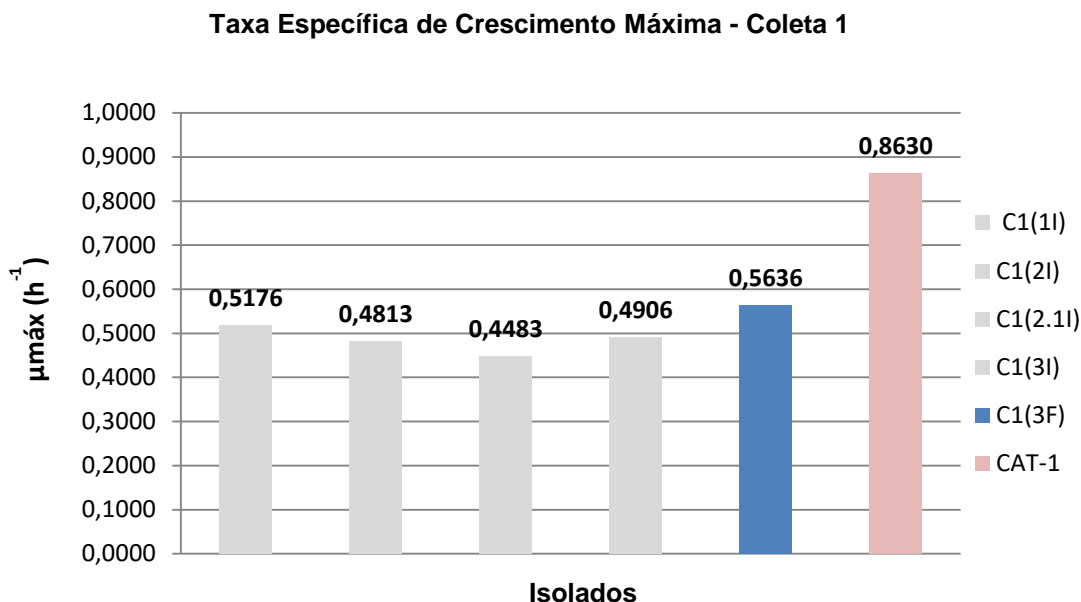
### 4.3 Avaliação da Taxa de Crescimento Específico

A avaliação da taxa de crescimento específico foi realizada com as 26 linhagens de leveduras, sendo 14 cepas obtidas nas dornas na destilaria e 12 após os ensaios com fermentações em sequência com aumento do °Brix. A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 apresentou o melhor desempenho com  $0,8630 \text{ h}^{-1}$ . Os isolados C1(1I) e C1(3F) apresentaram os maiores valores do  $\mu_{\text{Máx}}$  com  $0,5176 \text{ h}^{-1}$  e  $0,5636 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Figura 11). A superioridade do controle positivo decorre do estudo intensificado dessa linhagem como modelo de fermento industrial para a produção de etanol (AMORIM; LOPES; 2013). É comprovada a capacidade fermentativa de estirpes de leveduras selvagens em mosto de cana-de-açúcar com fonte de carboidratos fermentescíveis (BATISTOTE et al.; 2010).

O maior valor do isolado C1(3F) demonstra a eficiência da linhagem em suportar o estresse das bateladas sequenciais, associadas aos fatores limitantes adotados durante o processo de seleção. Os resultados obtidos nesse estudo ratificam a importância de investigar leveduras selvagens oriundas do processo fermentativo.



**Figura 11 - Gráfico com as comparações dos valores do  $\mu_{\text{Máx}}$  das linhagens de leveduras isoladas da coleta um, antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.**

