

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA – EST**  
**CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**MARTINA GOMES FARIAS**

**POTENCIAL DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS**  
**AMAZÔNICAS**

MANAUS

2019

**MARTINA GOMES FARIAS**

**POTENCIAL DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS  
AMAZÔNICAS**

**Monografia apresentada ao Curso de Graduação  
em Engenharia Química da Escola Superior de  
Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas,  
para obtenção do título de Bacharel em Engenharia  
Química.**

Orientador: Prof. Dra. Érica Simplício de Souza  
Coorientador: Prof. Msc. Luan Reis Honorato da Silva

MANAUS

2019

**MARTINA GOMES FARIAS**

**POTENCIAL DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS  
AMAZÔNICAS**

**Monografia de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro, Habilitação em  
Engenharia Química – Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do  
Amazonas**

**Banca Examinadora:**

.....  
**Prof. Dr. Nome do Orientador – Orientador**

.....  
**Profa. Dra. Nome do Membro Externo – Sigla da IES**

.....  
**Profa. Dra. Nome do Membro Interno – UEA**

**Conceito:**

**Manaus, 29 de novembro de 2019.**

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais. Sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, amigos, colegas, professores e todos que apoiaram esse sonho.

## RESUMO

Considerada a maior floresta tropical úmida do planeta, a Floresta Amazônica representa um dos principais biomas brasileiros ocupando cerca de 1/3 das reservas de florestas tropicais úmidas do mundo. Sua biodiversidade contempla o maior banco genético existente, apresentando assim uma fonte de grande potencial para a exploração biotecnológica. A microbiota da região amazônica se mostra como meio favorável para a identificação de novos microrganismos e, fazendo parte desse universo, as leveduras têm sido reconhecidas com um alto potencial de desenvolvimento. Considerando ainda a carência de estudos sobre a diversidade das leveduras amazônicas, o objetivo deste trabalho foi verificar e avaliar o potencial de produção do etanol a partir de leveduras isoladas de 3 frutos presentes na região amazônica. Foram utilizadas nove cepas, seis isoladas do Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), sendo quatro delas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e duas *Lachancea fermentati*, do Cacau (*Theobroma cacao*) foi isolada a *Torulaspota delbrueckii* e do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) a *Pichia kudriavzevii*. Os microrganismos foram submetidos a testes microbiológicos de floculação, viabilidade celular, assimilação de açúcares e resistência alcoólica e a fermentação a testes analíticos como medida de pH, grau Brix e açúcares redutores com intuito de constatar a atividade fermentativa e analisar sua geração de álcool. O pH das fermentações mantiveram-se numa faixa de 5,21 a 3,01, o menos ácido apresentado pela *P. kudriavzevii*, em todos notou-se também que a maior redução de pH é nas primeiras 24 horas de fermentação. Para o grau Brix obteve-se uma média inicial de 15,4° e ao longo do período de fermentação a maior redução, indicando maior consumo de açúcares dissolvidos foi da espécie *S. cerevisiae* isolada do Araçá-boi. Pelo método DNS a levedura maior consumidora de açúcar foi também a *S. cerevisiae* isolada do Araçá, com aproximadamente redução de 98% e concentração final de 5 g/L de açúcar e a menor taxa de decaimento foi da *Torulaspota delbrueckii*, cerca de apenas 7% de redução, indicando a possível contaminação microbiológica. Como esperado, todas as leveduras foram capazes de assimilar glicose e sacarose, porém nenhuma apresentou atividade para com a xilose. Para o teste de tolerância ao etanol observou-se ausência de bolhas de CO<sub>2</sub> em todas as amostras que continham concentrações de 15% e 20% de etanol, apenas a *Lachancea fermentati* não apresentou atividade em meio com 10% de teor alcoólico e todas as leveduras produziram CO<sub>2</sub> a 5% de concentração de álcool. O teste de floculação constatou apenas que a *T. delbrueckii* foi capaz de flocular, porém durante a fermentação foi possível observar a formação de flocos nas amostras de 100% das leveduras não – *Saccharomyces*. Ao final, a viabilidade celular das leveduras foi medida e a menor taxa de redução apresentada foi pela *Saccharomyces cerevisiae* isolada do Araçá. Em geral a maioria das leveduras obteve resultados positivos quando comparada à levedura comercial Cat2, também testada em todos os parâmetros acima. Encontrar uma levedura nacional capaz de produzir álcool em níveis significativos representa um objetivo maior: intensificar as pesquisas em busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade amazônica, aliando sua conservação e uso sustentável para resultar em incalculáveis benefícios sociais e econômicos para a região.

Palavras-chave: biodiversidade, levedura, frutos, açúcares, etanol.

## ABSTRACT

Considered the largest tropical rainforest on the planet, the Amazon Rainforest represents one of the main Brazilian biomes and accounts for 5% of the earth's surface, occupying about 1/3 of the world's tropical rainforest reserves. Its biodiversity comprises the largest existing genetic bank, thus presenting a source of great potential for biotechnological exploitation. The microbiota of the Amazon region is a favorable means for the identification of new microorganisms and, being part of this universe, yeasts have been recognized with a high development potential. Considering the lack of studies on the diversity of Amazonian yeasts, the objective of this work was to verify and evaluate the potential of ethanol production from yeasts isolated from 3 fruits present in the Amazon region. Nine strains were used, six isolated from Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), four of them from *Saccharomyces cerevisiae* and two *Lachancea fermentati*, from Cocoa (*Theobroma cacao*) *Torulaspora delbrueckii* and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) to *Pichia kudriavzevii*. The microorganisms were submitted to microbiological flocculation, cell viability, sugar assimilation and alcohol resistance tests and the fermentation to analytical tests such as pH, Brix grade and reducing sugars in order to verify the fermentative activity and analyze their alcohol generation. The pH of the fermentations remained in the range of 5.21 to 3.01, in all it was also noted that the greatest pH reduction is in the first 24 hours of fermentation. For the Brix grade, an initial average of 15.4 ° was obtained and throughout the fermentation period the largest reduction, indicating higher consumption of dissolved sugars, was *S. cerevisiae* isolated from Araçá-boi. By the DNS method the largest sugar consuming yeast was also *S. cerevisiae* isolated from Araçá, with approximately 98% reduction and final concentration of 5 g / L sugar and the lowest decay rate was *Torulaspora delbrueckii*, about 7%. % reduction, indicating possible microbiological contamination. As expected, all yeasts were able to assimilate glucose and sucrose, but none showed activity with xylose. For the ethanol tolerance test, no CO<sub>2</sub> bubbles were observed in all samples containing 15% and 20% ethanol concentrations, only *Lachancea fermentati* showed no activity in medium with 10% alcohol content and all yeasts. CO<sub>2</sub> at 5% alcohol concentration. The flocculation test only found that *T. delbrueckii* was able to flocculate, but during fermentation it was possible to observe floc formation in the samples of 100% of non - *Saccharomyces* yeasts. At the end, the cell viability of the yeast was measured and the lowest reduction rate presented was by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Araçá. In general most yeasts obtained positive results when compared to commercial Cat2 yeast, also tested on all the above parameters. Finding a national yeast capable of producing alcohol at significant levels represents a major objective: to intensify research in order to make better use of Amazonian biodiversity, combining its conservation and sustainable use to result in incalculable social and economic benefits for the region.

Keywords: biodiversity, yeast, fruits, sugars, ethanol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
Figura 2 – Via metabólica simples da alcoolização na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
Figura 3 – Fatores de estresse e componentes produzidos pelas células que afetam o metabolismo da levedura em relação às substâncias trealose, glicogênio, ácido succínico e glicerol .....	26
Figura 4 – Esquema de propagação do inóculo .....	37
Figura 5 – Esquema de propagação do inóculo juntamente ao preparo do mosto .....	37
Figura 6 – Curva padrão para análise DNS .....	39
Figura 7 – Leveduras reativadas em placas .....	41
Figura 8 – Placas contaminadas .....	42
Figura 9 – Cultura pura .....	43
Figura 10 – Células de leveduras em tubo com meio líquido .....	43
Figura 11 – Erlenmeyer com inóculo.....	44
Figura 12 – Mosto e inóculo .....	45
Figura 13 – Fermentações da Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) durante 24, 48 e 96 horas respectivamente .....	46
Figura 14 – Fermentações da AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) durante 24, 48 e 96 horas respectivamente .....	46
Figura 15 – Medida de pH .....	47
Figura 16 – Gráfico pH .....	47
Figura 17 – Refratômetro .....	49
Figura 18 – Gráfico grau Brix .....	50
Figura 19 – Gráfico ART .....	52
Figura 20 – Cat 2 em glicose, AR 1 em frutose e AR 13 em maltose, respectivamente ..	55
Figura 21 – AR 14 e AR 16, respectivamente .....	56

Figura 22 – <i>Torulaspota delbrueckii</i> em maltose .....	56
Figura 23 – Levedura Cp 18 em meio maltose e sacaraose respectivamente .....	57
Figura 24 – Leveduras AR 15, Cat 2 e AR 12 com presença de atividade .....	59
Figura 25 – <i>T. delbrueckii</i> a 5 e 10% de etanol .....	60
Figura 26 – <i>P. kudriavzevii</i> a 5 e 10% de etanol respectivamente .....	61
Figura 27 – Flocos de levedura CC 15 .....	62
Figura 28 – Amostras não floculantes ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	63
Figura 29 – Amostras floculantes ( <i>Lachancea fermentati</i> ).....	63
Figura 30 – Amostras floculantes ( <i>Lachancea fermentati</i> ) .....	63
Figura 31 – Visualização da viabilidade celular .....	65
Figura 32 – Visualização da viabilidade celular .....	65

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Leveduras e nomenclatura de identificação .....	35
Tabela 2: Concentração de células para o inóculo inicial de cada levedura .....	45
Tabela 3: Quantidades de consumo de açúcar e produção de etanol .....	53
Tabela 4: Assimilação de açúcares pelas leveduras .....	54
Tabela 5: Testes de tolerância ao etanol .....	58
Tabela 6: Resultado teste de floculação .....	62
Tabela 7: Viabilidade celular e taxa de redução .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°Brix	Gramas por cento de sólidos totais
°C	Graus Celsius
%	Porcento
a.C	Antes de Cristo, anos
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glicose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Etanol
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
et. al.	e colaboradores
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
µm	Micrometro, 10 <sup>-6</sup> m
nm	Nanometro, 10 <sup>-9</sup> m
η	Eficiência
pH	Potencial Hidrogeniônico
p/v	Peso por volume, quilo e litro
Qp	Produtividade volumétrica
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
v/v	Volume por volume, litro ou mililitro
YMA	<i>“Yeast malt Agar”</i>
Y <sub>P/S</sub>	Rendimento
YP	Levedura e peptona

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 LEVEDURAS.....	17
<b>2.1.1 Características Gerais</b> .....	17
<b>2.1.2 Leveduras Amazônicas</b> .....	19
2.1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
2.1.2.2 <i>Lachancea fermentati</i> .....	21
2.1.2.3 <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	22
2.1.2.4 <i>Pichia kudriavzevii</i> .....	22
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	23
<b>2.2.1 Bioquímica da Fermentação Alcoólica</b> .....	23
<b>2.2.2 Fatores que Influenciam a Fermentação</b> .....	25
2.2.2.1 pH .....	26
2.2.2.2 Temperatura .....	27
2.2.2.3 Etanol .....	28
2.2.2.4 Viabilidade Celular .....	30
2.2.2.5 Contaminação Microbiana .....	30
2.2.2.6 Subprodutos .....	31
2.2.2.7 Substrato .....	32
<b>2.2.3 Caldo da cana – de – açúcar</b> .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.1 MATÉRIA PRIMA.....	35
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
<b>3.2.1 Preparo do Inóculo Para Fermentação Alcoólica</b> .....	36
<b>3.2.2 Preparo do Mosto e Fermentação Alcoólica</b> .....	37
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
<b>3.3.1 Determinação de pH</b> .....	38
<b>3.3.2 Determinação de Sólidos Solúveis</b> .....	38
<b>3.3.3 Açúcares Redutores Totais</b> .....	38

3.4 TESTES PARA A LEVEDURA.....	39
<b>3.4.1 Teste de Capacidade Fermentativa.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2 Teste de Tolerância ao Etanol.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.3 Teste de Flocculação.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.4 Determinação da Viabilidade Celular de Levedura.....</b>	<b>40</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
4.1 MICRORGANISMOS .....	41
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	43
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	47
<b>4.3.1 pH .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.2 Sólidos Solúveis .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.3 Açúcares Redutores Totais.....</b>	<b>51</b>
4.4 TESTES PARA A LEVEDURA.....	54
<b>4.4.1 Teste de Capacidade Fermentativa.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4.2 Teste de Tolerância ao Etanol.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.3 Teste de Flocculação.....</b>	<b>61</b>
<b>4.4.4 Determinação da Viabilidade Celular de Levedura.....</b>	<b>64</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é considerada a maior floresta tropical úmida do mundo pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Representa a maior reserva de biodiversidade da terra, abrigando mais de 30 mil espécies de planta e 20% de todas as espécies de fauna do planeta, contemplando assim o maior banco genético existente. (IBGE, 2015)

Visto que essa macro biodiversidade existe em parâmetros micro, as leveduras também possuem grandes variedades relacionadas à sua filogenia. Comumente presentes nos frutos, o desenvolvimento desses microrganismos é favorecido através de características específicas como baixos níveis de pH (de 4,5 a 5) e altas concentrações de açúcares simples (até 150 g/L), tornando-os substratos com alto potencial de crescimento. (CASADEI, 2012; ROSE, 1997; THATIPAMALA et al., 1992)

As leveduras são microrganismos unicelulares, eucariontes, possuem forma que pode ser de redonda a oval e dependem diretamente de fontes de carbono para produção de energia e desempenho de suas funções vitais. Esses seres podem ser patogênicos, biodegradadores e possuem grande interesse industrial uma vez que são aplicados nos mais variados processos, apresentando assim versatilidade em sua utilização. (LACERDA, 2002; PHAFF, 1990)

Diferentes espécies desse microrganismo são isoladas, também, a partir de fermentações espontâneas de diversos frutos. Acompanhar o processo fermentativo torna possível o surgimento de novos microrganismos, possibilitando mais estudos e meios de utilização. (GUIMARÃES, 2005)

As fermentações produzidas por leveduras são classificadas em 3 tipos: alcoólica, acética e láctica. A fermentação alcoólica é um processo microbiológico no qual as moléculas de glicose são quebradas com a finalidade de produzir energia, etanol e gás carbônico. A *Saccharomyces cerevisiae* é industrialmente um dos microrganismos mais utilizados para processos fermentativos e um dos principais motivos para tal é seu alto nível de tolerância em relação ao etanol que pode chegar a uma concentração de até 105 g/L de etanol sem que sua produção seja inibida completamente. (LUONG, 1984; MIRANDA, 2012)

Em diversos países a utilização de leveduras selecionadas tem obtido resultados de excelência os quais permitem produtos finais com maior qualidade. Logo, um método de fundamental importância na garantia de uma fermentação eficaz é a seleção da levedura adequada, o que fomenta o estudo do potencial fermentativo de leveduras regionais. Específicos

da área amazônica, tais microrganismos estão adaptados às condições climáticas da região e à sua matéria-prima (nesse caso o fruto), possibilitando características únicas a serem obtidas. (DEQUIN, 2001)

De acordo com Moreira (2013) alguns requisitos são exigidos para que a utilização do microrganismo em questão seja adequada, são eles: capacidade fermentativa, potencial de floculação, boa osmotolerância, alta tolerância ao etanol e termotolerância. Como nenhuma levedura possui todas essas qualidades inteiramente, o estudo procura testar microrganismos regionais amazônicos visando a obtenção do número máximo de características apreciáveis para produção de etanol.

Horii (1999) afirma que a variabilidade filogenética influencia diretamente na obtenção das qualidades e características do produto final, com isso, neste trabalho serão utilizadas leveduras isoladas do bioma amazônico, através da fermentação espontâneas de frutos presentes na região (Cupuaçu, Cacao e Araçá-Boi), com enfoque no estudo da sua capacidade de assimilação de açúcares para a produção de álcool visando um aproveitamento melhor dos mesmos contidos no substrato utilizado (caldo de cana).