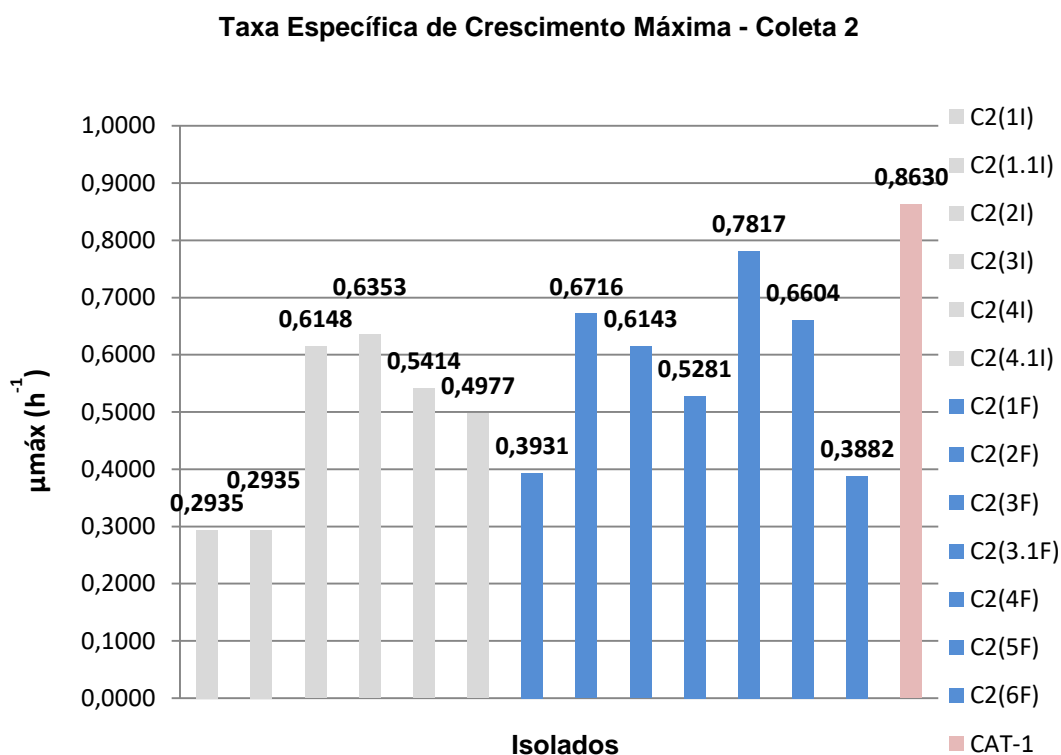


Fonte: Autor; 2016.

Na avaliação das linhagens obtidas no meio da safra antes e depois da seleção é possível verificar uma maior variação nos valores observados (Figura 12). Observa-se que o processo seletivo aumenta a média de  $\mu_{\text{Máx}}$  da população original.

Analisando os picos do  $\mu_{\text{Máx}}$  verificamos que os isolados C2(3I) e C2(4F) apresentaram os maiores valores, respectivamente,  $0,6353 \text{ h}^{-1}$  e  $0,7817 \text{ h}^{-1}$ . Diferentemente dos isolados C1(1I), C2(1.1I) e C2(6F) com  $0,2935 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,2935 \text{ h}^{-1}$  e  $0,3882 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. As maiores taxas do  $\mu_{\text{Máx}}$  foram dos isolados obtidos após a pressão de seleção, o que ratifica a necessidade de um estudo mais detalhado sobre as características fermentativas dessas linhagens. Os valores encontrados quando plotados geram uma curva representativa do padrão de crescimento dos microrganismos, permitindo usar os maiores picos para obter o  $\mu_{\text{Máx}}$  (HISS, 2001).

**Figura 12 - Gráfico com as comparações dos valores de  $\mu_{\text{Máx}}$  das linhagens de leveduras isoladas da coleta dois, antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.**



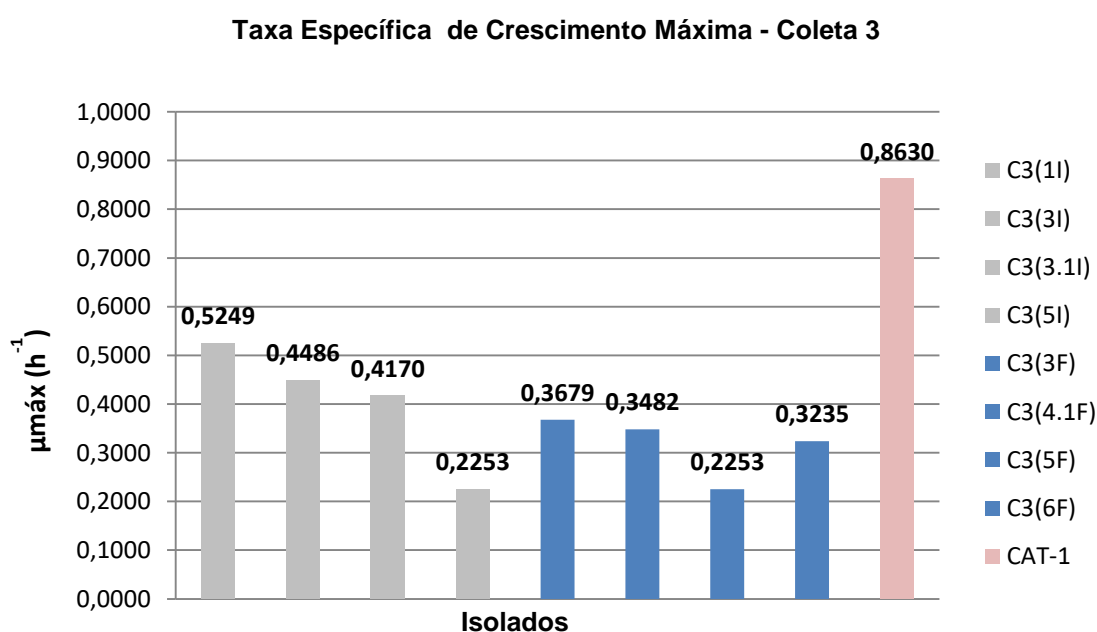
Fonte: Autor; 2016.