A pesquisa cada vez mais apurada desses seres vivos visa não apenas a exploração da biodiversidade, e sim também sua preservação e desenvolvimento. A descoberta de uma levedura regional capaz de produzir etanol com elevado potencial econômico e aplicação industrial contribui para o melhor aproveitamento de sua riqueza biológica.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho consiste em determinar o potencial fermentativo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea fermentati*, *Torulaspora delbrueckii* e *Pichia kudriavzevii* isoladas do bioma amazônico para a produção de etanol e os objetivos específicos são:

- Conduzir fermentações descontínuas utilizando caldo de cana como substrato com as 8 diferentes leveduras isoladas, sendo seis delas isoladas do Araçá-boi (*Eugenia stipitata*) (quatro espécie *Saccharomyces cerevisiae* e duas *Lachancea fermentati*), uma do Cacao (*Theobroma cacao*) a *Torulaspora delbrueckii* e uma levedura do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) a *Pichia kudriavzevii* buscando avaliar suas capacidades fermentativas;
- Caracterizar o perfil fermentativo do isolado a partir dos parâmetros pH, sólidos solúveis e açúcares redutores totais;

- Testar a capacidade fermentativa, tolerância ao etanol, capacidade de flocculação e viabilidade celular das leveduras amazônicas;
- Comparar e analisar o desempenho das leveduras regionais entre si;
- Comparar e analisar o desempenho das leveduras regionais com a levedura comercial Cat 2 da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEVEDURAS

#### 2.1.1 Características Gerais

As leveduras são microrganismos unicelulares que atuam fundamentalmente em processos biológicos como a transformação de nutrientes e a decomposição da matéria orgânica. Pertencentes à classe *Basidiomycetes* e *Ascomycetes*, esses micro seres se encontram distribuídos nos mais diversos biomas terrestres estando associados a vegetais ou insetos por interações mutualísticas, parasitas, competidoras ou patogênicas, crescendo e se desenvolvendo através de substratos ricos em açúcares e nutrientes. (STARMER et al., 2001; WALKER, 1998)

Em regiões tropicais como a floresta amazônica, as leveduras capazes de fermentar frutos estão disseminadas de acordo com sua disponibilidade de recursos e têm despertado interesse científico para seu isolamento devido à vasta diversidade biótica. A versatilidade de sobrevivência das leveduras faz possível seu isolamento e manutenção com facilidade mesmo estando em habitats inexplorados como na América do Sul. (BARRIGA et al., 2011)

As células de leveduras podem ter formato esférico, oval ou elíptico, não possuem flagelos o que torna esses microrganismos isentos de mobilidade. Seu tamanho depende da idade e ambiente, variando 1 a 8  $\mu\text{m}$  de largura e 3 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento. A reprodução da levedura pode ser assexuada por crescimento vegetativo (brotamento ou gemulação) através da mitose e, durante variações ambientais, o que se torna responsável pela sua viabilidade de espécie produzindo novos híbridos é a esporulação, base para as leveduras se reproduzirem sexuadamente (meiose). (ALCARDE, 2007)

Elementos básicos como fontes de carbono, nitrogênio, água, minerais e oxigênio formam fatores físicos e químicos indispensáveis para o desenvolvimento e reprodução das leveduras uma vez que sua composição celular é distribuída quimicamente entre 68% a 83% de água, além de carboidratos, substâncias nitrogenadas, lipídeos, vitaminas entre outros. A maioria das espécies desses microrganismos consegue assimilar açúcares simples como a glicose, porém existem diferenças entre cada espécie com relação a capacidade de assimilação e fermentação desses açúcares. (HEARD; FLEET, 1993)

Alguns substratos que contêm grande quantidade de açúcar, umidade e fontes de carboidratos facilmente assimilados são os ambientes mais propícios para que as populações de

leveduras cresçam e ali se tornem densas. Flores e frutos se apresentam como habitats favoráveis a possuir todas essas características. (FERNANDES, 2008)

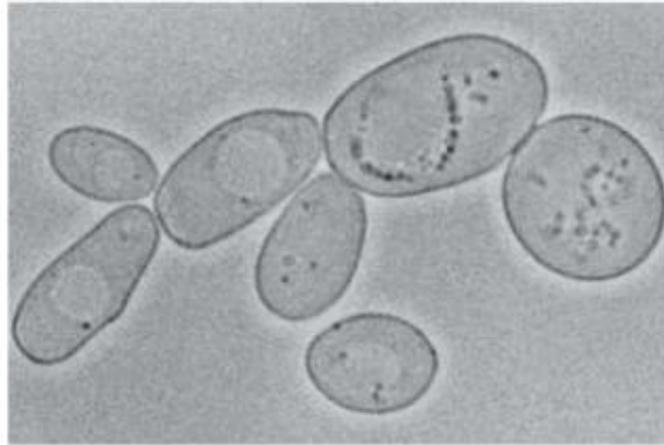
A utilização das leveduras pelo homem acontece desde o período paleolítico e há mais de nove mil anos é empregada na fabricação de bebidas e alimentos. Os egípcios, em 4000 a.C, já conheciam o uso de leveduras na fabricação do pão, cerca de 6000 a.C os babilônios sabiam da produção de álcool em forma de cerveja através desses microrganismos e até mesmo relatos sobre a fermentação do vinho constam no livro de Gênesis. (NIELSEN et al., 2000)

O desenvolvimento da biotecnologia permitiu que hoje as leveduras também fossem amplamente utilizadas nos mais variados processos: tratamento de resíduos, produção de bioetanol, produção de químicos, farmacêuticos e são constantemente manipuladas em estudos genéticos, se tornando assim o microrganismo eucariótico mais estudado. Dentre as leveduras, o gênero *Saccharomyces*, descoberto há 150 anos, é o mais analisado e observado desde então e seu metabolismo o mais bem conhecido. (AQUARONE et al., 2001)

De acordo com Giraffa (2004) o consumo de alimentos e bebidas fermentadas vem crescendo desde 1970, uma vez que as pessoas acreditam que estes sejam produtos naturais e saudáveis. Em 2015 foram produzidos 193290 milhões de litros de cerveja e a previsão para 2020 é que esse número cresça para 269028,6 milhões de litros. Com isso supõe-se que a indústria de bebidas concentra a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2017; BARTH-HAAS GROUP, 2016)

A principal levedura para essa produção de quantidades exuberantes da cerveja é a espécie *S. cerevisiae* (Figura 1) que cresce eficientemente em condições aeróbias e em baixas concentrações de glicose (menos de 2%), converte o açúcar em álcool possuindo alta resistência ao etanol no meio em que se encontra (cerca de 14 - 16% v/v de etanol) e tolerância a ampla variação de temperatura (20°C – 37°C), sendo capaz de manter sua atividade celular em ambientes ácidos. (CASADEI, 2010; ESPIRITO SANTO, 2012; LIMA et al., 2001)

Figura 1 – Células de *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Madigan, 2016.

Apesar de a *Saccharomyces cerevisiae* ser a levedura mais investigada cientificamente, a importância industrial de outras espécies se estende além da fermentação tradicional. Os produtos biotecnológicos obtidos através desses microrganismos possuem relevância em outros setores comerciais importantes: biocombustíveis, produtos químicos, enzimas para aplicações industriais, produtos farmacêuticos e agrícolas (PRETORIUS et al., 2003).

Espécies como *Kluyveromyces lactis* (produção de lactase), *Yarrowia lipolytica* (crescimento de alcanos), e *Candida albicans* (relevância clínica) são exemplos de leveduras não - *Saccharomyces* e se tornaram alvo de diversos estudos. (FERNANDES, 2008; FLORES et al., 2000)

A partir disso, conclui-se que as leveduras fazem parte do grupo mais importante de microrganismos comercialmente explorados e empregados, especialmente em relação à capacidade fermentativa. (FERNANDES, 2008)

### 2.1.2 Leveduras Amazônicas

Um dos substratos que mais favorecem o desenvolvimento de diversos microrganismos são as partes das plantas (raízes, caule, folhas, flores, frutos e etc.). (FOKKEMA, 1991)

As leveduras isoladas da parte frutífera da planta geralmente são boas fermentadoras e assimilam glicose, etanol, glicerol e celobiose, assim os frutos se tornam importantes micro

habitats para toda essa variedade de espécies de leveduras na natureza. (PHAFF; STARMER, 1987).

Além de possuir alta concentração de açúcares simples e baixo pH, nestes substratos o desenvolvimento da levedura também é favorecido devido a visitas constantes de insetos vetores e diversos processos bioquímicos e ecológicos pelos quais o fruto passa, incluindo sua deterioração. (MAMBUSCAY et al., 2013).

Estudos sobre a biodiversidade de leveduras no Brasil confirmaram que comunidades de leveduras específicas com biótipos diferentes e até mesmo novas espécies são encontradas em habitats como insetos, flores e frutos. (HAGLER et al., 1993; LANDELL; VALENTE, 2009)

Os autores Pietrowski, Wosiacki e Nogueira (2011) descrevem que para revelar cepas com excelente potencial tecnológico necessita-se estudar a biodiversidade e dinâmica populacional dos ecossistemas fermentativos.

Segundo Skinner et al., (1980), a microbiota natural de leveduras dos frutos em geral é composta pelos gêneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e raramente por *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*.

Em recente trabalho, algumas leveduras foram isoladas de frutos presentes na região amazônica. Da polpa do Araçá-boi (*Eugenia stipitata*) foram encontradas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e *Lachancea fermentati*, já do Cacau (*Theobroma cacao*) isolaram-se microrganismos do tipo *Wickerhamomyces sydowiorum*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida intermedia* e *Candida blattae*. Do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), um dos frutos mais típicos da Amazônia, foram identificadas leveduras das espécies *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia kudriavzevii*. (HONORATO, 2019)

Com isto, para o presente estudo foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea fermentati*, *Torulaspota delbrueckii* e *Pichia kudriavzevii* que produziram fermentações onde seus potenciais fermentativos foram avaliados.

#### 2.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Um dos microrganismos mais utilizados mundo afora é a *Saccharomyces cerevisiae*. Essa levedura possui a capacidade de fermentar uma diversidade de açúcares, entre eles: sacarose,

glicose, frutose, galactose, manose, maltose, etc, apresentando assim alta atividade fermentativa. (BARNABÉ et al., 2005; WYLER, 2013)

Toda essa popularidade é devido, de acordo com Ribeiro (1999), sua produtividade e eficiência nos processos fermentativos, por tolerar altas temperaturas e concentrações de etanol, por produzir substâncias específicas que compõem o aroma de bebidas e também, através de seu metabolismo, produzir anti-contaminantes, chamados de “killer”.

Para Carvalho (2006), cepas desta espécie de levedura são economicamente muito importante em relação a indústria de bebidas e alimentos devido aos processos fermentativos nas quais atuam (cerveja, pão, etc) e vêm sendo empregadas nesses ramos há milhares de anos.

A *S. cerevisiae* possui metabolismo adaptado para processos em presença ou ausência de oxigênio. Quando há oxigênio, essa levedura converte açúcar em biomassa, gás carbônico e água e, quando o oxigênio está ausente, o processo fermentativo se torna alcoólico onde os açúcares são transformados em etanol e gás carbônico. (LIMA et al., 2001)

#### 2.1.2.2 *Lachancea fermentati*

O gênero *Lachancea* vem sendo estudado por dar origem a leveduras não - *Saccharomyces* que possuem uma característica metabólica incomum: a produção de ácido lático durante a fermentação alcoólica. (JOLLY et al., 2014)

Gibson et al. (2015) e Osburn et al., (2018) estudaram em específico a espécie *Lachancea fermentati* em relação às fermentações de cerveja e os dois autores propuseram a utilização dessa levedura para produção de "cervejas azedas" sem o uso de bactérias do ácido lático ou a adição de ácido lático técnico.

Esse fator influencia diretamente o processo fermentativo uma vez que um ambiente mais ácido dificulta a contaminação microbiana do mosto e aumenta a vivacidade do produto fermentado, característica que outras leveduras não convencionais não possuem. (BRANYIK et al., 2012; VRIESEKOOOP et al., 2012)

### 2.1.2.3 *Torulaspora delbrueckii*

A *Torulaspora delbrueckii* é uma levedura não - Saccharomyces inicialmente muito utilizada em mostos com baixos teores de açúcar e foi uma das primeiras a ser lançada comercialmente. (CASTELLI, 1955).

Mais recentemente, estudos comprovaram que a *T. delbrueckii* produziu níveis inferiores de acidez volátil quando comparada a *S. cerevisiae*, assim, essa levedura vem sendo utilizada na produção de fermentados a partir de mostos com alto teor de açúcar. (BELY et al., 2008; MORENO et al., 1991; RENAULT et al., 2009)

Outros subprodutos da *T. delbrueckii* são o ácido succínico e o linalol, composto essencial para o aroma de lúpulo na cerveja e responsável pelo aumento do aroma em vinhos. (CIANI e MACCARELI, 1998; KING e DICKSON, 2000; KISHIMOTO et al., 2006)

Segundo pesquisas de a levedura *Torulaspora delbrueckii* mostrou alta tolerância ao etanol e potencial para fermentar maltose e maltotriose. (ARAÚJO et al., 2004; BREDA et al., 2013)

### 2.1.2.4 *Pichia kudriavzevii*

Apresentada pela primeira vez por V.I. Kudryavtsev em 1960, a *Pichia kudriavzevii* é uma levedura facilmente encontrada no meio ambiente, se desenvolve no solo, frutas e várias bebidas fermentadas. Relaciona-se também a degradação dos alimentos que dá origem a biofilmes de superfície em produtos de baixo pH. (KURTZMAN et al., 2011)

A *Pichia kudriavzevii* pode ser isolada de várias fontes: suco de frutas, saquê, champanhe, cervejas, fermento de padeiro e até mesmo em sangue e fezes humanas (CHAN et al., 2012; KURTZMAN et al., 2011)

Essa levedura apresenta caráter patogênico e uma variedade limitada quanto à utilização de açúcares, fermentando principalmente glicose. Por outro lado a *Pichia kudriavzeii* pode sobreviver a altas temperaturas (>45° C) e baixos pHs (<2) mantendo seu metabolismo ativo. (GREPPI et al., 2017; KURTZMAN et al., 2011; OBEROI et al., 2012).

## 2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

### 2.2.1 Bioquímica da Fermentação Alcoólica

A fermentação é utilizada desde os tempos mais remotos da civilização humana, porém foi Louis Pasteur que em meados de 1850 identificou e elucidou os pequenos seres vivos que atuavam nesse processo. O cientista concluiu que as leveduras eram responsáveis pela conversão de açúcar em etanol. (PEREIRA, 1999)

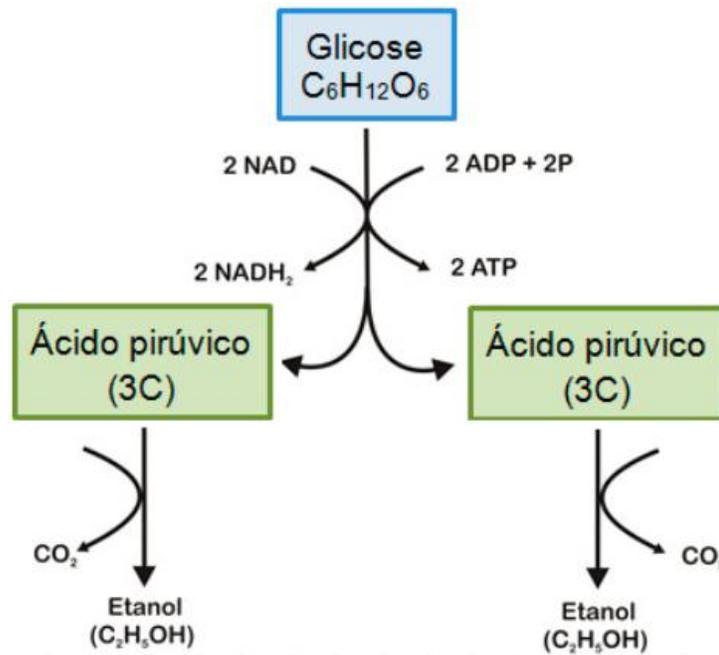
A fermentação é um processo no qual compostos orgânicos presentes em um substrato sofrem catabolismo anaeróbico para gerar energia. A conversão de uma molécula orgânica em etanol e gás carbônico, em proporções equimolares, envolve 12 reações sequencialmente ordenadas, cada uma catalisada por uma enzima específica. O desempenho de tais enzimas é influenciado por fatores como: nutrientes minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, etc. Alguns desses fatores estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim a eficiência do processo. (STANBURY et al., 1995)

Com as reações das enzimas citadas anteriormente, a molécula de glicose é degradada em compostos mais simples durante a fermentação. Tal metabolização do açúcar leva à geração de uma forma de energia química (ATP) para que a própria célula realize diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses necessários à manutenção de suas atividades vitais, crescimento e multiplicação da levedura. (LIMA et al., 2001; REGODON et al., 1997)

A etapa inicial do processo fermentativo consta com a oxidação da glicose a ácido pirúvico, onde enzimas glicolíticas agem na quebra da molécula e a transforma em dois açúcares de três carbonos. Essa parte envolve a ativação da glicose que recebe sucessivas reações, transformando em adenosina difosfato (ADP) duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP), fosfatos energéticos. (TORTORA et al., 2010)

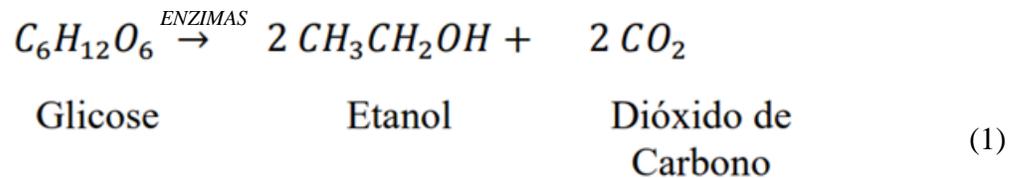
Com isso a molécula de açúcar é convertida em gliceraldeído 1,3-difosfato e ao final dessa etapa, cada gliceraldeído gera ácido pirúvico ou piruvato por meio de reações catalisadas por diferentes enzimas e coenzimas. Nos organismos capazes de realizar fermentação alcoólica, o piruvato perde dióxido de carbono produzindo acetaldeído, sendo reduzido a etanol. O balanço energético dessa parte do processo fermentativo é: duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose utilizada. (CAMPBELL, 2003; HASHIZUME, 2001)

Figura 2 – Via metabólica simples da alcoolização na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: sobiologia.com.br, 2018.

Globalmente a fermentação alcoólica é representada pela Equação de Gay-Lussac (Equação 1), a qual é possível analisar que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92g) e 2 moles de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (88 g) e 57 kcal de energia . (KOLB, 2002; LEHNINGER et al., 1995)



Outros componentes além do etanol e CO<sub>2</sub> (produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose) são formados, mesmo que em menor quantidade, durante esse processo fermentativo: alcóois superiores, glicerol, aldeídos, ésteres e acetatos. (LURTON et al., 1995)

Matematicamente, 100 g de açúcar originam 51,1 g de etanol e 48,9 g de dióxido de carbono, porém Pasteur comprovou que apenas 48,8 g de etanol e 44,6 g de dióxido de carbono

eram formados. Além disso, 3,3 g de glicerina, 0,6 g ácido pirúvico e 1,2 g de outros produtos eram produzidos e essa diferença acontece pelo seguinte motivo: compostos nitrogenados e hidratos de carbono são utilizados pelas leveduras para elaborar substâncias próprias das células. Além disso, o álcool pode se perder por evaporação ou forma ésteres. (KOLB, 2002)

Dentre essa lista de produtos do processo fermentativo, temos mais de uma centena de ácidos orgânicos gerados de três vias do metabolismo da levedura. O piruvato, por exemplo, dá origem a compostos como acetato, succinato, cetoglutarato, malato e citrato, e estes ácidos possuem influência direta quando se trata das características organolépticas de bebidas fermentadas e intervêm no seu valor do pH. Outros ácidos orgânicos (ácidos isovalérico e isobutírico) derivam das vias de síntese dos aminoácidos e dos álcoois superiores. (OLIVEIRA, 2006)

A fermentação alcoólica se processa no citoplasma celular e é um processo não oxidativo, sem a participação do oxigênio molecular, e portanto, para se manter o equilíbrio de redox celular, todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser consumido (em reações de redução) acoplado à produção de etanol e glicerol. (AMORIM et al., 1996; HASHIZUME, 2001; LIMA et al., 2001)

O processo fermentativo pode ser representado por três fases: a preliminar (adaptação da cultura ao meio), a tumultuosa e a complementar (fim da fermentação). No fim da fermentação o etanol é tido como principal produto, podendo chegar a níveis de concentrações extracelulares que variam de 12% a 14% de volume em fermentação normal. (CORAZZA et al., 2001; OLIVEIRA, 2006)

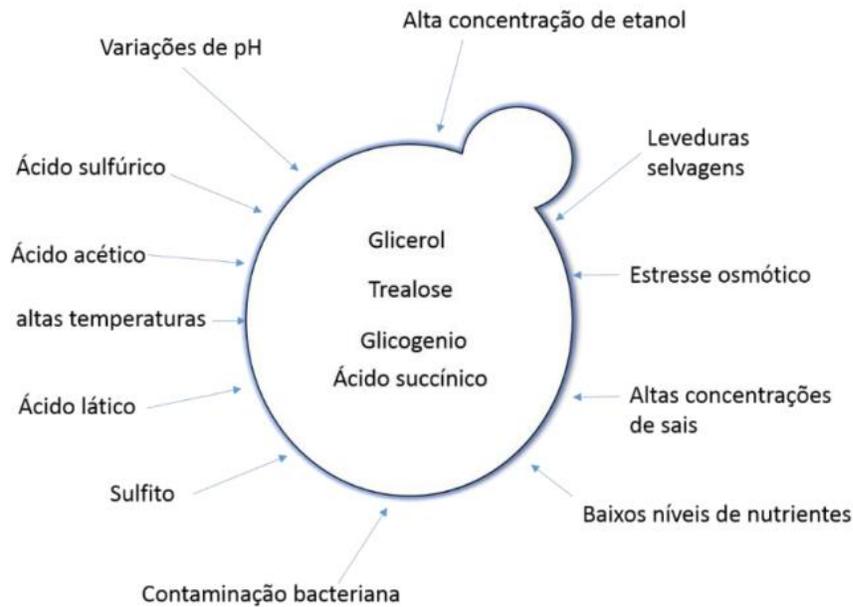
### **2.2.2 Fatores que Influenciam a Fermentação**

O processo de fermentação é influenciado através de fatores diversos, podendo ser físicos, químicos e microbiológicos. Tais fatores alteram o rendimento fermentativo, podendo ou não gerar mais produtos secundários (glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeídos, etc) e biomassa. Alguns destes principais fatores influenciadores são: pH, álcool, oxigênio, floculação, dióxido de carbono e temperatura. (LIMA et al., 2001)

Quando há o desequilíbrio desses fatores temos o estresse fermentativo que afeta diretamente as substâncias responsáveis pela manutenção das atividades vitais da célula de

levedura. Dentre elas há o glicerol, relacionada ao equilíbrio redox do organismo, a trealose e glicogênio, que fornecem reserva de carboidrato para energia adicional, e o ácido succínico, que juntamente ao etanol apresenta um efeito antibacteriano, os quais estão identificados na Figura 3. (LIMA et al., 2001)

Figura 3 – Fatores de estresse e componentes produzidos pelas células que afetam o metabolismo da levedura em relação às substâncias trealose, glicogênio, ácido succínico e glicerol.