Mantendo o padrão de desempenho encontrado no início da safra, a linhagem controle CAT-1 apresentou taxa de crescimento de 0,8630 superior a todas as linhagens testadas. Contudo, é importante ressaltar a performance do isolado C2(4F) com valor aproximado ao registrado pela linhagem controle. Apesar de preliminar, o isolado C2(4F) deve ser melhor estudado, visto que o mesmo apresentou comportamento diferenciado frente aos 26 isolados testados nas mesmas condições. Na comparação do  $\mu_{\text{Máx}}$  das linhagens comerciais CAT-1, PE-2 e BG-1 a levedura CAT-1 foi classificada como levedura rápida em virtude da alta capacidade de conversão do substrato em etanol e a rapidez de multiplicação celular. A levedura CAT-1 tem sempre mostrado melhor desempenho que as leveduras selvagens (TONIATO; 2013).

A avaliação do  $\mu_{\text{Máx}}$  das oito linhagens de leveduras isoladas durante o processo de pré e pós-fermentação do inóculo obtido no final de safra demonstrou que os isolados oriundos antes da pressão de seleção apresentaram maiores valores se comparados as

linhagens obtidas após o experimento (Figura 13). O comportamento atípico em relação as coletas 1 e 2 pode estar relacionado ao período da coleta, ou seja, fim de safra. Provavelmente, durante a safra as leveduras mais aptas aumentam suas frequências populacionais o que reflete na sua dominância frente a outras linhagens.

**Figura 13 - Gráfico com as comparações dos valores de  $\mu_{M\acute{a}x}$  das linhagens de leveduras isoladas da coleta três antes e após pressão de seleção com aumento gradual do °Brix.**



Fonte: Autor; 2016.

A relação entre o  $\mu_{M\acute{a}x}$  e o  $R^2$  das 26 linhagens de leveduras caracterizadas por parâmetros de cinética de fermentação estão apresentadas a seguir (Tabela 4). O valor do  $\mu_{M\acute{a}x}$  foi o parâmetro empregado para a seleção das linhagens submetidas aos testes de resistência fisiológicos, resultando em nove isolados. A CAT-1 foi à linhagem controle para referência nos testes com fatores de estresse. O isolado C2(4F) apresentou a maior taxa de  $\mu_{M\acute{a}x}$  entre as linhagens selecionadas para o teste. Esse resultado demonstra a necessidade de averiguar as linhagens pormenorizadamente, a fim, de selecionar cepas com características que atendam as particularidades de cada processo fermentativo. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens exigem estudo amplo, visto que são linhagens com características complexas para o uso biotecnológico (AMORIM; 2011).

**Tabela 4 - Relação do  $\mu_{M\acute{a}x}$  e  $R^2$  das linhagens isoladas durante a seleção de leveduras.**

<b>Isolados</b>	<b><math>\mu_{M\acute{a}x}</math></b>	<b><math>R^2</math></b>
C1(1I)	0,5176	0,9900
C1(2I)	0,4813	0,9926
C1(2.1I)	0,4483	0,9911
C1(3I)	0,4906	0,9918
C1(3F)	0,5636	0,9892
C2(1I)	0,2935	0,9965
C2(1.1I)	0,2935	0,9970
C2(2I)	0,6148	0,9963
C2(3I)	0,6353	0,9930
C2(4I)	0,5414	0,9910
C2(4.1I)	0,4977	0,9689
C2(1F)	0,3931	0,9812
C2(2F)	0,6716	0,9953
C2(3F)	0,6143	0,9980
C2(3.1F)	0,5281	0,9996
C2(4F)	0,7817	0,9972
C2(5F)	0,6604	0,9923
C2(6F)	0,3882	0,9868
C3(1I)	0,5249	0,9945
C3(3I)	0,4486	0,9942
C3(3.1I)	0,4170	0,9965
C3(5I)	0,2253	0,9660
C3(3F)	0,3679	0,9887
C3(4.1F)	0,3482	0,9868
C3(5F)	0,2253	0,9869
C3(6F)	0,3235	0,9651
CAT-1*	0,8630	0,9995

C1: coleta 1. C2: coleta 2; C3: coleta 3; \* Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* controle. Fonte: Autor; 2016.

#### **4.4 Testes de Resistência Fisiológicos**

##### **4.4.1 Etanol**

A resistência ou suscetibilidade ao etanol foram determinadas pelo aparecimento de colônias individuais ou conjugadas no meio de cultura WLN, sendo descartado o crescimento de massa celular amorfa ou residual. Para uma melhor análise do comportamento tolerante

das linhagens de leveduras, foram utilizadas as maiores diluições para todos os parâmetros testados. Os isolados avaliados foram os que melhor apresentaram taxa de crescimento máximo específico. A CAT-1 levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como cepa de referência em todos os testes diante do largo uso em fermentações alcólicas.