Fonte: Paulino de Souza, 2017.

### 2.2.2.1 pH

O pH é um fator relevante para fermentações uma vez que atua no controle da contaminação bacteriana, no crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (AMORIM et al., 1996).

De acordo com AMORIM et al. (1996), em indústrias os valores de pH dos mostos estão numa faixa que vai de 4,5 até 5,5. Outros autores trazem o pH ideal entre 3,5 e 6 para que o substrato favoreça o crescimento da levedura e a produção de etanol. (ARRUDA et al., 2003; BARNABÉ et al., 2005; SHANKAR et al., 2014)

A *Sacharomyces cerevísae* em específico possui pH ótimo para a produção de etanol entre 4 e 5. À medida que o meio se torna básico (pH 7), o rendimento da fermentação é reduzido uma vez que a produção de ácido láctico e acético aumenta devido à contaminação de bactérias, tal é favorecida pelo valor de pH superior a 5. (MAIA, 1989)

Outros estudos revelam que no interior da célula do microrganismo, o pH se mantém na faixa de 5,8 a 6,9, mesmo que extracelularmente esteja entre 2 e 7. Porém valores abaixo da faixa ideal de pH deixam o meio mais agressivo à célula, fazendo com que a levedura precise de mais energia para manter o pH intracelular. Além disso as condições de pH extracelulares afetam também a velocidade de crescimento das leveduras, a qual possui o ponto ótimo quando o pH está compreendido entre 5 e 6. (MAIA (1989),

Mais problemas ocorridos devido a baixos valores de pH são: aumenta do efeito tóxico do etanol, ácidos orgânicos e dióxido de enxofre que diminuem taxas de brotamento das leveduras. Também há a adesão entre as células que foram aglomerados e sedimentam no meio onde anteriormente encontravam-se em suspensão, esse fenômeno é chamado de floculação. (CARTWRIGHT et al., 1986; KOIZUMI & OGAWA, 2005; MIKI et al., 1982; SATO et al., 2001)

Quando a floculação acontece, a disponibilidade das leveduras para consumo dos açúcares se torna menor uma vez que causa redução do tempo de contato entre as células e o mosto, assim, reduzindo o rendimento da fermentação e ocasionando uma série de prejuízos ao processo (AMORIM, 2005; ROSE, 1980)

### **2.2.2.2 Temperatura**

Mais um fator significativo determinante para ótimos rendimentos fermentativos é a temperatura. De acordo com WIN et al. (1995) a temperatura ótima para produção de etanol é 30° C, já para ECHEGARAY et al. (2000) esse valor só se torna ideal quando tinge 32° C e PAALME et al. (1997) por sua vez afirma que 28° C é a temperatura que mais favorece a fermentação.

Todos esses estudos reforçam a ideia de que é possível trabalhar em uma faixa de temperatura ideal sem perder produtividade, faixa que BARNABÉ et al. (2005) descreve como ótima para o crescimento das leveduras quando é de 28°C à 35 °C, na qual as enzimas invertases da levedura trabalham em condição adequada, atingindo estabilidade e atividade máxima, assim, realizando a inversão de sacarose liberando glicose e frutose. (ARRUDA et al., 2003; SHANKAR et al., 2014)

Porém, quando a fermentação atinge altas temperaturas (40 °C) seu desenvolvimento é prejudicado em duas partes: inicialmente com a produção em excesso de etanol, levando à inibição das próprias leveduras. (ALEXANDRE e CHARPENTIER, 1998)

Além disso, essa temperatura superior afeta diretamente o organismo da levedura uma vez que provoca desordens na membrana, desnatura proteínas, aumenta o armazenamento de trealose e etanol intracelular, inibe a glicólise e pode resultar em mutações ou até mesmo na morte da levedura. (AMORIM et al., 2001; NAGODAWITHANA et al., 1974)

Outro fator extremamente importante, correlacionado com a temperatura do mosto é a contaminação bacteriana. Quanto maior a temperatura maior a possibilidade do crescimento de contaminantes. (AMORIM et al., 1996).

Já as temperaturas mais amenas favorecem o processo fermentativo e são de suma importância para a indústria de bebidas uma vez que contribuem para realçar o aroma e tornar a bebida com traços desejáveis aos consumidores. Por exemplo, a produção de cerveja possui temperatura ótima de 26° C. (LIMA, 1975; RIPONI et al., 1997; STASHENKO et al., 1992)

### **2.2.2.3 Etanol**

Outro fator significativo ao rendimento da fermentação é o acúmulo de álcool etílico. A viabilidade celular da levedura é reduzida pelo seu próprio produto, o etanol, que pode alcançar uma concentração de 12% v/v após 72 horas de processo. Sua ação tóxica atinge diretamente a organização da membrana citoplasmática, modificando a composição lipídica e permeabilidade da membrana para alguns íons (especialmente íons H<sup>+</sup>). (IZAWA et al., 2010; PANTOJA et al., 2001)

Além desse impacto negativo, ainda temos: modificação da síntese de proteínas de estresse, a modulação de processos de troca iônica (redução da atividade metabólica que causa a

inibição da absorção de glicose), a diminuição da taxa de crescimento e estresse hídrico. (HALLSWORTH, 1998; MARTINI et al., 2004)

Bueno Neto (1982) a partir de seu estudo afirma que o efeito inibidor do álcool, em relação ao crescimento celular, só ocorre a partir de uma concentração de 7,2% v/v, o autor utilizou como inóculo o *S. cerevisiae*. Já Basso et al. (2011) defende que essa concentração de etanol pode variar de 8 a 12% (v/v) para que o álcool já seja considerado um fator de estresse que age sobre a levedura.

Mais estudos demonstraram que quando a concentração de etanol é inferior a 26 g/L o crescimento celular não é inibido, porém quando a concentração se eleva para 68,5 g/L é inibido totalmente. (HOLZBERG et al., 1967)

Já Luong (1984) observou uma faixa para a velocidade de crescimento celular das leveduras. O autor afirma que há um efeito significativo em concentrações acima de 15 g/L e que a concentração de etanol máxima a partir da qual as células não mais cresciam era aproximadamente 100 g/L.

Esse mesmo autor também verificou que a capacidade de produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* era completamente inibida a uma concentração de etanol de 105 g/L.

O efeito de inibição do álcool etílico se relaciona a temperatura do processo segundo Maia (1989). Sá-Correia e Van Uden (1983) mostram que a melhor faixa de resistência ao etanol para a *Saccharomyces cerevisiae* é de 13 a 27°C a 11% (v/v) de etanol.

Os autores afirmam que a tolerância alcoólica diminui para temperaturas mais baixas que 13°C ou mais altas que 27°C, de forma que a inibição do crescimento do microrganismo ocorre tanto em processos à baixa temperatura quanto em processos à alta temperatura.

Dorta (2006) fala que além do estresse por etanol intensificado pela alta temperatura, essas modificações também ocorrem para alta acidez, fatores estressantes que são impostos simultânea ou sequencialmente para as leveduras.

A análise dos valores da faixa de temperatura deve ser cuidadosa uma vez que depende diretamente do tipo de microrganismo, do seu estado fisiológico, do meio de cultura e da temperatura.

#### **2.2.2.4 Viabilidade Celular**

Quanto maior a viabilidade celular da levedura, melhor será a conversão de açúcares em álcool, assim maior o desempenho do processo. O controle desse parâmetro deve ser rigoroso uma vez que, geralmente, os ambientes em que as fermentações ocorrem não são propriamente ideais para a manutenção da viabilidade celular.

Fatores já citados anteriormente são determinantes para que a célula se mantenha viável, acúmulo de etanol, CO<sub>2</sub> e o aumento da temperatura afetam negativamente a viabilidade da célula. (ATTFIELD, 1997; MILANESE-RUBILAR & MAUGERI, 1990)

De acordo com os autores Cysewski e Wilke (1977) a viabilidade da célula de levedura reduz continuamente em processos fermentativos que ocorrem na ausência de oxigênio uma vez que a levedura utiliza oxigênio para produzir substâncias utilizadas na biossíntese de lipídios que constituem a membrana plasmática e mitocondrial das leveduras.

#### **2.2.2.5 Contaminação microbiana**

O mais frequente agente estressante da fermentação é a contaminação microbiana. Bactérias e outras espécies de leveduras são encontradas na fermentação e a produção do etanol é afetada no momento em que esses microrganismos contaminam o meio, consomem os açúcares presentes ali e produzem compostos não etanólicos (ácidos orgânicos - lático, acético, etc), diminuindo o rendimento do processo. (AMORIM et al, 1996; MOREIRA et al. 2013; MUTTON, 2005)

Fisicamente as bactérias contaminantes se aderem às paredes das células de levedura e induzem a floculação, assim a biomassa se precipita e conseqüentemente o rendimento, produtividade e viabilidade celular decaem. (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; VENTURA; ZINK, 2002).

Além disso, o crescimento bacteriano é favorecido com altas temperaturas (30° C – 40° C), conseqüentemente os níveis de ácido lático e às vezes acético, produto do metabolismo do contaminante, também aumentam e intoxicam a levedura. Não obstante, as bactérias se tornam competidoras dos nutrientes do meio e também consomem a glicose que seria destinada à

produção de álcool. (AMORIM *et ai.*,1996; DE CARVALHO,2011; NARENDRANATH *et al.*,1997)

De acordo com Basso *et al.* (2008) o ideal é manter as leveduras suspensas no líquido de fermentação para que haja máxima conversão de açúcar em etanol e gás carbônico.

Para amenizar esse problema o indicado é realizar assepsia em todos os equipamentos do processo fermentativo. Em grandes indústrias essa opção se torna economicamente inviável uma vez que o custo energético para esterilização afeta negativamente o custo final do produto. (BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR, 1983; RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

Outra opção de tratamento para a contaminação microbiana é através de ácido, que ao mesmo tempo também causa estresse à levedura, reduzindo a eficiência fermentativa (AMORIM *et ai.*, 1996).

Devido a diferenças morfológicas e fisiológicas entre leveduras e bactérias há possibilidade de utilizar alguns antimicrobianos (Cloranfenicol) no controle das bactérias, os quais minimizam os danos causados sobre a fermentação.

#### **2.2.2.6 Subprodutos**

A produção de etanol também pode vir a ser reduzida por fatores metabólicos uma vez que durante a fermentação uma sequência de reações ocorrem objetivando a produção de ATP. Algumas rotas de metabolismo se apresentam como alternativas para favorecer a obtenção de materiais necessários à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos) e também para a formação de outros produtos de interesse metabólico. (NOBRE *et al.*, 2007)

Esses produtos estão relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência da levedura e podem causar a redução na produção do álcool, são eles: glicerol, os ácidos orgânicos, principalmente o succínico e o acético. Juntos com a biomassa são os subprodutos em maior quantidade e os principais relacionados metabolicamente ao equilíbrio redox celular em anaerobiose. (FERNANDES, 2008)

A formação desses subprodutos depende principalmente também do tipo de matéria-prima, a linhagem de levedura empregada e o processo de fabricação de etanol. A quantidade de cada subproduto formada é dependente do estresse causado às leveduras, geralmente por

contaminação bacteriana, altas temperaturas, carência ou excesso de nutrientes e tratamento ácido incorreto.

O glicerol é o composto secundário encontrado em maior quantidade. É formado em decorrência de estresses físicos (pressão osmótica), químico (presença de sulfito no mosto) e microbiológico (contaminação bacteriana). Em geral, é uma resposta ao estresse osmótico quando se trabalha com altas concentrações de açúcares ou sais no mosto (PACHECO, 2012).

### 2.2.2.7 Substrato

A levedura consegue utilizar diversos substratos e além de possuírem os nutrientes necessários e fontes de carbono corretas para o crescimento celular, é essencial que o meio fermentativo apresente a concentração adequada de açúcares. (HEARD, 1993)

Mesmo conteúdo oxigênio, meios com níveis elevados de glicose (concentração de açúcares maior que 150 g/L) inibem a síntese de enzimas respiratórias, assim, inativando as mitocôndrias e reprimindo a respiração das leveduras o que leva a fermentações incompletas e geração de ácidos e glicerol. (ARRUDA et al., 2003; BARNABÉ et al., 2005; HORII, 1999; SHANKAR et al., 2014)

Leveduras em geral crescem bem em meios contendo amido ou açúcar, fonte de nitrogênio e sais para suprir a necessidade de minerais. Porém para obter-se condições melhores de fermentação e o produto desejado existe a necessidade de selecionar fontes de carbono adequadas que suprem a biossíntese das células e a geração de energia. (WANG et al., 1979)

Em especial a *Saccharomyces cerevisiae* fermenta substratos que contêm açúcares do tipo glicose, frutose e sacarose, basicamente os que compõem a cana-de-açúcar. Em especial para essa levedura a glicose também atua como uma reguladora global do crescimento celular (REIFENBERGER et al., 1997; LILLY, 1979)

Para a solução ou diminuição de todos os problemas citados anteriormente é fundamental desenvolver um importante campo de pesquisa relacionado às fermentações alcoólicas: a busca por novas linhagens de leveduras. Essas leveduras devem possuir alta tolerância à temperatura e etanol para que sejam capazes de produzir fermentados com altas concentrações de álcool e também identificar os fatores relacionados à condição atual de processo que impedem a condução

do processo de fermentação no limite da tolerância das leveduras industriais. (STEENSELS et al., 2014)

A junção desses fatores numa linhagem de levedura seria bastante atrativa uma vez que ocasionaria a redução no consumo de água de resfriamento, redução no volume de substrato e no consumo de energia nas indústrias do mundo todo. De uns anos para cá, Alguns produtores de bebidas fermentadas estão realizando seus processos contando com uma microflora local na tentativa de introduzir características únicas em seus produtos, tornado-os mais autênticos. (STEENSELS et al., 2014)

Com os estudos crescentes sobre leveduras presentes em habitats diversos, e pelo avanço especialmente da engenharia genética e biotecnologia, se torna espontânea a utilização mais frequentemente destes microrganismos em processos tanto para aperfeiçoá-los quanto para criar outros. O mercado da produção de fermentado é promissor quando se trata de novas espécies de leveduras, ainda existindo muitas possibilidades de exploração e descobertas nesta área. (OLIVEIRA, 2006)

### **2.2.3 Caldo da cana – de – açúcar**

Um dos fatores citados anteriormente como determinante para uma boa fermentação é o substrato, e o caldo da cana-de-açúcar é um ótimo meio para o crescimento de microrganismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos e pH. (SILVA, 1974).

O caldo de cana-de-açúcar comercial é uma matéria-prima consumida “in natura” no Brasil e é considerado de baixo custo comercial. Sua composição é formada basicamente por água (75-82%) e sólidos totais dissolvidos (18-25%). Os sólidos solúveis (°Brix) podem ser caracterizados como açúcares e não-açúcares orgânicos e inorgânicos e dentre os açúcares tem-se a sacarose (14,5-23,5%), glicose (0,2-1,0%) e frutose (0,0-0,5%) (SOCCOL et al., 1990)

As substâncias não-açúcares orgânicos representam de 0,8-1,5% da composição do caldo de cana e são: matéria nitrogenada (proteínas, amidas, aminoácidos), gorduras e ceras, pectina, ácidos, materias corantes (clorofila, antocianina e sacaretina).

Os compostos inorgânicos (0,2-0,7%) são os minerais como sílica e principalmente potássio, além de P, Ca, Na, Mg, S, Fe, Al e Cl. (DELGADO, 1975)

Caracterizado como um líquido opaco, viscoso, cor parda ao verde escuro, a composição do caldo da cana varia de acordo com alguns fatores como idade da safra, meio ambiente (solo e condições climáticas como temperatura e precipitação pluviométrica), planejamento agrícola (maturação, colheita, manuseio, transporte e armazenamento), pragas e doenças (DELGADO, 1975; YOKOYA, 1995; FIORAVANTI, 2000; KITOKO; OLIVEIRA; SILVA, 2004)

O pH do caldo é pouco ácido variando entre 5 e 6, sendo mais comum no intervalo 5,2-5,4. Estes valores de pH associados a presença de altas concentrações de açúcares torna a garapa um produto altamente perecível em termos microbiológicos. (LEME Jr., & BORGES, 1965; MARTUCCI, 1983)

Tal produto se constitui num sistema coloidal muito complexo, no qual o meio de dispersão é a água. As partículas dispersas podem ser grosseiras (bagacilho, areia, terra, gravetos); coloidais (cera, gordura, proteínas, gomas, corantes, dextranas, amido); moleculares ou iônicas (açúcares, sais minerais, ácidos orgânicos) (COPERSUCAR, 1994; FIORAVANTI, 2000; KITOKO; OLIVEIRA; SILVA, 2004)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA PRIMA

##### **Isolamento, Identificação e Conservação das Leveduras**

As linhagens de leveduras utilizadas neste estudo foram isoladas de fermentações espontâneas do Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), Cacau (*Theobroma cacao*) e Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e identificadas pelo Método Molecular utilizando a região ITS no trabalho de mestrado “Diversidade genética de *Saccharomyces cerevisiae* isolados de frutos amazônicos com a finalidade de uso na produção de cerveja” pelo autor Prof. Msc. Luan Reis Honorato da Silva.