A análise foi conduzida separadamente nos três grupos sendo a linhagem CAT-1 como controle. Observa-se que nos três experimentos a CAT-1 apresentou valores de contagens de células similares indicando consistência do ensaio. A CAT-1 não desenvolveu nas maiores concentração de etanol, apresentando uma redução de 70% no crescimento ao crescer em 11% de etanol quando comparado com o cultivo com 0% de etanol. O isolado C2(3I) do grupo G1 foi o de melhor desempenho com média de duas colônias a 11% de etanol. No grupo G2 o isolado C2(4I) apresentou as maiores médias com 9,5, 7,5 e 1,0, respectivamente, 0%, 11% e 22%. O grupo G3 foi representado pelo isolado C1(3F) com crescimento a 11% de etanol com média de 4,5 colônias. (Tabela 5).

**Tabela 5 - Médias do número de colônias nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  células/crescidas após cultivo em meio WLN com etanol nas concentrações 0%, 11% e 22%.**

Grupos			$10^{-3}$	$10^{-4}$
G1	0%	C2(3I)	7,0	3,5
		C2(3F)	-	-
		C2(3.1F)	3,0	-
		CAT-1	-	<b>11,0</b>
	11%	C2(3I)	3,5	2,0
		C2(3F)	3,5	1,5
		C2(3.1F)	2,0	-
		CAT-1	13,5	3,0
22%	C2(3I)	-	1,0	
	C2(3F)	-	1,0	

Tabela 5 – Continuação.

		C2(3.1F)	-	-
		CAT-1	-	-
G2	0%	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	9,5
		C2(6F)	4,0	2,0
		CAT-1	-	<b>13,3</b>
		C2(4F)	15,0	3,25
	11 %	C2(4I)	-	7,5
		C2(6F)	0,75	-
		CAT-1	<b>12,5</b>	<b>3,25</b>
		C2(4F)	3,5	1,0
	22%	C2(4I)	3,0	1,0
		C2(6F)	-	-
		CAT-1	<b>0,5</b>	-
G3	0%	C3(5I)	-	-
		C3(6F)	7,5	-
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	-	<b>15,0</b>
	11 %	C3(5I)	1,0	-
		C3(6F)	0,5	-
		C1(3F)	6,0	4,5
		CAT-1	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>
	22%	C3(5I)	0,5	-
		C3(6F)	-	-
		C1(3F)	7,5	3,5
		CAT-1	-	-

Fonte: Autor; 2016.

A detecção de linhagens de leveduras resistentes ao etanol é de suma importância, visto que a tolerância às altas concentrações desse álcool representa uma característica determinante para o aumento do volume de produção. Harashima et al.; (2012) analisaram a tolerância ao etanol nas concentrações 10 %, 20 % e 25 % de etanol em meio YPD líquido com incubação a 30 °C, utilizando como parâmetro para avaliação do crescimento celular o valor de absorvância a 600 nm. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram incubadas e a multiplicação celular avaliada, a fim de obter a resiliência ao etanol.

#### 4.4.2 Glicose

A análise foi conduzida separadamente nos três grupos sendo a linhagem CAT-1 como controle. Observa-se que nos três experimentos a CAT-1 apresentou valores de contagens de células similares indicando consistência do ensaio. Seguindo o comportamento verificado para o etanol, a levedura CAT-1 foi a que apresentou os melhores resultados com destaque para a concentração de 100 g/L. No grupo G1, a linhagem C2(3I) apresentou as maiores médias para as duas concentrações testadas. No grupo G3, o isolado C3(6F) foi o único com crescimento a 100 g/L e 200 g/L de glicose. (Tabela 6).

O incremento de glicose através de fermentações com alto °Brix é determinante para o incremento na produção, visto que esta condição está intimamente relacionada ao volume de álcool produzido. Sendo assim, bioprospectar leveduras com aptidão em suportar altos níveis de glicose sem perder a capacidade fermentativa é condicionante para otimização do processo fermentativo, reduzindo o tempo de fermentação, assim como o uso das dornas.

**Tabela 6 - Médias do número de colônias nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  crescidas após cultivo em meio WLN com glicose nas concentrações 100g/L e 200 g/L.**

Grupos			$10^{-3}$	$10^{-4}$
G1	100 g/L	C2(3I)	9,5	6,5
		C2(3F)	-	-
		C2(3.1F)	6,0	1,0
		CAT-1	<b>20,0</b>	<b>5,0</b>
	200g/L	C2(3I)	9,0	6,0
		C2(3F)	-	-
		C2(3.1F)	1,5	2,0
		CAT-1	<b>22,0</b>	<b>7,5</b>
G2	100 g/L	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	-
		C2(6F)	7,0	4,0
		CAT-1	<b>26,5</b>	<b>7,0</b>
	200g/L	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	-
		C2(6F)	8,0	4,0

**Tabela 6 – Continuação.**

		CAT-1	21,0	2,0
G3	100 g/L	C3(5I)	-	-
		C3(6F)	2,0	-
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	<b>24,0</b>	<b>8,0</b>
	200g/L	C3(5I)	-	-
		C3(6F)	2,5	1,0
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	<b>16,0</b>	<b>5,5</b>

Fonte: Autor; 2016.