Foram utilizadas nove cepas provenientes da Coleção de Microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, seis cepas, isoladas do Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), sendo quatro delas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e duas *Lachancea fermentati*, do Cacau (*Theobroma cacao*) foi isolada a *Torulaspota delbrueckii* e do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) a *Pichia kudriavzevii*.

Além dessas, uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* comercial foi utilizada no processo de produção de etanol a partir de glicose para fins comparativos.

Para melhor identificação ao longo do estudo, as amostras de leveduras foram nomeadas a partir das iniciais de seus respectivos frutos, dos quais foram isoladas, e com o número de sua amostra em trabalho anterior. (HONORATO, 2019)

Tabela 1: Leveduras e nomenclatura de identificação.

LEVEDURA	NOMECLATURA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cat 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AR 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AR 12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AR 13
<i>Lachancea fermentati</i>	AR 14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AR 15
<i>Lachancea fermentati</i>	AR 16
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CC 15
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CP 18

As leveduras foram reativadas em meio “*yeast malt Agar*” (YMA) conforme metodologia de Wickerman (1951), meio composto por 2 g/L de glicose; 3 g/L de extrato de levedura; 3 g/L de extrato de malte; 5 g/L de peptona; 0,1 g/L de cloranfenicol; 20 g/L de ágar e 1000 mL de água destilada. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 48 horas.

Das melhores placas, isentas de contaminação, foram isoladas em tubos com YMA as respectivas leveduras para servirem de cultura pura (cultura mãe). O estudo e seleção das linhagens potencialmente produtoras de álcool foram realizados no Laboratório de Micologia do INPA coordenado pelo Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza.

## 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Preparo do Inóculo Para Fermentação Alcoólica

As células de leveduras foram transferidas, por alçada, da cultura estoque (cultura pura) para tubos contendo 10 mL de meio Caldo Extrato de Malte (extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L, glicose 10 g/L) e incubada por 48 horas até pleno crescimento na superfície. (HANG et al., 1981)

De acordo com o esquema da Figura 2, o conteúdo líquido contendo meio e biomassa foi despejado em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de meio Caldo Extrato de Malte (descrito acima) e cultivado por mais 48 horas, temperatura ambiente e shaker a 100 rpm. (HANG, 1981)

O objetivo foi obter uma concentração de aproximadamente  $10^7$  células/mL, quantificada através de contagem em câmara de Neubauer, que é a concentração ideal como inóculo empregado no início de uma fermentação. (PATO, 1998; STANBURY, 1995)

Figura 4 – Esquema de propagação do inóculo.



Fonte: Hang, 1981.

### 3.2.2 Preparo do Mosto e Fermentação Alcoólica

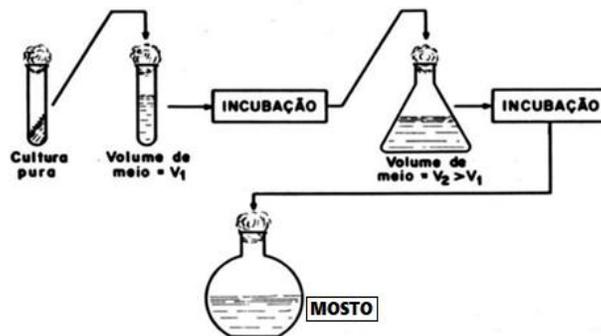
A metodologia proposta por Dias et al., (2003, 2007) será utilizada para a preparação do mosto. O caldo de cana, obtido no município de Balbina (AM) da plantação do Sítio Vitória localizado na AM 240 km 37 margem esquerda, foi estabilizado para o total de sólidos solúveis a 16° Brix com a adição de 130g de açúcar de cozinha (sacarose da marca União - refinado) e foi esterilizado em autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

Todo o conteúdo do inóculo, preparado no item 3.2.1 anteriormente, foi despejado em frascos erlenmeyer de 0,5 L contendo 0,3 litro do caldo de cana já esterilizado e estabilizado (Figura 5).

A fermentação alcoólica foi realizada em batelada, sob temperatura ambiente, sem agitação e acompanhada através do consumo dos açúcares via avaliação do teor de sólidos solúveis totais. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas para avaliação de pH e açúcares redutores totais.

O processo foi acompanhado por 96 horas (4 dias) e feito em triplicata.

Figura 5 – Esquema de propagação do inóculo juntamente ao preparo do mosto.



Fonte: Hang, 1981.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

O fermentado alcoólico obtido foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH, sólidos solúveis (°Brix), açúcares redutores totais, seguindo metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Microsoft Excel®.

#### 3.3.1 Determinação de pH

O pH foi medido diretamente em pHmetro digital de bancada modelo Q400AS da marca Quimis.

#### 3.3.2 Determinação de Sólidos Solúveis

O teor de sólidos solúveis (° Brix) foi determinado com auxílio de refratômetro portátil modelo T-DIV0070.00 marca Incoterm.

#### 3.3.3 Açúcares Redutores Totais

A análise foi realizada pelo método DNS conforme descrito por Vasconcelos et al., (2013). Para a quantificação dos açúcares redutores totais foi adicionado 500 uL de solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (reagente DNS) e diluição adequada de cada amostra para completar 1000 uL e obter absorvância dentro do limite de absorvância da curva padrão. A mistura então foi aquecida por 5 minutos em banho-maria e após resfriamento foram realizadas leituras em espectrofotômetro (marca Femto e modelo 700 Plus) a 540 nm.

Como branco foi empregada uma mistura de 500 uL de água e 500 uL de solução de DNS. Os resultados foram calculados através de correlação com curva padrão de glicose preparada nas concentrações de 0,1 em 0,1 g/L numa faixa de 0 até 1 g/L e da seguinte equação:

$$ART = abs . f . d$$

Onde:

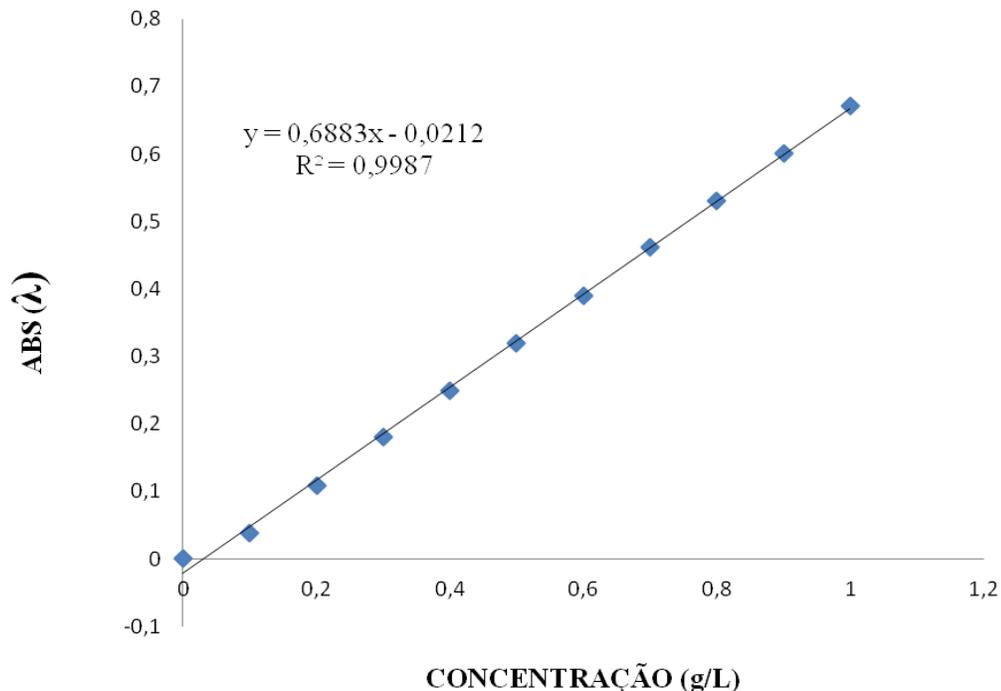
Abs é a média das absorvâncias lidas;

f é o fator de concentração (1/coef. angular);

d é o inverso da diluição da amostra.

A seguir a curva padrão obtida:

Figura 6 – Curva padrão para análise DNS.



Fonte: própria.

### 3.4 TESTES PARA A LEVEDURA

A capacidade fermentativa, tolerância ao etanol e capacidade de floculação foram realizadas segundo Guimarães (2005) com as células de leveduras captadas no início da fermentação e a viabilidade celular no início e final da fermentação, de acordo com Pierce (1970). Os procedimentos foram executados em triplicata e todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Microsoft Excel®.

#### 3.4.1 Teste de Capacidade Fermentativa

As leveduras foram inoculadas em tubos, contendo em seu interior tubos de Durhan e 10 mL de meio líquido YP (extrato de levedura e peptona) acrescentado da fonte de carbono a ser testada [glicose 2 g (p/v), sacarose 2 g (p/v), maltose 2 g (p/v), frutose 2 g (p/v), e xilose 2g (p/v)].

Foram mantidos em temperatura ambiente e durante 48 horas, observado o crescimento das leveduras e a formação de gás.

### **3.4.2 Teste de Tolerância ao Etanol**

As leveduras foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de meio líquido YP (extrato de levedura e peptona) adicionado de glicose (2% p/v) e de etanol nas concentrações variáveis de 5% (v/v), 10% (v/v) e 15% (v/v), seguida de incubação a temperatura ambiente durante 48 horas.

### **3.4.3 Teste de Flocculação**

As leveduras selecionadas foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de meio líquido YP (extrato de levedura e peptona) com glicose (2% p/v) e deixados em temperatura ambiente durante 48 horas. Após este período, foram levadas à agitação em aparelho vórtex para visualização da formação de flocos.

### **3.4.4 Determinação da Viabilidade Celular de Levedura**

A viabilidade celular da levedura foi realizada através de microscopia óptica, considerando leitura de células viáveis e não viáveis presentes no quadrante C em câmara de Neubauer. A contagem no quadrante C foi realizada em 5 sub-quadrantes, os 4 dos cantos e o sub-quadrante central. A contagem das células viáveis e não viáveis foi feita através da coloração diferencial das células vivas com azul de metileno.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

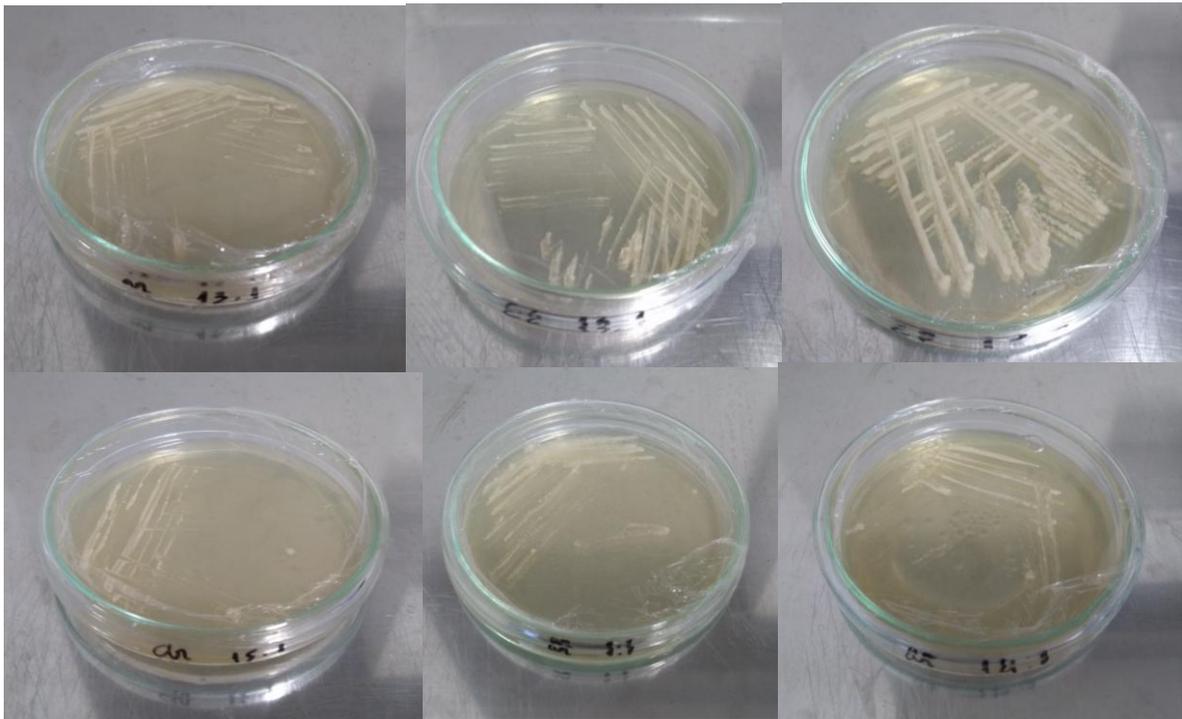
### 4.1 MICRORGANISMOS

A etapa inicial do trabalho consistia em reativar as leveduras para que fossem utilizadas no estudo. Os microrganismos em questão vinham sendo conservados em tubos inclinados com meio YMA mantidos a uma temperatura amena.

Como descrito no item 3.1, as leveduras foram inoculadas em placas contendo meio “*yeast malt agar*” (YMA) com antimicrobiano (cloranfenicol) e incubadas a temperatura ambiente por 48 horas.

O resultado da reativação pode ser visto a partir na Figura 2.

Figura 7 – Leveduras reativadas em placas.



Fonte: própria.

Todas as leveduras apresentaram morfologia semelhantes, colônias de cor branca ou creme e aspecto liso. Características descritas também em Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (2017).

Algumas placas, mesmo com antibiótico na composição do meio, sofreram com a ação de outros microrganismos e foram contaminadas como mostra a Figura 8:

Figura 8 – Placas contaminadas.



Fonte: própria.

A contaminação, possivelmente, ocorreu devido ao contato da placa com meio externo (ar livre contendo diversos microrganismos) no momento de transferência das leveduras. Pelo aspecto filamentosos, julgou-se ser outro fungo o microrganismo contaminante, porém lembrando também da presença de bactérias no ar. As placas foram descontaminadas e conteúdo descartado.

Com isso, a inoculação para a cultura pura final foi feita a partir da seleção das melhores placas (sem contaminação) e repique de colônias isoladas no meio para tubos contendo YMA. Na Figura 9 observa-se o resultado das leveduras como estoque de cultura pura, posteriormente utilizadas na preparação do inóculo para a fermentação:

Figura 9 – Cultura pura.

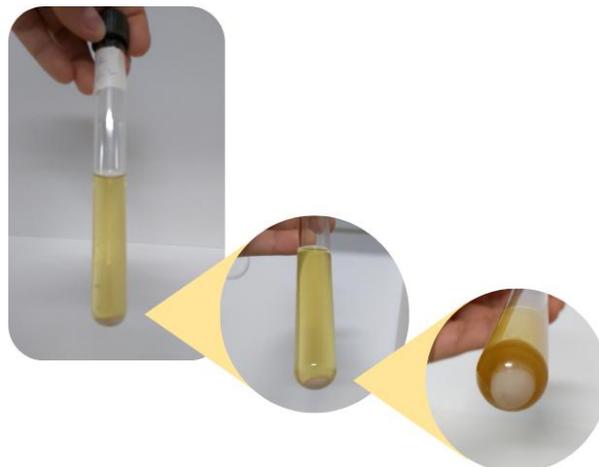


Fonte própria.

#### 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A segunda etapa do trabalho representou o início da propagação das leveduras em meio líquido. Com a cultura pura definida, esses microrganismos foram transferidos para tubos com meio caldo extrato de malte e ali mantidos, sem agitação, por dois dias a temperatura ambiente. A Figura 10 seguir representa um exemplo de como as leveduras permaneceram nos tubos com meio líquido ao final das 48 horas de inóculo.

Figura 10 – Células de leveduras em tubo com meio líquido.

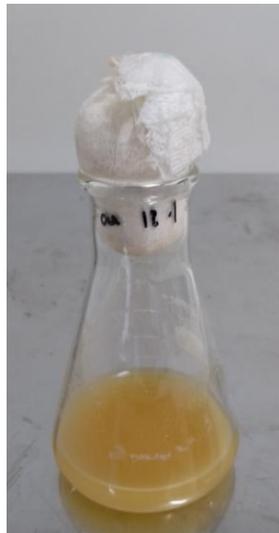


Fonte: própria.

As células de leveduras decantaram e no fundo do tubo pôde-se observar a homogeneidade da cultura de leveduras, de cor esbranquiçada e, além disso, a ausência de contaminação.

Após as primeiras 48 horas de inoculação em meio líquido, o conteúdo dos tubos foi transferido para erlenmeyers com 300 mL de caldo extrato de malte. A propagação de leveduras continuou por mais 48 horas em shaker a uma rotação de 100 rpm. O resultado pode ser observado na Figura 11:

Figura 11 – Erlenmeyer com inóculo.



Fonte: própria.

Visualmente nenhuma contaminação foi identificada nas amostras, todas se mantiveram homogêneas e sem formação de flocos.

De acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 3.2.1, a concentração ideal para dar início ao processo fermentativo é a partir de  $10^7$  células/mL, com isso a contagem de células da levedura foi feita a partir da câmara de Neubauer em microscópio e na Tabela 2 encontram-se as concentrações médias obtidas.

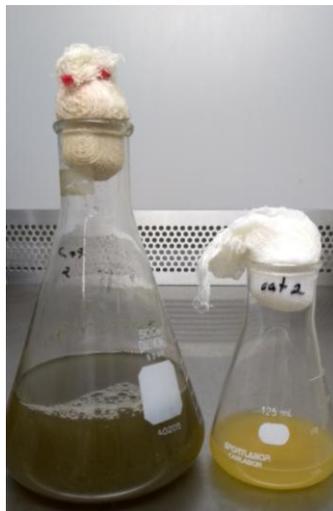
Tabela 2: Concentração de células para o inóculo inicial de cada levedura.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (células / mL)
Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	$6,9 \times 10^7$
AR 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	$6,3 \times 10^7$
AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	$7,6 \times 10^7$
AR 13 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	$4,45 \times 10^7$
AR 14 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	$8,3 \times 10^7$
AR 15 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	$3,45 \times 10^7$
AR 16 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	$1,92 \times 10^7$
CC 15 ( <i>Torulaspora delbrueckii</i> )	$4,15 \times 10^7$
CP 18 ( <i>Pichia kudriavzevii</i> )	$2,75 \times 10^7$

Os dados obtidos mostram que as amostras se apresentaram adequadas em relação à concentração para inóculo inicial da fermentação. As concentrações mais baixas foram para a AR 16 (*Lachancea fermentati*) e CP 18 (*Pichia kudriavzevii*), parâmetro que deve ser observado uma vez que a intensidade de respiração é diretamente proporcional à concentração celular. Em concentrações celulares mais elevadas, a intensidade do processo respiratório decresce em favor do processo fermentativo, logo, possuir mais células de leveduras favorece a fermentação. (KOCKOVÁ, 1990)

A Figura 12 apresenta mosto e inóculo antes da fermentação.