Reis (2011) detectou a resistência de seis linhagens de leveduras a 500 g/L de glicose em meio WLN. Todas as leveduras discriminadas apresentavam morfologia rugosa. Os resultados apresentados pela autora supracitada estão em concordância aos apresentados neste estudo. Cerqueira (2013) verificou a tolerância da linhagem CAT-1 frente à pressão osmótica proveniente da elevada concentração de glicose.

#### 4.4.3 Temperatura

A análise foi conduzida separadamente nos três grupos sendo a linhagem CAT-1 como controle. Observa-se que nos três experimentos a CAT apresentou valores de contagens de células similares indicando consistência do ensaio. Seguindo o comportamento verificado para o etanol e glicose, a levedura CAT-1 foi a que apresentou os melhores resultados. Os isolados C2(3I), C2(6F) e C3(6F), respectivamente, grupo G1, G2 e G3 apresentaram termotolerância com crescimento a 30 °C, 35 °C e 40 °C. (Tabela 7).



Tabela 7 - Médias do número de colônias nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  crescidas após cultivo em meio WLN mantidos a 30°C, 35°C e 40°C.

Grupos			$10^{-3}$	$10^{-4}$
G1	30°C	C2(3I)	11,5	5,0
		C2(3F)	-	-
		C2(3.1F)	5,0	2,5
		CAT-1	<b>21,0</b>	<b>4,5</b>
	35°C	C2(3I)	3,5	6,5
		C2(3F)	-	-
		C2(3.1F)	5,5	1,5
		CAT-1	<b>23,0</b>	<b>2,5</b>
40°C	C2(3I)	12,0	2,5	
	C2(3F)	-	-	
	C2(3.1F)	5,5	4,5	
	CAT-1	<b>17,0</b>	<b>4,0</b>	
G2	30°C	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	-
		C2(6F)	11,0	1,5
		CAT-1	<b>20,0</b>	<b>6,5</b>
	35°C	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	-
		C2(6F)	8,0	2,0
		CAT-1	<b>20,0</b>	<b>6,0</b>
	40°C	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	-
		C2(6F)	6,5	1,5
		CAT-1	<b>14,0</b>	<b>4,0</b>
G3	30°C	C3(5I)	-	-
		C3(6F)	1,5	13,0
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	<b>21,0</b>	<b>5,5</b>
	35°C	C3(5I)	-	-
		C3(6F)	3,5	3,5
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	<b>26,5</b>	<b>4,5</b>
	40°C	C3(5I)	-	-
		C3(6F)	2,5	3,5
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	<b>18,0</b>	<b>3,0</b>

Fonte: Autor; 2016.

Reis (2011) testou a resistência de 22 linhagens de leveduras quanto à temperatura, variando entre 30° C e 42 °C. Os melhores resultados ocorreram abaixo de 42 °C conforme verificado no presente trabalho. Zhao et al., (2011) analisou a resistência à temperatura com crescimento em placa de petri em meio ágar YPD. A resiliência foi determinada através da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. A metodologia utilizada foi semelhante à adotada nesta pesquisa. Contudo os parâmetros utilizados para análise do crescimento celular diferiram, porém sem comprometer o resultado final.

A presença de linhagens de leveduras termotolerantes contribui para o aumento no volume de etanol produzido, visto que a elevação da temperatura induz a contaminação bacteriana que compete pelo substrato com a levedura. Neste sentido, leveduras resistentes ao etanol com alta estabilidade fermentativa asseguram o processo, uma vez que mantém a capacidade de conversão do substrato açucarado. Outro ponto é o controle ineficiente da temperatura ao longo do processo, induzindo perdas por evaporação e alterações na membrana plasmática em resposta a toxicidade ao etanol.

#### **4.4.4 pH**

A análise foi conduzida separadamente nos três grupos, sendo a linhagem CAT-1 como controle. O desenvolvimento de colônias em meio WLN não foi verificado para os isolados testados como para a linhagem de referência CAT-1 para o pH 1,0. Os isolados C2(3F), C2(3I) e C3(5I) apresentaram melhores médias a 3,0, 5,0 e 5,0, respectivamente. (Tabela 8). A linhagem CAT-1 apresentou padrão de comportamento semelhante aos encontrados para os demais parâmetros analisados.

O pH é um fator limitante do processo fermentativo, uma vez que ele interfere no metabolismo da levedura, reduzindo a capacidade de conversão da glicose em etanol, ao mesmo tempo em que leveduras mais tolerantes ao pH mais ácido são desejáveis, visto que o tratamento para sanitização do fermento é feito com ácido clorídrico ou sulfúrico. Os resultados encontrados em Reis (2011) corroboram aos verificados no presente estudo, com ausência de crescimento celular a pH 1,0. À medida que ocorreu a elevação do pH, as linhagens se desenvolveram conforme esperado.

**Tabela 8 - Médias do número de colônias nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  crescidas após cultivo em meio WLN com pH 1,0, 3,0 e 5,0.**

Grupos			$10^{-3}$	$10^{-4}$
G1	1,0	C2(3I)	-	-
		C2(3F)	-	-
		C2(3.1F)	-	-
		CAT-1	-	-
	3,0	C2(3I)	3,5	-
		C2(3F)	25,5	5,5
		C2(3.1F)	1,0	-
		CAT-1	<b>6,0</b>	<b>0,75</b>
5,0	C2(3I)	16,75	3,75	
	C2(3F)	-	3,1	
	C2(3.1F)	9,75	2,33	
	CAT-1	-	<b>22,25</b>	
G2	1,0	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	-	-
		C2(6F)	-	-
		CAT-1	-	-
	3,0	C2(4F)	-	-
		C2(4I)	0,5	-
		C2(6F)	-	-
		CAT-1	-	-
	5,0	C2(4F)	-	16,0
		C2(4I)	49	11,75
		C2(6F)	16,25	4,25
		CAT-1	-	<b>17,25</b>
G3	1,0	C3(5I)	0,5	-
		C3(6F)	-	-
		C1(3F)	-	-
		CAT-1	-	-
	3,0	C3(5I)	3,0	5,25
		C3(6F)	2,9	0,25
		C1(3F)	26,25	4,0
		CAT-1	<b>8,0</b>	<b>0,75</b>
	5,0	C3(5I)	-	38
		C3(6F)	5,0	5,75
		C1(3F)	-	14,5
		CAT-1	-	<b>12,75</b>

Fonte: Autor; 2016.

O quadro 1 apresenta os melhores desempenhos quanto ao crescimento resiliente ao etanol, glicose, temperatura e pH dos isolados obtidos antes e após pressão de seleção. O

isolado C2(3I) apresentou os melhores resultados obtidos quanto ao crescimento das linhagens de leveduras isoladas antes e após pressão de seleção frente aos parâmetros temperatura, etanol, pH e glicose. As linhagens com padrão de colônia rugosa C2(6F) e C3(6F) apresentaram desempenho positivo para a glicose e temperatura. A linhagem padrão CAT-1 obteve o melhor desenvolvimento frente a todos os parâmetros testados e suas variações. A alta performance da linhagem CAT-1 está intimamente associada a habilidade de tolerar condições limítrofes durante o processo fermentativo, fazendo desta estirpe modelo de microrganismo para a produção de etanol em escala industrial.

A análise dos resultados obtidos revela a importância de melhor investigar linhagens de leveduras portadoras de multirresistências para a produção de etanol, visto que a capacidade de resiliência aos principais fatores limitantes da fermentação alcoólica encontra-se aleatoriamente entre as linhagens, o que dificulta a escolha de um isolado que reúna todos. Ao mesmo tempo, o monitoramento de safra permite selecionar leveduras com habilidades às condições do processo fermentativo em virtude a adaptação ao ambiente.

**Quadro 1 – Determinação dos isolados selecionados com melhores desempenhos para a diluição  $10^{-4}$  frente aos parâmetros etanol, glicose, temperatura e pH.**

Isolado/Morfotipo	ETANOL			GLICOSE		TEMPERATURA			PH		
	0 %	11%	22%	100g/L	200g/L	30°C	35°C	40°C	1,0	3,0	5,0
C2(3I) - Liso											
C2(3.1F) - Liso											
C2(4I) - Liso											
C3(5I) - Rugoso											
C2(3F) - Liso											
C2(4F) - Liso											
C1(3F) – Liso											
C2(6F) - Rugoso											
C3(6F) - Rugoso											
CAT-1 - Liso											

Fonte: Autor; 2016.