Figura 12 – Mosto e inóculo.

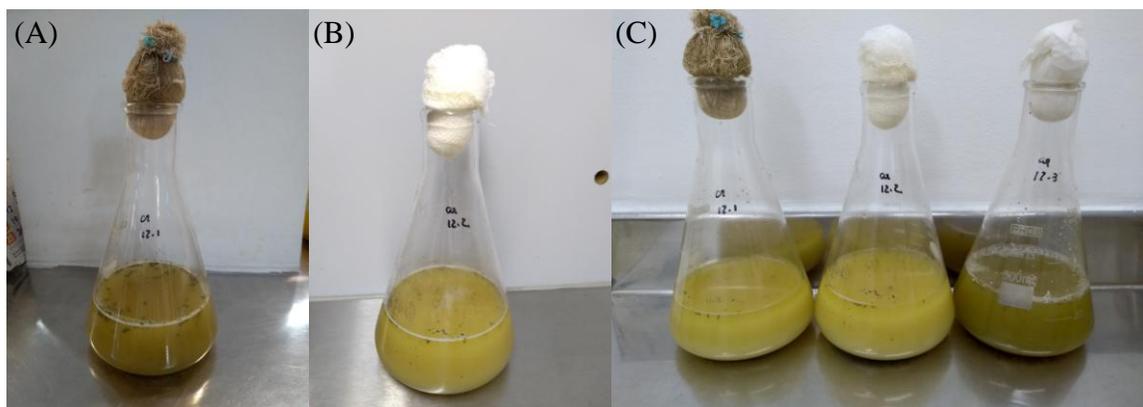


Fonte: própria.

Com isso, finalmente o conteúdo líquido dos erlenmeyers pôde ser transferido ao mosto (caldo de cana) e o processo fermentativo iniciado. A fermentação foi acompanhada por 96 horas, a temperatura ambiente e sem agitação. Em intervalos de 24 horas eram retirados 10 mL de cada amostra para análises posteriores.

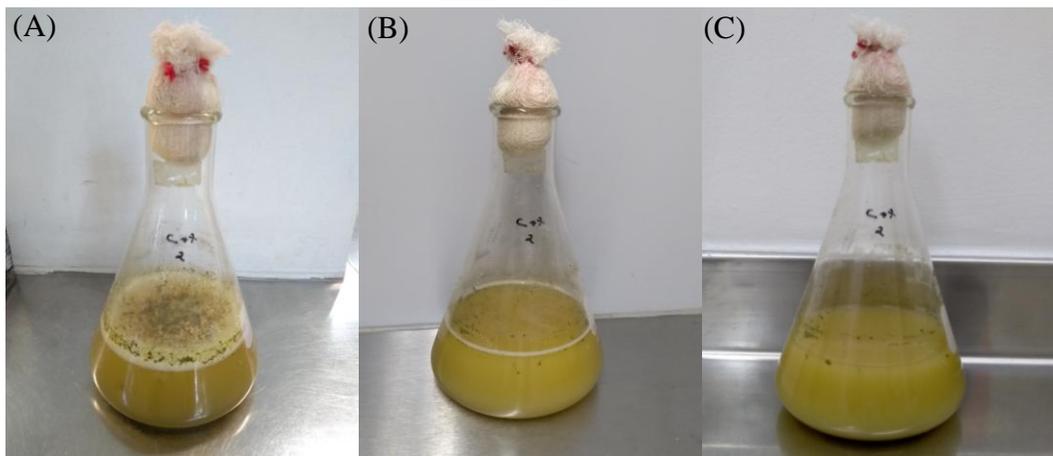
A seguir amostras de leveduras durante os dias de fermentação.

Figura 13 – Fermentações da AR 12 (*Saccharomyces cerevisiae*) durante (A): 24h; (B): 48h; e (C): 96h.



Fonte: própria.

Figura 14 – Fermentações da Cat 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) durante (A): 24h; (B): 48h; e (C): 96h.



Fonte: própria.

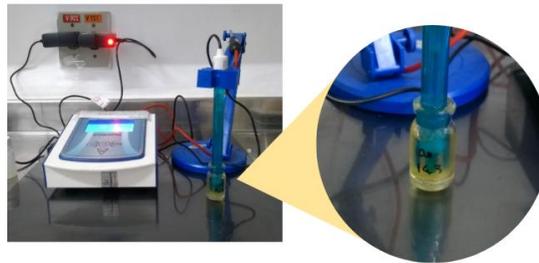
Notou-se a mudança de cor do mosto e o desprendimento de bolhas durante todo o processo fermentativo. Esse aspecto indica a conversão do açúcar em etanol mais gás carbônico através do metabolismo das leveduras.

### 4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.3.1 Determinação de pH

O pH das amostras foi determinado com o pHmêtro onde a tensão gerada pelo eletrodo é lida e convertida para uma escala de pH. A seguir o eletrodo submerso em amostra.

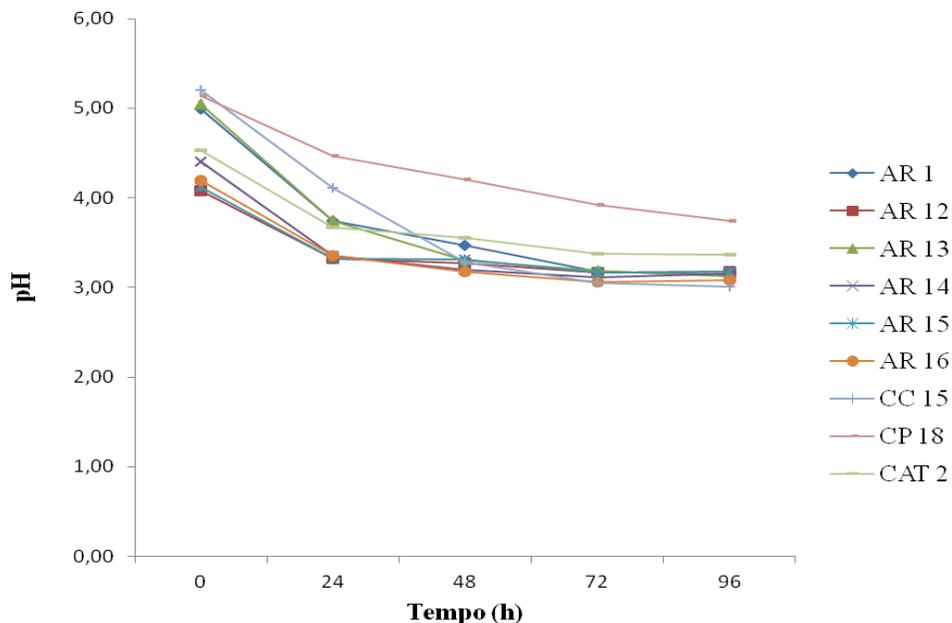
Figura 15 – Medida de pH.



Fonte: própria.

O pH de todas as amostras foi medido a cada 24 horas e plotado no gráfico abaixo:

Figura 16 – Gráfico pH.



Fonte: própria.

O pH das leveduras mantiveram-se numa faixa de 5,21 a 3,01, que de acordo com a literatura os valores foram adequados para o crescimento e sobrevivência dos microrganismos (3,5 e 6), porém na indústria o valor ideal de pH é de 4,5 até 5,5. (ARRUDA et al., 2003; BARNABÉ et al., 2005; SHANKAR et al., 2014)

A *Sacharomyces cerevisiae* em específico possui pH ótimo para a produção de etanol entre 4 e 5, o que ocorreu inicialmente nas fermentações, todos se encontraram nessa faixa, porém ao final o pH manteve-se menor que 4. Uma das suposições para tais valores de pH abaixo da média é o aumento da produção de ácido láctico e acético devido à contaminação de bactérias. (MAIA, 1989; AMORIM et al., 1996)

O trabalho de Natarajan et al., (2012) mostrou condições ideais para a produção de etanol a partir da *Lachancea fermentati*, dentre elas está o valor de pH 5,4, um pouco menos ácido que os resultados acima obtidos. O pH da levedura em questão acompanhou a média dos valores das de outras leveduras, com isso, acredita-se que seu caráter mais ácido não afetou negativamente a fermentação.

*Torulaspora delbrueckii* é capaz de sintetizar concentrações mais elevadas de ácidos lácticos e succínio, quando comparada a *S. cerevisiae* como pode ser percebido pelo gráfico ao final das fermentações, o pH da *T. delbrueckii* foi inferior ao de todas as leveduras *S. cerevisiae*. (PANAGIOTIS et al., 2013). Em outro estudo o pH ao final de uma fermentação da *Torulaspora delbrueckii* foi de 3,33. (FERREIRA, 2018).

Nos dados obtidos a levedura *P. kudriavzevii* obteve o pH menos ácido, semelhante à pesquisa de Tralli (2019) que conduziu fermentações com a levedura citada e chegou a um pH ótimo de 3,5 o qual as células se mantiveram viáveis, produzindo uma concentração de etanol elevada (8,30 g/L).

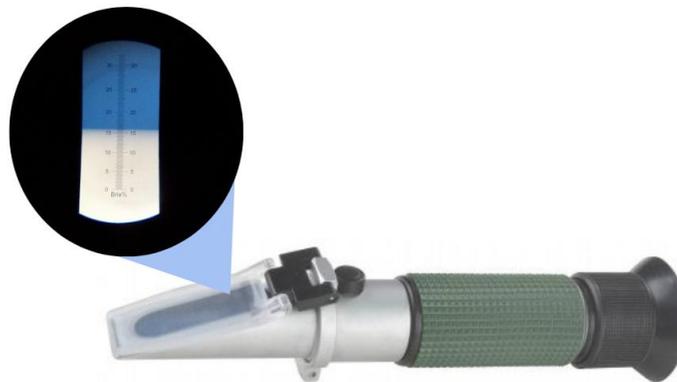
Nota-se também que a maior redução de pH ocorreu nas primeiras 24 horas de fermentação, pós 48 e 72 horas esse valor se estabiliza. Fatos confirmados pelo estudo de Santos et al. (2018) que fermentou duas leveduras comerciais e obteve resultados semelhantes em relação a maior queda de pH nas primeiras horas de fermentação, também representando a fase de maior crescimento populacional de leveduras e maior metabolismo.

Segundo Schmidell et al. (2001), mais um motivo da baixa de pH é o aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, bem como com a produção de ácidos orgânicos, na fase anaeróbica do metabolismo das leveduras. Além disso é importante ressaltar que a diminuição do pH para menos que 4,40 é desfavorável a bactérias dos gêneros Enterobacter e Citrobacter que morrem nestas condições e excluem a possibilidade de contaminação pelos microrganismos desta classificação.

#### 4.3.2 Determinação de Sólidos Solúveis

Os sólidos solúveis foram quantificados pelo refratômetro através do grau Brix de cada amostra. A medida de 1°Brix representa 1g de compostos solúveis totais a cada 100g de solução. Os fermentados foram colocados no equipamento (Figura 17) e o grau lido.

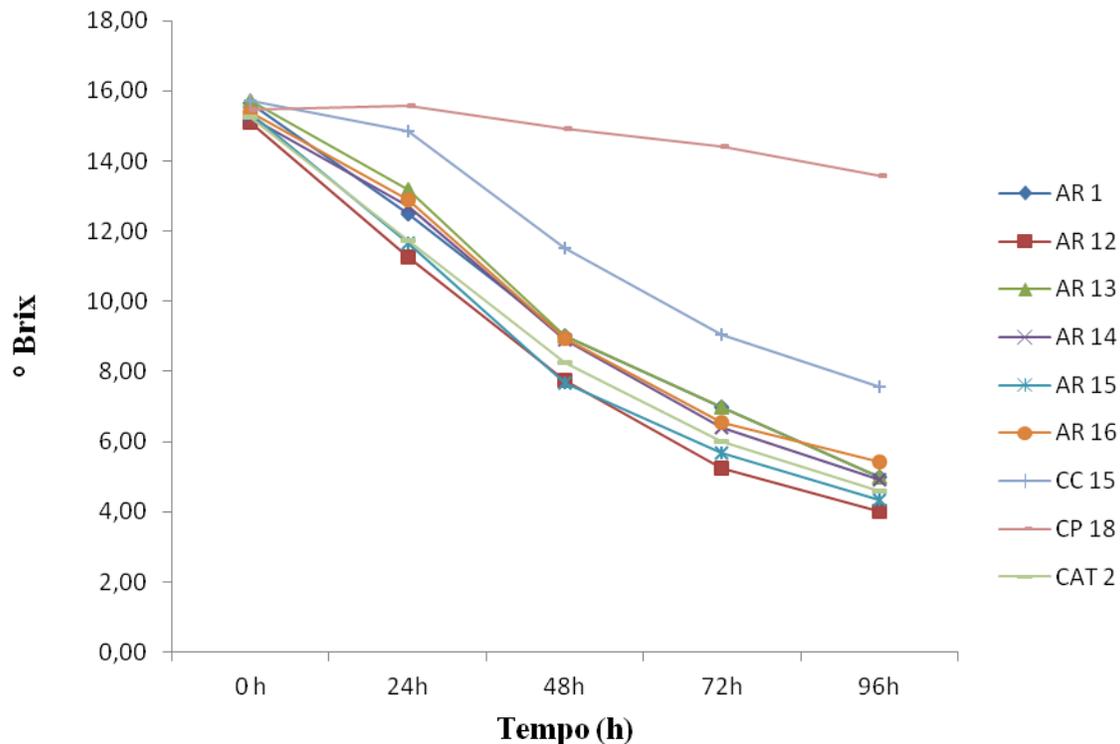
Figura 17 – Refratômetro.



Fonte: própria.

O grau Brix foi medido a cada 24 horas e plotado no gráfico como mostra a Figura 18.

Figura 18 – Gráfico grau Brix.



Fonte: própria.

A média inicial do grau Brix de todas as fermentações foi de 15,4°, o que de acordo com Andrade e Cardoso (2004) é um valor ideal para o início do processo uma vez que concentrações de açúcares maiores ocasionam fermentações incompletas e mais lentas além de afetarem a multiplicação das leveduras.

A média da taxa de redução do grau Brix das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foi de 70,3% quando comparados o primeiro e último dias de fermentação. Essa porcentagem de redução vai de encontro com o trabalho de Corazza et al., (2000) que também estudou fermentações com tal espécie de levedura, onde seu Brix inicial foi de 26,5° e final de aproximadamente 96 horas foi de 8,0° (redução de 68,8%).

Corazza et al., (2000) também observa que nas primeiras 30 horas de fermentação, o processo é tumultuoso, com rápido consumo do açúcar do mosto, ou seja, alta atividade dos microrganismos, também visto pela Figura 18 a maior queda nas primeiras 48 horas. Após isso observou-se menor atividade das leveduras e assim menores diferenças de redução do grau Brix.

A *Lachancea fermentati* (AR 14 e AR 16) seguiu um perfil semelhante à *Saccharomyces cerevisiae* (CAT2, AR 1, AR 12, AR 13, AR 15). Observou-se a redução do grau Brix com o passar do tempo, revelando o consumo dos açúcares pelos microrganismos, e de forma geral, a evolução do processo de fermentação alcoólica. (MASSON et al., 2015)

A *Torulaspora delbrueckii* apresentou a segunda menor redução de grau Brix, com aproximadamente 52% a menos que o Brix inicial. Quincozes (2018) utilizou esta mesma levedura em processos fermentativos e obteve desempenhos mais lentos quando comparada à *S. cerevisiae*. O teor alcoólico obtido com *T. delbrueckii* foi o menor entre os tratamentos do autor e apresentou o maior valor com relação aos teores de açúcares residuais.

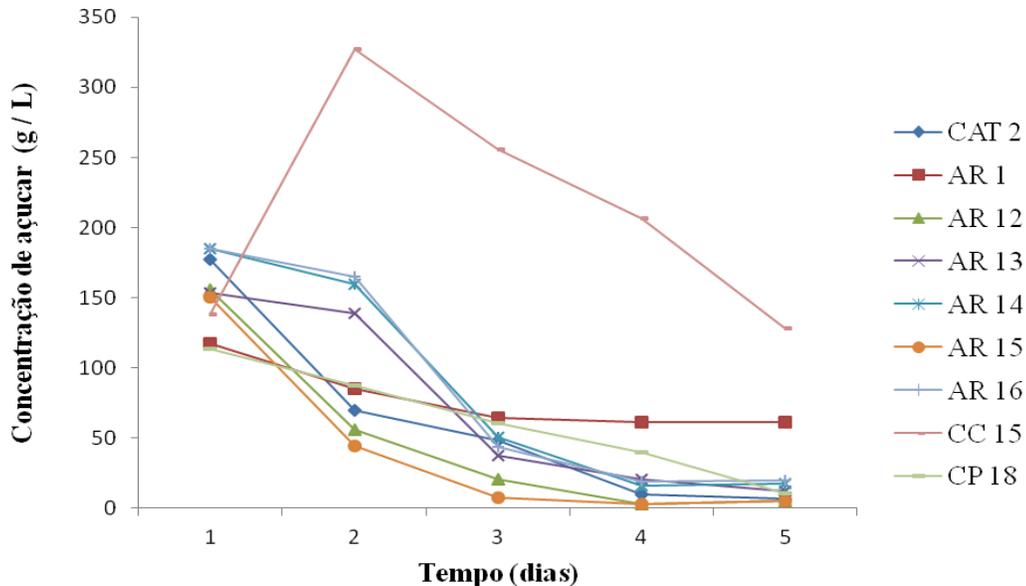
Belda et al, (2015) também relatou um menor poder fermentativo da *Torulaspora delbrueckii* em comparação com cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente nos estágios finais de fermentação, devido a alta demanda de nutrientes por parte destas leveduras.

A menor taxa de redução no grau Brix, obtida pela *Pichia kudriavzevii*, mostra que provavelmente o processo foi dificultado pela presença de algum tipo de microrganismo inesperado e infeccioso para as leveduras, dificultando a reprodução e respectiva conversão dos açúcares em etanol.

### **4.3.3 Açúcares Redutores Totais**

Os açúcares redutores totais foram quantificados a partir de reação da amostra com o reagente DNS e leitura no espectrofotômetro à absorbância igual a 540nm.

Figura 19 – Gráfico ART.



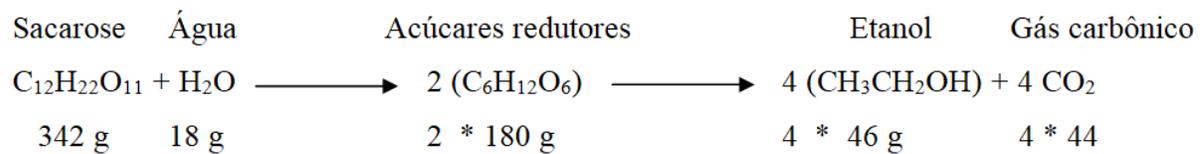
Fonte: própria.

De acordo com a Figura 19 observou-se que o comportamento da curva de consumo de açúcares das leveduras AR 15, AR 12 e CAT 2 é semelhante, todas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Maior taxa de consumo do substrato nas primeiras 24 horas indicando alta atividade metabólica pela levedura. Apenas após 48 horas a curva se estabilizou.

Em contrapartida as leveduras *Lachancea fermentati* (AR 14 e AR 16) consumiram substrato em maior grau entre 24 e 48 horas, se estabilizando apenas após 72 horas. O perfil de ambas coincidem uma com a outra.

A *Torulaspora delbrueckii* apresentou um perfil de concentração diferente das demais leveduras. Inicialmente sua quantidade de açúcares aumentou e após 24 horas começou a decair indicando a presença de possíveis contaminantes na fermentação.

Para a quantificação teórica de álcool produzido foi utilizado a seguinte relação estequiométrica:



Então, 360 g de açúcares redutores totais consumidos, 184 g de álcool são produzidos. Com isso, calculou-se a diferença entre concentrações inicial e final de açúcares e com o delta determinado foi obtido o etanol teórico produzido. Os resultados se encontram na Tabela 3:

Tabela 3: Quantidades de consumo de açúcar e produção de etanol.

AMOSTRA	Consumo total de açúcares (g / L)	Produção de etanol (g / L)
Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	170,33	87,06
AR 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	55,81	28,52
AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	151,07	77,21
AR 13 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	141,26	72,20
AR 14 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	167,56	85,64
AR 15 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	145,15	74,19
AR 16 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	165,34	84,51
CC 15 ( <i>Torulaspora delbrueckii</i> )	10,55	5,39
CP 18 ( <i>Pichia kudriavzevii</i> )	102,72	52,50

Como esperado, a maior produção teórica de etanol foi obtida pela levedura comercial Cat 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) seguidamente pelas cepas da espécie *Lachancea fermentati*. As outras leveduras *Saccharomyces* obtiveram média 73 g / L de etanol.

Por outro lado, a *T. delbrueckii* obteve o pior desempenho, afirmando resultados obtidos em trabalhos anteriores que estudam que o uso dessa levedura é indicado para fermentações simultâneas com cepas de leveduras *Saccharomyces* para obtenção de melhores fermentações. (BELDA et al., 2015; BREDA et al., 2015).

Isso leva a crer que a *Saccharomyces cerevisiae* possui a capacidade de produzir mais álcool, com a mesma quantidade de açúcar, do que a *Torulaspora delbrueckii*.

#### 4.4 TESTES PARA A LEVEDURA

##### 4.4.1 Teste de Capacidade Fermentativa

O teste de capacidade fermentativa possuiu o intuito de observar quais açúcares são assimiláveis pelas leveduras, as mesmas foram inoculadas em tubos contendo meio e os diferentes açúcares testados (glicose, sacarose, maltose, frutose e xilose). Os tubos de Durhan atuaram como indicadores de produção de CO<sub>2</sub> uma vez que em seu interior é possível analisar a formação de bolhas, característica do processo fermentativo.

A seguir a Tabela 4 traz um resumo de como as leveduras se comportaram diante destes compostos orgânicos:

Tabela 4: Assimilação de açúcares pelas leveduras.

Levedura	Glicose	Sacarose	Maltose	Frutose	Xilose
Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	+	+	-
AR 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	+	+	-
AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	+	+	-
AR 13 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	+	+	-
AR 14 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	+	+	+	+	-
AR 15 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	+	+	-
AR 16 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	+	+	-	-	-
CC 15 ( <i>Torulaspora delbrueckii</i> )	+	+	+	+	-
CP 18 ( <i>Pichia kudriavzevii</i> )	+	+	+	-	-

Como esperado, todas as leveduras foram capazes de utilizar a glicose e sacarose para suas atividades metabólicas, porém nenhuma apresentou assimilação para com a xilose.

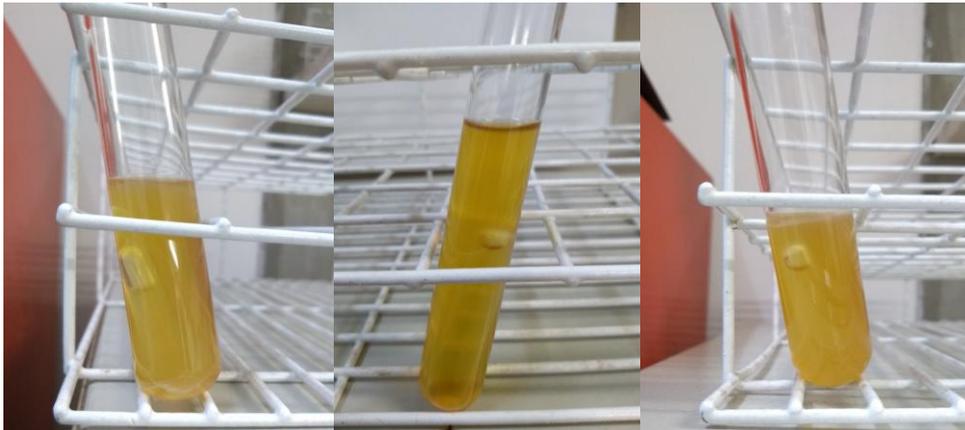
De acordo com SÁ (2012) leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de assimilar glicose, frutose, sacarose e maltose, o que de fato pôde ser percebido com a Tabela 4. Cem por cento dos microrganismos desta espécie apresentaram atividade positiva quando

colocados à frente dos açúcares citados. Mais recentemente, Martins et al., (2016) confirmou a assimilação de açúcares dos tipos: glicose, maltose e sacarose pela *S. cerevisiae*.

Em outro trabalho, Silva et al. (2015) produziu etanol a partir de fermentações com *S. cerevisiae* isoladas de frutos do centro-oeste brasileiro utilizando frutose como fonte de carbono, o que mais uma vez confirma a absorção deste açúcar pela levedura em questão.

A Figura 20 apresenta o resultado positivo nos tubos de ensaio onde a produção de gás carbônico pôde ser evidenciada, indicando a fermentação do substrato.

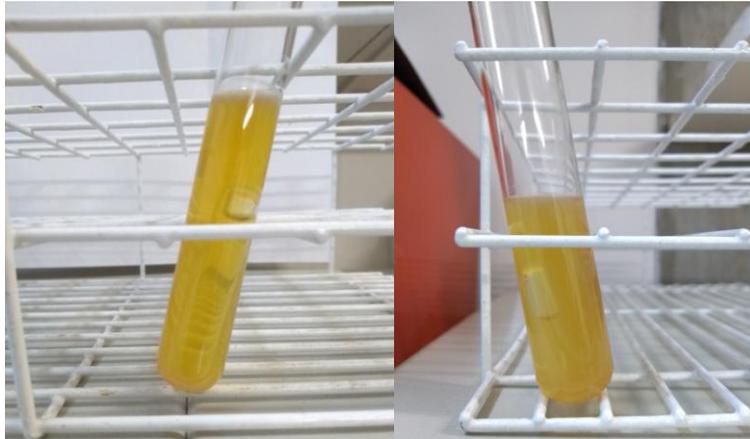
Figura 20 – Cat 2 em glicose, AR 1 em frutose e AR 13 em maltose, respectivamente.



Fonte: própria.

De acordo com a National Collection of Yeast Cultures, a *Lachancea fermentati* possui características fermentativas em meio semi-anaeróbico na presença de glicose, sacarose e maltose, também confirmado pelo presente trabalho pela cepa AR14, porém a AR16 não assimilou os açúcares maltose e frutose o que leva à possibilidade de contaminação microbiana, como pode-se ver na Figura 21.

Figura 21 – AR 14 e AR 16, respectivamente.

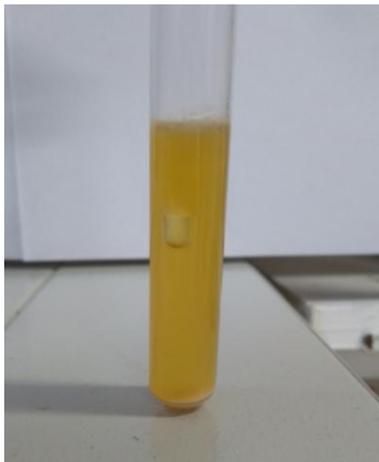


Fonte: própria.

A *Torulaspota delbrueckii* por sua vez também apresentou atividade frente aos açúcares glicose, sacarose, maltose e frutose, fato corroborado pelo trabalho de Michel et al., (2016) que confirma a capacidade de consumo de diferentes fontes de carbono pela levedura, dentre elas estão as moléculas orgânicas já citadas, podendo observa-se na Figura 22.

Porém, em alguns casos não há indícios de fermentação em relação à maltose como substrato, o que leva a conclusão de que o consumo de açúcares depende diretamente da cepa utilizada, no caso algumas se tornam incapazes de assimilar até mesmo o açúcar mais abundante do mosto, a maltose, e acabam produzindo bebidas com menor teor alcoólico. (MICHEL et al., 2016; CANÔNICO et al., 2016)

Figura 22 – *Torulaspota delbrueckii* em maltose.



Fonte: própria.

A levedura *Pichia kudriavzevii* mostrou indícios de metabolismo apenas para a glicose, sacarose e maltose. Estudos de Camargo (2013) e Andrade (2017) comprovaram a assimilação de glicose pela *P. kudriavzevii* a uma concentração de 10 g/L no meio. Esta levedura também é capaz de utilizar sacarose e maltose também a uma de 10 g/L de açúcar no substrato, além de converter frutose em 0,4 g Eth / L.h (ANDRADE, 2017), porém o que não foi observado na atual análise.

Figura 23 – Levedura Cp 18 em meio maltose e sacaraose respectivamente.



Fonte: própria.

Como dito anteriormente, nenhuma das leveduras foi capaz de metabolizar a xilose que é um açúcar abundante na hemicelulose (componente do bagaço da cana). Os autores Chandel et al. (2006) e Millati et al. (2005) afirmam que a *Saccharomyces cerevisiae* não metaboliza a xilose, nos experimentos de Basso (2019) nenhuma das leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* apresentou crescimento expressivo no açúcar citado.

Dentre vários microrganismos, Freita (2017) destaca que a espécie *Pichia kudriavzevii* apresenta capacidade de fermentar pentoses, porém a mesma não mostrou resultados de crescimento em Andrade (2017) a partir de meios constituídos de xilose nem em associação a outros açúcares, o que também confirma com o resultado do atual trabalho.

Em Maciel (2016), essa levedura produziu pequenas quantidades de álcool somente após 24h de inoculação, quando obteve seu pico de crescimento, o que pode ter influenciado no teste

de capacidade fermentativa uma vez que o experimento era apenas de 48 horas não foi suficiente para evidenciar a formação de bolhas de gás carbônico no interior do tubo de Durhan.

O autor ainda afirma que o isolado *P. kudriavzevii* exibiu tempo de fermentação prolongado e foi obtido um rendimento de etanol de 0,26 g/g apenas depois de 192h, o que mostra um retardo na fermentação, sugerindo que a presença de compostos inibidores no hidrolisado poderia ter causado o stress para as células não adaptadas, atrasando o crescimento celular e a capacidade de fermentação. Isto sugere que a estirpe, adaptada durante o cultivo prolongado no hidrolisado, necessita aclimatar às tensões específicas presentes no meio.

#### 4.4.2 Teste de Tolerância ao Etanol

Para obtenção de mais características específicas favoráveis às leveduras, as mesmas foram submetidas a meio com quatro concentrações diferentes de etanol, neste experimento também foram colocados tubos de Durhan no interior das amostras para que a verificação da formação de bolhas de CO<sub>2</sub> em seu interior fosse possível, o que indicaria o crescimento da levedura naquele meio e fermentação dos açúcares ali presentes, resultados obtidos na Tabela 5.

Tabela 5: testes de tolerância ao etanol.

Levedura	5 %	10 %	15 %	20 %
Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	-	-
AR 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	-	-
AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	-	-	-
AR 13 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	-	-	-
AR 14 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	+	-	-	-
AR 15 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+	+	-	-
AR 16 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	+	-	-	-
CC 15 ( <i>Torulaspota delbrueckii</i> )	+	+	-	-
CP 18 ( <i>Pichia kudriavzevii</i> )	+	+	-	-

Foi observada a ausência da bolha de CO<sub>2</sub> em todas as mostras que continham concentrações de 15% e 20% de etanol, resultado esperado uma vez que em estudos recentes as leveduras mostraram intolerância às essas altas concentrações de etanol. Em Guimaraes (2006)

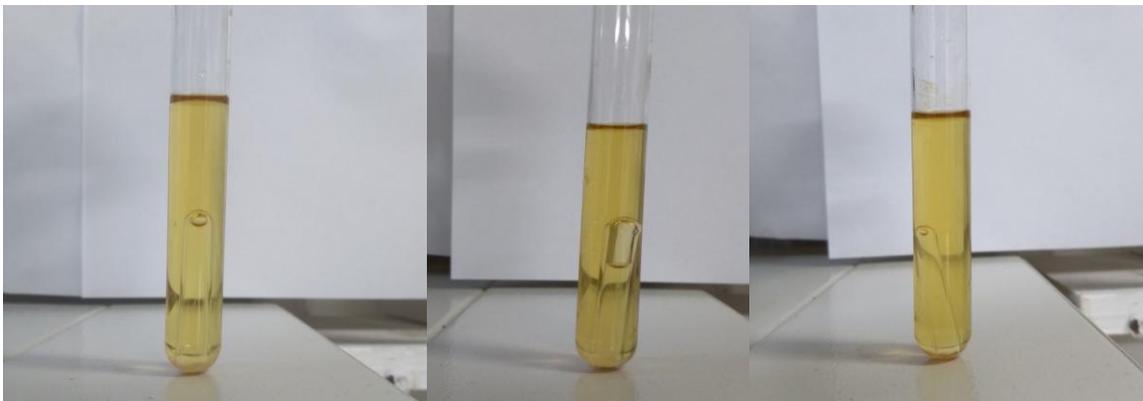
leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram analisadas e toleraram até 12% de etanol, a partir disso sua viabilidade celular decaiu significativamente.

O etanol acumulado na célula durante a fermentação apresenta efeitos nocivos para a levedura uma vez que reduz as atividades das enzimas glicolíticas, variações de 8% a 15% de álcool já alteram o transporte de glicose feito por essas enzimas. O etanol prejudica o fluxo de prótons e faz com que decresça as concentrações de nutrientes no interior da célula. (ALEXANDRE e CHARPENTIER, 1998)

Cem por cento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram resultado positivo em relação a concentração de etanol a 5%. Vários autores dissertam sobre como essa levedura tolera concentrações de etanol entre 7 e 12%, como Udomsaksakul et al. (2018) que em seu trabalho obteve sete cepas de *S. cerevisiae* isoladas de frutos que produziram fermentações e sobreviveram a essa faixa de teor alcoólico.

Contudo, como os níveis crescentes de etanol são tóxicos para a levedura causando danos ao DNA mitocondrial, degradando a membrana celular e finalmente causando sua morte, apenas três das cinco leveduras desse grupo sobreviveram a 10% de etanol. (UDOMSAKSAKUL et al., 2018)

Figura 24 – Leveduras AR 15, Cat 2 e AR 12 com presença de atividade.



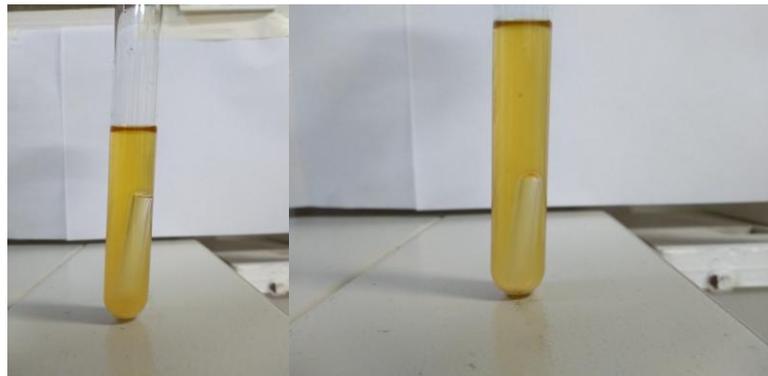
Fonte: própria.

As duas leveduras da espécie *Lachancea fermentati* mostraram atividade metabólica à 5% de etanol porém apenas 1 conseguiu fermentar e produzir bolhas de CO<sub>2</sub> a 10% de álcool.

De acordo com Albertin et al., (2014) a *Torulaspota delbrueckii* é incapaz de fermentar completamente um mosto, contudo, sua produção alcoólica é considerada elevada para uma levedura não-Saccharomyces, podendo chegar até em concentrações de 10%.

Fato comprovado pelo resultado obtido através da *T. delbrueckii* para o teste de capacidade de tolerância ao etanol realizada uma vez que a levedura apresentou indícios de fermentação quando submetida às duas concentrações de álcool de 5% e 10% como pode ser visto na Figura 25.

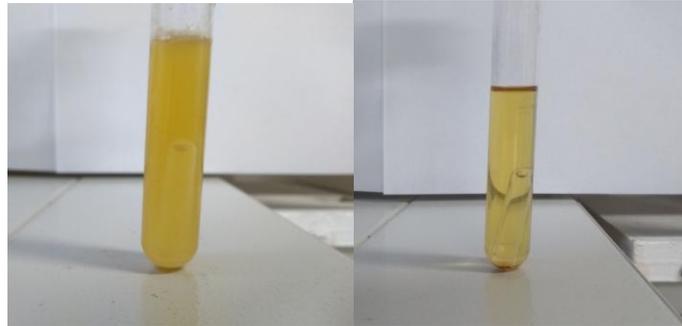
Figura 25 - *T. delbrueckii* a 5 e 10% de etanol.



Fonte: própria.

Semelhante à *T. delbrueckii*, a *P. kudriavzevii* também apresentou as mesmas condições positivas de fermentação em meio com 5% e 10% de álcool, resultado corroborado por BASSO (2019) onde, em seu estudo, relata o crescimento da levedura em substrato com 4% de etanol até 8%.

Figura 26 – *P. kudriavzevii* a 5 e 10% de etanol respectivamente.



Fonte: própria.