## 5 CONCLUSÃO

- O processo de pressão de seleção para obtenção de diversidade de linhagens de leveduras permitiu identificar 12 morfotipos após os ensaios fermentativos, demonstrando a eficiência das fermentações em batelada como metodologia para determinação da variabilidade de leveduras em sistemas fermentativos;
- O morfotipo liso foi predominante no mosto oriundo da destilaria, o que conduziu se tratar das linhagens iniciadoras (fermento selecionado). Contudo, ao longo das fermentações em bateladas, ocorreu um aumento do padrão de colônia rugosa, provavelmente em decorrência da pressão de seleção e da contaminação ao longo dos vários dias de safra;
- A análise genética do comprimento de banda da região ITS permitiu identificar a predominância do gênero *Saccharomyces* ao longo do processo de seleção. O padrão de amplificação obtido pelo microsatélite GTG<sub>5</sub> não gerou o *fingerprint* esperado. Entretanto, o polimorfismo visualizado possibilitou a caracterização das linhagens de leveduras em oito grupos genéticos;
- O mosto fermentado coletado na usina é uma fonte de variabilidade genética para seleção de linhagens com tolerância múltipla, sendo as leveduras com morfotipo liso as mais resistentes aos fatores de estresse, se comparadas ao morfotipo rugoso;
- O processo de seleção gera diversidade genética e linhagens resistentes, mas requer melhorias, visando à redução do surgimento de leveduras com baixa capacidade fermentativa. Consequentemente, leveduras selecionadas poderão ser utilizadas de forma assertiva como inóculo de partida em substituição ao fermento comercial para a produção de etanol.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, J. G. L. F. In: Jornada Acadêmica de Engenharia de Alimentos Departamento de Ciências Exatas e Tecnologia Centro Universitário de Belo Horizonte – UNIBH, **Minicurso de Produção de Cachaça Artesanal**, 3, Centro de Tecnologia em Cachaça. Belo Horizonte. ago./set. 2004.
- AMORIM, H. V. Quanto custa selecionar uma levedura industrial? ESALQ/Universidade de São Paulo, 2011. **V Semana de Fermentação Alcoólica “Jayme Rocha de Almeida”**. 2011. Disponível em: <<http://stab.org.br/fermentacao/Amorim%20.pdf>>. Acesso em: 12 de novembro de 2015.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 91: p. 1267-1275, 2011.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage**. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Org.). The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, v. 1, p. 39-46, 2009.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. Simpósio Micro-organismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos. **Anais**. Embrapa Agroenergia. Brasília, 2013.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Revista Multiciência**, Campinas, n.7, 16 p. 2006.
- ANTONANGELO, A. T. B.F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae***. [tese]. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, 2012.
- AQUINO, A. F. O etanol da cana de açúcar: possibilidades energéticas da região de Ceará-Mirim-RN. **HOLOS**, v. 01, 2014.
- BARRE, P. et al. Fisiologia e ecologia microbiana, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, **Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas**, Universidade de São Paulo, 2004.
- BASÍLIO, A. C. M. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr. Microbiol**. V.56, p. 322–326, 2008.
- BASSO, L.C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, n.8, p. 1155-1163, 2008.
- BATISTOTE, M. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 2, n. 32, p.83-95, 2010.
- BERNARDI, T.L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World J. Microbiol. Biotechnol**. v. 24, p. 2705-2712, 2008.

- CABRAL, G. J.; KREMER, H.; TROSSINI, T. 2006. **Cachaça**. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\_eng1/cachaca.doc.> Acesso em: 12 de novembro de 2015.
- CANETTA, E., ADYA, A.K., WALKER, G.M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, p. 308-315, 2006.
- CARDOSO, M. das G. **Produção de Aguardente de Cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 445p, 2006.
- CARRASOCO, P.; QUEROL, A. DEL OLMO, M. Analysis of the resistance of commercial wine yeast strains. **Archives in Microbiology**. v. 175, p. 450-457, 2001.
- CECCATO-ANTONINI, S.R.; SUDBERY, P.E.; WIGHTMAN, R. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, p. 173-181, 2004.
- CERQUEIRA, D. P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. 66f. 2013. [Dissertação]. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid–state fermentation to food industry–A review. **Journal of Food Engineering**, v. 22, p. 211, 2005.
- CULLEN, P.J.; SPRAGUE JR, G.F. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 25, p. 13619-13624, 2000.
- DICKINSON, J.R. “Fusel” alcohol induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast. **Microbiology**, Washington, v. 142, p. 1391-1397, 1996.
- ESTRUCH, F., CARLSON, M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** v. 13, p. 3872-3881, 1993.
- FERNANDES, P. M.B. et.al. Ácidos Graxos de Membrana e Trealose na Resposta de Levedura a Alta Pressão Hidrostática. Universidade Federal do Espírito Santo- Vitória. 2008.
- FERREIRA, L.V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. 266p, 2002. [Tese] - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.
- GONÇALVES et al. In: II Congresso Brasileiro de Cachaça, Salvador, 2009. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de cachaçaria do estado da Bahia**.
- GUEROLA, P. M. **Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos**. 190f. 2006. [Tese] - Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Departamento de Biotecnología, Universitat de Valencia, Valencia, 2006.
- GUERRA, J.B., et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.33, p.106-111, 2001.

HARASHIMA, S. et al. Highly eficiente bioetanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strains with multiple stress tolerance to high temperatura, acid and ethanol. **New Biotechnology**. v. 29, n.3, 2012.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani, W. Biotecnologia Industrial. Ed. 1, São Paulo: Egard Blucher, v. 2. cap.6, p. 93-122, 2001.

HOWELL, K.S. et al. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **Lett Appl Microbiol**. v.38, n. 4, p. 315-20, 2004.

LATOUCHE, G. N. et al. Comparison of Use of Phenotypic and Genotypic Characteristics for Identification of Species of the Anamorph Genus *Candida* and Related Teleomorph Yeast Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3171–3180, 1997.

LIMA, U. A. AQUARONE, E.; LIMA, U.A. BORZANI, W. (Org). Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: **E. Blücher**, p. 145-182, 2001.

LOPES, C. H, **apresentação XII COREEQ**, 07/2006.