#### 4.4.3 Teste de Floclulação

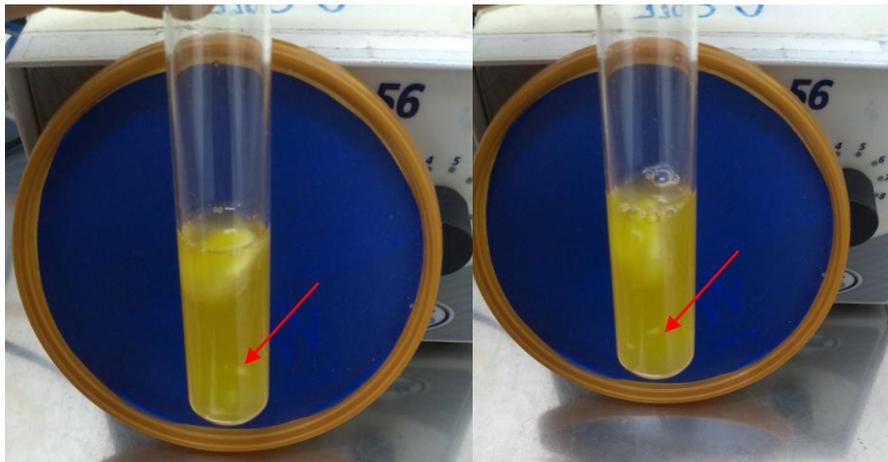
Outra característica apreciável em uma levedura fermentativa produtora de etanol é sua capacidade de floclulação. Alguns autores afirmam que é prejudicial ao processo fermentativo a levedura floclular, uma vez que torna-se incapaz de assimilar açúcar por mais tempo quando em flocos, outros estudos indicam que em grandes indústrias é uma vantagem a levedura floclular já que quando as mesmas decantam sua retirada dos tanques se torna mais fácil, não necessita de centrífugas, tornando assim o processo de clarificação de bebidas mais fácil e menos dispendioso. (BAI et al., 2008; ANDRIETTA et al., 2008, MA et al., 2009)

As leveduras foram testadas em meio líquido YP e após 48 horas foram levadas ao vórtex para observar a formação de flocos. Como descrito na Tabela 6 apenas uma levedura foi capaz de floclular, as células de *Torulaspóra delbrueckii* formaram agregados visíveis a olho nu e após agitação decantaram-se, diferentes das demais que as células suspensas se misturaram ao líquido deixando-o turvo e sem formação de flocos.

Tabela 6: Resultado teste de floculação.

Levedura	Floculação
Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	-
AR 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	-
AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	-
AR 13 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	-
AR 14 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	-
AR 15 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	-
AR 16 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	-
CC 15 ( <i>Torulaspota delbrueckii</i> )	+
CP 18 ( <i>Pichia kudriavzevii</i> )	-

Figura 27 – Flocos de levedura CC 15.



Fonte: própria.

Resultado que confirmou a formação de flocos na fermentação em meio caldo de cana utilizando a cepa CC15. Contudo, ao final das 96 horas todas as leveduras não - *Saccharomyces* apresentaram a formação de flocos. A Figura 28 mostram a diferença entre as amostras que não flocularam (células dispersas e meio mais turvo) e as que flocularam (meio mais claro e células agregadas ao fundo).

Figura 28 – Amostras não floculantes (*Saccharomyces cerevisiae*).



Fonte: própria.

Figuras 29 e 30 – Amostras floculantes (*Lachancea fermentati*)



Fonte: própria.

Essa divergência de flocculação das leveduras não – *Saccharomyces* entre o teste específico de flocculação e a formação de flocos durante o processo fermentativo pode ser devido a diversos fatores que influenciam no agrupamento de leveduras. Dentre eles estão fatores genéticos representados pelos fenótipos de flocculação, estes sensíveis a açúcares como manose, maltose, sacarose e glicose. (DOMINGUES, 2001; SOARES, 2010)

Fatores fisiológicos também afetam significativamente a porcentagem de flocculação, estudos apontam que células mais novas e com superfícies lisas flocculam menos que células mais

velhas e com paredes rugosas que por sua vez aumentam a o potencial da área de superfície de contato, superfícies lisas as quais as leveduras deste trabalho apresentam. (JIN e SPERRS, 1999).

Outros fatores como concentração de cálcio e sais do meio (baixas concentrações de cátions causam um melhoramento na capacidade de floculação), açúcares (açúcares fermentáveis induzem a perda de floculação no fase inicial de crescimento agindo nas interações célula-célula a nível da superfície e regulação dos genes floculantes) e também o etanol (acúmulo de álcool juntamente com escassez de nutrientes também diminuem a floculação de leveduras) afetam o poder floculativo da levedura. (GOUVEIA E SOARES, 2004; SOARES et al., 2007; SOARES, 2010)

#### 4.4.4 Determinação da Viabilidade Celular de Levedura

A viabilidade celular das leveduras foi obtida a partir da reação de azul de metileno com as amostras onde, visto pelo microscópio, células da cor azul apresentaram-se inviáveis para fermentação uma vez que o reagente conseguiu ultrapassar sua parede celular já deteriorada e as incolores ainda se mantiveram vivas com sua membrana impermeável. Resultados percebidos na Tabela 7.

Tabela 7: Viabilidade celular e taxa de redução.

Levedura	Viabilidade celular (%)		
	0 h	96 h	Redução (%)
Cat 2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	50,00	28,57	57,14
AR 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	55,56	19,23	34,62
AR 12 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	67,95	31,58	46,47
AR 13 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	54,72	20,59	37,63
AR 14 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	42,86	16,28	37,98
AR 15 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	57,45	32,84	57,16
AR 16 ( <i>Lachancea fermentati</i> )	52,38	22,73	43,39
CC 15 ( <i>Torulaspora delbrueckii</i> )	69,23	20,00	28,89
CP 18 ( <i>Pichia kudriavzevii</i> )	40,91	25,32	61,88

Como visto, a porcentagem de viabilidade inicial foi baixa, devido a análise das amostras após longo período armazenadas por congelamento. De acordo com CASTRO (2010) a viabilidade da levedura diminui cerca de 50% se congelada por período de 25 dias.

Pôde-se observar que as leveduras Cat 2, AR 12 e AR 15 (espécies *Saccharomyces cerevisiae*) apresentaram as maiores taxas de redução na viabilidade celular. Vincunlando esses resultados com o consumo de açúcares redutores do item 4.3.3, obteve-se uma coerência nos dados uma vez que maior consumo de açúcar significa maior produção de etanol e quando mais álcool no substrato menor a viabilidade celular da célula.

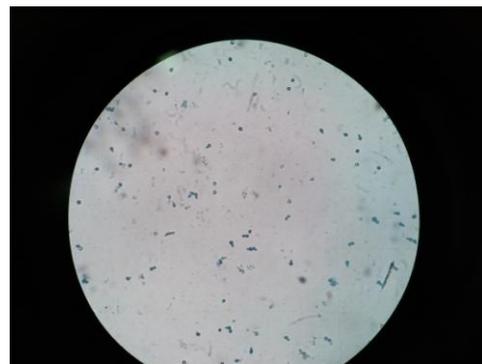
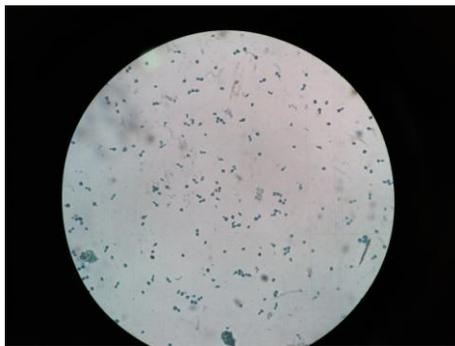
O acúmulo de etanol no substrato diminui significativamente a viabilidade celular das leveduras por ser tóxico à sua composição lipídica. Ainda partindo dessa associação dos resultados obtidos também constatou-se que as leveduras AR 1 (*Saccharomyces cerevisiae*) e CC 15 (*Torulaspota delbrueckii*) apresentaram as menores taxas de reduções da viabilidade celular porem também os menores consumos de açúcares, diminuindo a conversão em álcool e seu efeito nocivo.

Além da toxicidade do etanol, estudos de Chin et al (1994) mostraram que bactérias contaminantes do meio produzem ácido lático e toxinas ocasionndo redução de 60% na viabilidade da levedura.

Outro fator desfavorável à viabilidade celular é a ausência de oxigênio, uma vez que em anaerobiose a viabilidade da célula de levedura diminui continuamente, porém, em aerobiose, permanece em 95%. (LIMA et al., 2001; SCHULZ., 2010)

As Figuras 31 e 32 mostram como as leveduras inviáveis ficaram coloridas de azul e as viáveis permaneceram incolores.

Figuras 31 e 32 – Visualização da viabilidade celular.



Fonte: própria.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível realizar fermentações tendo o caldo de cana como substrato e inoculando 9 leveduras, sendo 8 delas espécies que foram isoladas do bioma amazônico e apenas 1 levedura comercial. Seis destes microrganismos vieram do Araçá-boi (*Eugenia stipitata*) (quatro espécies *Saccharomyces cerevisiae* e duas *Lachancea fermentati*), uma do Cacau (*Theobroma cacao*) a *Torulaspora delbrueckii* e uma levedura do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) a *Pichia kudriavzevii*

O perfil fermentativo das amostras foi caracterizado pelo pH, que, de todas as leveduras, se manteve numa faixa de 5,21 a 3,01, adequada de acordo com a literatura (entre 3,5 e 6). Também se acompanhou parâmetros de sólidos solúveis no qual seu valor médio inicial, de todas as fermentações, foi de 15,4°, também dentro da faixa esperada. A maior taxa de redução foi das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, com uma média de 70,3%. Os açúcares redutores totais foram quantificados pelo método DNS e a maior taxa de consumo foi da espécie comercial *Saccharomyces cerevisiae* seguido das duas leveduras *Lachancea fermentati*.

Cem por cento das leveduras foi capaz de assimilar glicose e sacarose, porém nenhuma apresentou assimilação para com a xilose. Apenas uma cepa de *Lachancea fermentati* não fermentou em maltose e frutose e a cepa de *Pichia kudriavzevii* não produziu metabólitos em frutose. Para o teste de tolerância ao etanol apenas 3 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram atividade fermentativa em concentração etanólica de 10%, sendo uma a levedura comercial, juntamente com as leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Pichia kudriavzevii*.

Todas as leveduras não – *Saccharomyces* apresentaram a formação de flocos e em relação à viabilidade celular das leveduras, correlacionou-se a maior taxa de redução com o maior consumo de açúcar e conseqüentemente maior teor alcoólico, tóxico para a célula de levedura.

Comparando as leveduras regionais e comercial, a *Saccharomyces cerevisiae* comercial ainda apresentou resultados mais positivos enquanto consumidora de açúcares porém o que não exclui o protagonismo das demais. Espécies *Saccharomyces* e *Lachancea* regionais obtiveram resultados semelhantes à cepa comercial, consumindo altos teores de açúcar, assimilando a maioria dos açúcares propostos e, mesmo após 96 horas de fermentação, ainda obtiveram viabilidade celular mediana.

Portanto os resultados deste trabalho foram satisfatórios uma vez que trouxeram mais dados para agregar o cenário científico atual e fomentar a pesquisa de leveduras regionais.

## 6 PERSPECTIVAS

As sugestões para trabalhos futuros basicamente englobam a pesquisa mais aprofundada sobre as *Saccharomyces cerevisiae* e *Lachancea fermentati* obtidas de frutos presentes na região amazônica, incluindo mais testes para a capacidade de produção de etanol uma vez que o teor alcoólico final real precisa ser quantificado para fins de comparações mais embasadas.

Para as leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Pichia kudriavzevii* sugere-se estudar seu potencial fermentativo em outros substratos, associados à *Saccharomyces cerevisiae* e condições diferentes de temperatura ou até mesmo agitação uma vez que esses fatores são cruciais para processos fermentativos.

Logo, a pesquisa sobre a microbiota amazônica ainda precisa ser muito desenvolvida e mitigada. Esse alvo para diversos estudos traz ganhos não somente científicos mas também socioeconômicos uma vez que possivelmente um organismo desse possa ter diversas aplicações nos mais variados ramos da indústria.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTIN W, Chasseriaud L, Comte G, Panfili A, Delcamp A., **Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii***. 2014.
- ALCARDE, A. R. **Processamento da cana-de-açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Brasília, 2007.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. **Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hamp. Shire, v. 20, n. 1, 1998.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. **Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias**. STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.3, p.42-49, 1984.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento**. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, Piracicaba, 1996.
- AMORIM, H. V.; LIMA, U. A.; BASSO, L. C. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, v. 3, 2001.
- AMORIM, H.V. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Appl Micro-biol Biotechnol, 2011.
- AMORIM, V. A. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: FERMENTEC, 2005.
- ANDRADE, C., A., S. **Fisiologia de 15 leveduras em diferentes condições de cultivo**, tese mestrado, DOURADOS - MATO GROSSO DO SUL, 2017.
- ANDRADE, L; CARDOSO, M., B. **Cultura de cana de açúcar: UFLA**. 2004.
- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. **Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica**. STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 13, n. 4, p. 22-25, 1995.
- ANDRIETTA, S., R., ALCARDE, A., R., ARGUESO, J., L., DUARTE, F., M. **Genome structure of a *S. cerevisiae* strain widely used in bioethanol production**. Genome Research, 2009.

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***. 83p. Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Genética). Botucatu. 2012.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**. v. 4. São Paulo: Blucher, 2001.

AQUARONE, E.; ZANCANARO JÚNIOR, O. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. 243p.

ARAÚJO, M.J. Hernandez-Lopez, M.J. Sousa, J.A. Prieto, F. Randez-Gil, **Cloning and characterization of the MAL11 gene encoding a high-affinity maltose transporter from *Torulaspota delbrueckii***, FEMS Yeast Res. 2004.

ARRUDA, A. R.; CASIMIRO, A. R. S. de; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. **Processamento de bebida fermentada de banana**. Revista Ciência Agrônômica, Fortaleza, v. 34,n. 2, 2003.

ATTFIELD, P.V., **Stress tolerance: The key to effective strains of industrial bakery yeast**. Nature Biotechnology, 1997.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A. e MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. Biotechnology Advances, v.26, n.1, p.89-105. 2008.

BARNABÉ, D.; GUERRA, C. C.; VENTURINI-FILHO, W.G. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento**, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blücher, 2005.

BARRIGA, E.J.C.; LIBKIND, D.; BRIONES, A.I.; IRAN O, . .; PORTERO, P.; ROBERTS, I.; JAMES, S.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. **Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges**. 2011.

BARTH-HAAS GROUP. **The Barth Report**. Alemanha, jul. 2016.

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

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). Biofuel production: recent developments and prospects. Rijeka: InTech, 2011.

BELDA, E. NAVASCUÉS, D. MARQUINA, A. SANTOS, F. CALDERON, S. BENITO, **Appl Microbiol Biotechnol**. 2015.

BELY M, STOECKLE P, MASNEUF POMAR\_EDE I & DUBOURDIEU D. **Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* *Saccharomyces cerevisiae* culture on high sugar fermentation.** Int J Food Microbiol. 2008.

BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR. **Controle microbiológico da Usina de Açúcar e álcool,** 1983.

BRANYIK, T., SILVA, D., P., BASZCZYNSKI, M., LEHNERT, R., SILVA, J., B., A. **A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production.** Journal of Food Engineering, 2012.

BREDA, N. Jolly, J. van Wyk, **Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains,** Int. J. Food Microbiol. 2013.

BRYANYIK, T.; SILVA, D. P.; BASZCZYNSKI, M.; LEHNERT, R.; ALMEIDA E SILVA, J. B. **A Review of Methods of Low Alcohol and Alcohol-Free Beer Production.** J. Food Eng. 2012.

BUENO NETO, C. L. **Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Escola Politécnica, Universidade de São Paulo - USP. 1982.

CAMARGO, J. Z. **Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região Centro-Oeste.** Dourados. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados. 2013.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R. **Influência de micro-organismos contaminantes sobre o processo fermentativo.** STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 23, n. 5, p. 6-9, 2005.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** 3ª ed. Porto Alegre, 2003.

CANONICO, L., AGARBATI, A., COMITINI, F., CIANI, M. ***Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: a ndew approac to anhance bioflavour and to reuce ethanol content.** Food microbiology, 2016.

CARTWRIGHT, C.P., et al., **Ethanol Dissipates the Proton-motive Force across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbiology, 1986.

CARVALHO, B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B. **Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª. Parte- As leveduras.** Revista Analytica, v. 25, p.36 - 42, 2006.

CASADEI, M. E. **Processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar.** 2012. TCC (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

- CASTELLI T. **Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy.** 1955.
- CHAN, G, F,. **Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase.** Eukaryot Cell, 2012.
- CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; KUHAD, R.C. **Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501.** Bioresource Technology, vol.98, p. 1947-1950, 2006.
- CHANDEL, K. A.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. **Bioconversion of pentoses sugar into ethanol: A review and future directions.** Biotechnology and Molecular Biology Reviews, v.6, p.8-20, 2011.
- CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNI, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCE, Y.; DESHPANDE, MV. **Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India.** Food Microbiology, 2009.
- CHIN, P., M., INGLEDEW, W., M. **Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset.** Enzyme Microbiology and Technology, 1994.
- CIANI M & MACCARELLI F. **Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making.** World J Microbiol Biotechnol. 1998.
- CLARO, F.B., K. RIJSBRACK, and E.V. SOARES, **Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress.** Journal of Applied Microbiology, 2006.
- COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C.; CATANIA, C. **Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina.** Journal of Applied Microbiology, 2005.
- CORAZZA, M. L.; NOZAKI, J. **Preparação e caracterização do vinho de laranja.** Química Nova, Vol. 24, N. 4, 449-452, 2001.
- CYSEWSKI, G., R., WILKE, C., R., **Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol.** Biotechnology and Bioengineering, 1978.
- DE CARVALHO, G. G.; MONTEIRO, R. A. B. **A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol.** FAZU em Revista, Uberaba, n. 8, p. 47-54, 2011.
- DELGADO, A A. **Tecnologia do açúcar e das fermentações industriais.** v. 1, p.91. In: Tecnologia dos produtos agropecuários Piracicaba : ESALQ. 1975.
- DEQUIN, S. **The Potential of Genetic Engineering for Improving Brewing, Wine-Making and Baking Yeasts.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2001.

DEQUIN, S.; BARRE, P.; BLONDIN, B.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J. M.; SALMON, J. M. **La levadura de fermentación alcohólica. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**, 2 ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2003.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÓDIO, R. S. **Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Teobroma cacao* L.)**. International Journal of Food and Technology, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 319-329, Mar. 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. **Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, Set.-Dez. 2003.

DOMINGUES, L. M. A. R. **Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológicas**. (Tese Doutorado), Universidade do Minho, Portugal, 2001.

DORTA, C. O. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

ECHEGARAY, O.F., et al. **Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation**. Biomass Bioenerg., v.19, p.39-50, 2000.

ESPÍRITO SANTO, J. C. A. **Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes SUC2 e AGT1 em linhagens diploides de *saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

EUROMONITOR INTERNATIONAL, **Craft Beer: coming of age or past its prime**. London, Euromonitor International, 2017.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H<sup>+</sup> ATPase da membrana plasmática**. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. 2008.

FERREIRA, D., S. **Determinação do potencial aromático de vinhos espumantes cujos vinhos base foram elaborados com leveduras *saccharomyces* e *torulaspora delbrueckii***. caxias do sul. 2018.

FIGUEIREDO, C., M. **Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

FIORAVANTI, C. **As artesãs do etanol**. Fapesp, São Paulo, 2009.

FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in nonconventional yeasts.** FEMS Microbiology Reviews, 2000.

FOKKEMA, N. J. **The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: a plant pathologist's point of view.** In **Microbial Ecology of Leaves**, ANDREWS, J. H; HIRANO, S. S. (Eds.), Springer-Verlag, New York. p.3-18, 1991.

FREITA, L. A. **Produção de etanol de segunda geração utilizando bagaço de sorgo sacarino.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

GIBBONS, W., R. and A. Westby Carl, **Effects of sodium meta bisulfite on diffusion fermentation of fodder beets for fuel ethanol production.** Biotechnology and Bioengineering, 1987.

GIBSON, B.; KROGERUS, K.; EKBERG, J.; MIKKELSON, A.; PENTIKAINEN, S.; WILPOLA, A.; VIDGREN, V. **Non-Conventional Yeast As A New Tool For Beer Flavour Modification. Technical Report;** VTT Technical Research Centre of Finland: Finland, 2015.

GIRAFFA, G. **Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation.** FEMS Microbiology Reviews, 2004.

GONZALEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. **Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain).** Journal of Applied Microbiology, 2007.

GOUVEIA, C., SOARES, E., V. **Pb<sup>2+</sup> inhibits competitively flocculation of S cerevisiae.** Journal of the Institute of Brewing, 2004.

GREPPI, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, P., and Cocolin, L. **Potential probiotic Pichia kudriavzevii strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food.** Food Microbiology. 2017.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho.** Curitiba: UFPR, Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, 2005.

HAGLER, A. N; ROSA, C. A; MORAIS, P. B; MENDONÇA-HAGLER, L. C; **Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil.** Canadian Journal of Microbiology. v. 39, n.10 p. 973-977. 1993.

HALLSWORTH, J.E., **Ethanol-induced water stress in yeast.** Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998.

HANG, Y.D.; LEE, C.Y.; WOODAMS, E.E. **Production of alcohol from apple pomace.** Applied and Environmental Microbiology, v.42, n.6, p.1128-1129, 1981.

- HASHIZUME, T.; **Manual prático da fabricação de vinhos de frutas.** ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP, p 30, 2001.
- HEARD, G. M.; FLEET, G. H.; **Yeasts – growth during fermentation.** In: Fleet, g. h. (ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, chur, Switzerland, p. 25-55, 1993.
- HOLZBERG, I.; FINN, R.K; STEINKRAUS, KH. **A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice.** Biotechnol. Bioeng., v.9, p.413-427, 1967.
- HONORATO, L.R; **Diversidade genética de Saccharomyces cerevisiae isolados de frutos amazônicos com a finalidade de uso na produção de cerveja.** Manaus: UEA, 2019. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Faculdade de Biotecnologia, 2019.
- HORII, J.; RIBEIRO, C.A.F. **Potencialidades de linhagens de levedura Saccharomyces cerevisiae para a fermentação do caldo de cana.** Scientia Agrícola, v. 56, 1999.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- IZAWA, S., et al., **Vacuolar morphology of Saccharomyces cerevisiae during the process of wine making and Japanese sake brewing.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2010.
- JIN, Y., L., **Flocculation of S. cerevisiae.** Food Research International, 1999.
- JOLLY, N. P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. **Not Your Ordinary Yeast: Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production Uncovered.** FEMS Yeast Res. 2014.
- KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeast metabolism.** Yeast and yeast-like organisms. Weinheim: VCH, 1990.
- KING A & DICKSON JR. **Biotransformation of monoterpene alcohols by Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii and Kluyveromyces fragilis.** 2000.
- KIRSOP, B. E.; KURTZMAN, C. P. 1988. **Yeast.** Cambridge University Press, Cambridge. 233 pp. Microbiologia Aplicada - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- KISHIMOTO, A. Wanikawa, K. Kono, K. Shibata, **Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties,** Journal of agricultural and food chemistry. 2006.

KITOKO, P. M.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, M. L. **Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em Vitória, Espírito Santo, Brasil.** Higiene Alimentar, n.119, v.18, p.73-76, 2004.

KOIZUMI, H. & OGAWA, T. **Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt,** Journal of The American Society of Brewing Chemists, v.63, n.4, p.147-150, 2005.

KOLB, E. **Vinos de frutas – Elaboracion artesanal e industrial.** Zaragoza – Espanha. Ed.Acribia, p. 232, 2002.

KOLB, E.; SCHURIG, U. **La producción profesional e industrial de vino.** In. KOLB, Erich. Vinos de frutas: Elaboración artesanal e industrial. (Trad. Lorenzo Serrahima Formosa). Zaragoza: Acribia, 2002.

KOSARIC, N. **Biosurfactants for Soil Bioremediation.** Food Technologi end Biotechnologi. Zagreb, v.39, n.4, p.295–304, 2001.

KURTZMAN CP, Fell JW, Boekhout T. **The Yeasts, a Taxonomic Study.** Volume 1. Fifth edition. 2011.

LACERDA, Y. S. **Resistência das leveduras Kluyveromyces marxiaus e Saccharomyces cerevisiae ao fungicida Benomyl.** (Tese de mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, CCB, Genética. Recife, 2002.

LAFON-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribéreau-Gayon, **Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines.** Applied and Environmental Microbiology, 1983.

LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no parque de itapuã-viamão/RS.** 2009. 187f. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola e do ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009.

LANDELL, M. F., VALENTE, P. **Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do parque de itapuãviamão/RS.** Universidade federal do rio grande do sul - UFRGS, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Principio de bioquímica.** Sao Paulo: Ed. Sarvier, 2ºed., p. 839 tradução de: Principles of biochemistry, 1995.

LILLY, M., D., **Production of intracellular microbial enzymes.** Biotechnology and Bioengineering, NY, 1979.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de Etanol.** In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001.

LIMA, U. de A., AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 4. São Paulo: Blucher, 2001.

LUDWIG, K.M; OLIVA-NETO, P.;ANGELIS D.F. **Quantificação da floculação de Saccharomyces cerevisiae por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciênc. Tecnol. Aliment. , Campinas, v.21, n.1, p. 63-68, 2001.

LUONG, J. H. T. **Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation**. Biotechnol. Bioeng., v.27, p.280-285, 1984.

LURTON. L.; SNAKKERS, G. **Influence of the fermentation yeast strains on the composition of wine spirits**. Journal of the Science of food Agriculture: Great Britain. v. 67, n. 4, p. 485-491, Apr.1995.

MACIEL, A. P. **Biocombustíveis de Babaçu, Ensaio Técnico sobre oportunidades de produção de biocombustíveis a partir do coco Babaçu**. 1ª ed., EDUFMA, cap. 21, São Luís, 2016.

MAIA, AB.R.A **Fundamentos de Fermentação Alcoólica**. Apostila do Curso de Engenharia Química. Belo Horizonte:UFMG, 1989.

MAMBUSCAY, M. L. A; LÓPEZ, A. W. A; CUERVO, M. R. A; ARGOTE, V. F. E; CADAVID, E. O. **Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva**. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Ed. Especial. n. 2, p. 136-144., 2013.

MARCOS L. CORAZZA, DINA G. RODRIGUES E JORGE NOZAKI. **Preparação e caracterização do vinho de laranja**. Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 2000.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. **Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising Saccharomyces cerevisiae**. Enzyme and Microbial Technology, 31:274-282, 2007.

MARTINI, S., et al., **In vivo 13C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of Saccharomyces cerevisiae**. FEBS Letters, 2004.

MARTINS, C. A. P. **Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2009.

MASQUES. D.M.; PASTORE, G. M. **Produção de aromas naturais por microrganismo**. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 33, n. 1, p. 80-85, 1999.

MASSON, I. S.; COSTA, G. H. G.; ROVIEVO, J. P.; FREITA, L. A.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. **Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar.** 2015.

GUIMARÃES, M., **Diversidade e afiliação filogenética de leveduras associadas á plantas de sorgo sacarino cultivadas no cerrado, SETE LAGOAS / MG,** 2016.

MICHEL, M., KOPECHÁ, J., MEIER T., HUTZLER, M. **Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with Torulaspora delbrueckii as model.** Yeast, 2016

MIKI, B.L., et al., **Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in Saccharomyces cerevisiae.** Journal of Bacteriology, 1982.

MILANESE-RUBILAR, AA & MAUGERI, F. F. **Modeling alcohol production and cell viability in a cascade reactor with immobilized cells.** Ver. Microbiol. V.21, p. 79-84, 1990.

MILLATI, R; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. **Performance of Rhizopus, Rhizomucor and Mucor in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates.** Enzyme and Microbial Technology, Vol. 36, p. 294-300, 2005.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA JÚNIOR, M. **“Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras de etanol: efeito da natureza da fonte de nitrogênio”.** Trabalho apresentado ao Instituto de Química, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Araraquara, 2012.

MOREIRA C. S.; COSTA, M.A.S.; INSFRAN, T.; CARDOSO, C.A.L.; HERNANDES, J.R.; BATISTOTE, M. **Avaliação da Capacidade Fermentativa e Fisiológica de Linhagens de Leveduras Cultivadas em Caldo de Cana.** BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports. ISSN 2316-5200, número especial v. 2, n. 3, p. 324-327, 2013.

MORENO JJ, MILL\_AN C, ORTEGA JM & MEDINA M. **Analytical differentiation of wine fermentations using purê and mixed yeast cultures.** J Ind Microbiol. 1991.

NAGODAWITHANA, T.W., C. Castellano, and K.H. Steinkraus, **Effect of Dissolved Oxygen, Temperature, Initial Cell Count, and Sugar Concentration on the Viability of Saccharomyces cerevisiae in Rapid Fermentations.** Applied Microbiology, 1974.

NARENDRANATH, N. V., HYNES, S H.; THOMAS, K.C; INGLEDEW, W. M. **Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation.** Applied and Environmental Microbiology, v. 63, n.11, p.4158-4163, Nov. 1997.

NIELSEN, J., OSTERGAARD, S.; OLSSON, L. **Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, p. 34-50, 2000.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

NONKLANG, S., et al., **Construction of Flocculent *Kluyveromyces marxianus* Strains Suitable for High-Temperature Ethanol Fermentation.** Bioscience, Biotechnology, and Bi-chemistry, 2009.

OBEROI, H., Babbar, N., Sandhu, S., Dhaliwal, S., Kaur, U., Chadha, B., and Bhargav, V. **Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2012.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. **Evaluation of bacterial contamination in a fedbatch alcoholic fermentation process.** Word Journal of Microbiology & Biotechnology, v.10, n.6, p.697-699, 1994.

OLIVEIRA, L. P. **Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para a elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada.** Manaus: UFAM, 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas/PPGCIFA, 2006.

OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S. R.; NICKENS, D. M.; ROGERS, C. M.; SAUSEN, C.; CAPUTO, R.; MILLER, J.; LI, H.; TENNESSEN, J. M.; BOCHMAN, M. L. **Primary Souring: A Novel Bacteria-Free Method for Sour Beer Production.** Food Microbiol. 2018.

PAALME, T., ELKEN, R., KORHOLA, M. **Growth efficiency of *S. cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in dilution rate (A - Stat).** Enzyme Microb. Technol., Amsterdam, 1997.

PACHECO, T.F. Tecnologia Industrial. **Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa.** p. 92-106. 2012.

PANTOJA, L. et al. **Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth).** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 3, n. 19, p. 50-54, 2001.

PATO, O. O. **Vinho Sua Preparação e Conservação.** 10ed. Lisboa: Clássica Editora, 1998.

PAULINO DE SOUZA, J., **Improvement of Brazilian bioethanol production – Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process.** Fungal Biology, 2017.

PEREIRA, J. N. **Bioprocessos industriais. Tecnologia Enzimática.** Rio de Janeiro: ENZITEC, 24-46, 1999.

PHAFF, H. J.; LABEDA. **Isolation of yeasts from natural sources. In: Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**, US Mc – Graw – Hill Inc. 1990.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. **Yeasts associated with plants, insects and soil**, pp. 123- 180.

PIERCE, J.S. **Analysis committee measurement of yeast viability.** Journal of the Institute of Brewing, London, v. 76, p. 442-443, 1970.

PIETROWSKI, G. A. M; WOSIACKI, G. NOGUEIRA, N. **Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para a produção de aromas em fermentado de maçã.** Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2011.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M.; VAN RENSBURG, P. **Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century.** Food Technology and Biotechnology, v.41, p.3-10, 2003.

QUINCOZES , L., S. **Influência de diferentes leveduras na elaboração de vinhos da cv. riesling itálico.** Dom Pedrito. 2018

REGODON, J. A.; PEREZ, F.; VALDES, M. E.; DE MIGUEL, C.; RAMIREZ, M. **A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains.** Food Microbiol. 14, 1997.

REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. **Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression.** Eur. J. Biochem., v.245, p.324-333, 1997.

RENAULT P, MIOT-SERTIER C, MARULLO P, HERNANDEZ-ORTE LAGARRIGUE L, LONVAUD-FUNEL A & BELY M. **Genetic characterisation and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: potential applications in the wine industry.** Int J Food Microbiol. 2009.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. **Potencialidades de linhagens de levedura *saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana.** Scientia Agricola, Piracicaba , v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999.

RIPONI, C.; CARNACINI, A.; ANTONELLI, A.; CASTELLARI, L.; ZAMBONELLI, C. **Influence of yeast strain on the composition of wine the production of brandy.** Journal Wine Research, Abingdon, v. 8, p. 41-55, 1997.

RODRIGUES, K. C. S., Sonogo, J. L. S., Cruz, A. J. G., Bernardo, A., & Badino, A. C. **Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO2 stripping for bioethanol production.** Chemical Engineering Research and Design, 2018.

ROSE, A. H. **Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*.** Biology and Activities of Yeast, Ed. Academic Press. 1980.

ROSE, A.H. **Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mod of action.** In: LYONS, T.P. (Ed.). *Biotechnology in the feed industry.* Nicholasville: Alltech Technical, 1997.

SÁ-CORREIA, L & VAN UDEN, N. **Temperatura Profiles of Ethanol Tolerance: Effectes of Ethanol on the Minimum and Maximum Temperaturas for Growth of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*.** *Biotechnol. Bioeng.*, v.25, p. 1665, 1983.

SANTOS et al. **Análise Cinética da Fermentação das Leveduras Comerciais S-04 e S-33.** *Revista Saúde e Ciência online*, 2018.

SATO, M.; WATARI, J. & SHINOTSUKA **Genetic instability in flocculation of bottomfermenting yeast,** *Journal of The American Society of Brewing Chemists*, v.59, n.3, p.130-134, 2001.

SCHULZ, M.A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana.** Dissertação de mestrado em engenharia de processos, Universidade da Região de Joinville – Univille, Joinville, Brasil, 2010.

SINGH, A.; BISHNOI, N.R. **Enzymatic hidrolisis optimization of microwave álcali pretreated wheat straw and etanol production by yeast.** *Bioresour. Technol.*, v. 108, p. 94-101, 2012.

SER, H; HARRISON, J. S. (Eds): **The Biology of Yeasts**, Vol. 1. Academic Press, London, 1987.

SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R.; SIVAKUMAR, T. **Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170.** *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, n. 13, p. 1386-1393, 2014.

SKINNER, F.A.; PASSMORE, S. M.; DAVENPORT, R. R. (Eds.). **Biology and Activities of Yeasts.** London: Academic Press, 1980.

SOARES, E., V. **Flocculation in *S. cerevisiae*: a review.** *Journal of Applied Microbiology*, 2010.

SOARES, P., A., ROSSELL, C., E., V. **O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico.** São Paulo: USP; 2007.

SOCOL, C. R.; SCHWAB, A.; KATAOKA, C. E. **Avaliação microbiológica do caldo de cana (garapa) na cidade de Curitiba.** *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 1990.

STANBURY.P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology.** 2.ed. Great Britain: Pergamon, 1995.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; STUART, J.; BARKER, F.; JANZEN, D. H. **Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects**. FEMS Yeast Research, vol. 1, p. 1-8, 2001.

STASHENKO, P., MIN YU, S., WANG, C. Y. **Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections**. Journal of Endodontics, v. 18, n. 9, p.422 – 426, 1992.

STASKENKO, H.; MACKU, C.; TAKAYUKI, S. **Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 40, n. 11, p. 2257-2259, Nov. 1992.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J.; **Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations**. Annu. Rev. Microbiol, vol. 68, p.61–80, 2014.

SWIECILO A, KRAWIEC Z, WAWRYN J, BARTOSZ G. **Effect of stress on the life span of the yeast Saccharomyces cerevisiae**. 2000.

TAVARES, F.C.A. **Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes**. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.10, n.5, p.45-49, 1992.

THATIPAMALA, R.; ROHAI, S.; HILL, G. A. **Effects of high product and substrate inhibition on the kinetics in biomass and products yields during ethanol batch fermentation**. Biotechnol. Bioeng.; v.40, n.2, p.289-297, 1992.

TIKKA C, OSURU HP, ATLURI N, RAGHAVULU PCV, YELLAPU NK, MANNUR IS, PRASAD UV, ALURU S. **Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains**. 2013.

TORNAI - LEHOCZKI, J. ; Péter, G. ; Dlačny , D. **Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads**. Inter. J. of Food Microbiology, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: Na introduction**. 10 ed. Pearson: São Francisco, 2010.

TRALLI, L., F. **Otimização das condições fermentativas de pichia membranifaciens para produção de etanol de segunda geração**. Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 14884-900 Jaboticabal - SP, Brasil. Quím. Nova vol.42 no.7 São Paulo Aug. 2019.

TRISTEZZA, M; VETRANO, C.; BLEVE, G.; CAPOZZI, V.; LOGRIECO, A.; MITA, G.; GRIECO, F. **Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy**. Food Microbiology, 2013.

- VASCONCELOS, R., **Influencia dos carboidratos e da expressão dos genes relacionados à parede celular na floculação de *S cerevisiae***, tese de mestrado, Vitória, 2013.
- VENTURA, M.; ZINK, R. **Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis***. Appl. Environ. Microbiol. 2002.
- VRIESEKOOOP, F.; Krahl, M.; Hucker, B.; Menz, G. **125th Anniversary Review: Bacteria in Brewing: The Good, the Bad and the Ugly**. J. Inst. Brew. 2012.
- WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**, Wiley: West Sussex, U.K., 1998.
- WANG, D., I., C., COONEY, C., L., DEMAIN, A., L., DUNNILL, P., HUMPHREY, A., E., LILLY, D., D., **Fermentation and enzyme technology**. New York, 1979.
- WICKERMAN, L., J. **Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin 1029US**. Department of Agriculture, Washington DC, 1951.
- WIN, S., S., IMPOOLSUP, A., NOOMHORM, A. **Growth kinetics of *S. cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch**. Amsterdam, 1996.
- WYLER, P. **Influência da madeira de carvalho na qualidade da cerveja**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciências em Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura (Luiz de Queiroz), 2013.