LUCENA, B. T. L. **Análise de polimorfismo cromossômicos em linhagens de fermentação alcoólica**. [Dissertação] - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2004.

MACHADO, C.M.M., ABREU, F.R., Produção de Álcool Combustível a partir de Carboidratos. **Política Agrícola**, n. 3, 2006, p. 64 - 78.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Brock Biology of microorganisms**. Ed. 12. Benjamin Cummings, p. 1168, 2008.

MICROSOFT Project for Windows 2010, versão 2015: project planning software. [S.l.]: Microsoft Corporation, 2015. Conjunto de programas. 1 CD-ROM.

MARQUES, T. A.;SERRA, G. E. Educação de Reciclagem de Células na Produção Biológica de Etanol. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.4, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Cana-de-açúcar**. 2015. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Informação acessada: 15 de novembro de 2015.

MORAES, F.V, **Como controlar a qualidade da cachaça**. Engarrafador moderno. LK Editora, v.10, São Paulo, 2001.

MOREIRA, A. L., ALMEIDA, R. J. A., SCABBIA, R. J. A., TEIXEIRA, R. R. P. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p. 69-76, Jan./Jun., 2009.

MUSSATO, S. I. et al. Technological trends, global Market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 817-830, 2010.

OLIVA NETO, P. de. Efeito de Fatores Inibidores na Fermentação Alcoólica. Produção de Etanol: Qualidade Engenharia/Engineering 107 FAZU. **Revista, Uberaba**, n. 8, p. 100-107, 2011.



PEJIN, D. et al. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Fuel**. v. 88, p. 1602-1607, 2009.

PROTTI, K. L. et. al. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lifte* shaker. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.4, 2007.

RIBEIRO, E. **Apresentação Dia Nacional do profissional da Química e II Escola da Química**, 2006.

RIBEIRO, E; REIS, H. Influencia conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito em fermentação alcoólica de mostos de sacarose. **IX Encontro interno e XIII Seminário de Iniciação Científica**. UFU, 2010.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processo fermentativo para a produção de etanol**. 80f. 2011. [Dissertação] Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP. São Paulo, 2011.

ROSA, A.C. et al. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 399-406, 2002.

RPA NEWS: CANA & INDÚSTRIA. São Paulo, 2014. Disponível em: <[http://www.revistarpanews.com.br/index.php/ultimas-noticias/3010-levedura adaptada-a-fabricacao-de-etanol-sem-queima-da-cana-melhora-producao](http://www.revistarpanews.com.br/index.php/ultimas-noticias/3010-levedura-adaptada-a-fabricacao-de-etanol-sem-queima-da-cana-melhora-producao)> Acesso em: 12 de janeiro de 2016.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre-expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 2010. 93 f. [Dissertação]- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SANTOS, R. G. N. dos **Perspectivas no Brasil e no Mundo para a Produção de Etanol**. 2014, 63f. [Monografia] – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

SCHWAN, R.F., et al. Microbiology and physiology of cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.79, p.89-96, 2001.

SILVA, A.F DA. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambiques da Bahia**. 115f. 2009. [Dissertação] – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2009.

SILVA-FILHO, E.A. **Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação**. [tese]. Recife: Universidade de Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2003.

SILVA-FILHO, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 88, p. 13–23, 2005.

arter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, 2005.

SILVA, J. A. et.al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. Universidade Estadual da Paraíba: **Química Nova**. v. 31, 2008.

SILVA, P.C.da; CECCATO-ANTONINI, S.R. Hyphal-like extension and pseudohyphal formation in industrial strains of yeasts induced by isoamyl alcohol. **Braz. J. Microbiol.** v.33, n.3, 2002.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, 2009.

SOUZA, V.F. **Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de sorgo sacarino**. 2011. 63f. [Dissertação] - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 2011.

SUDBERY, P.E.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, n.3, 2004.

TONIATO, J. **Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos**. 2013. 50f. [Dissertação] – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, São Paulo, 2013.

TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; MALACRINÓ, P.; SUZZI, G.; DELLAGLIO, F. Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. **Letters in Applied Microbiology**. v. 38, p. 239-244, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TOSETTO, G.M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melão de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008, 258f. [Dissertação] (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

VENTURA R. **Quantificação do ácido lático na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007. 102f [Dissertação] - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

VIANA, T.C.V. Com temperaturas superiores a 34°C na fermentação, levedura rugosas representam desafio para maioria das usinas. **Jornal Cana**. 2015. Disponível em: <<https://www.jornalcana.com.br/com-temperaturas-superiores-a-34oc-na-fermentacao-leveduras-rugosas-representam-desafio-para-maioria-das-usinas>> Acesso em: 12 de janeiro de 2016.

VINCENTE, F.A.C.F. **Seleção, avaliação e utilização de uma levedura personalizada para a produção de etanol**. 112f, 2015. [Tese] – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2015.

ZHAO, Y. et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. **Bioresource Technology**. v.102, p. 3020-3027, 2011.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Analyses of resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v.85, p. 271-280, 2004.