

Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol

Evaluation of morphological and physiological parameters of industrial yeast strains with potential biotechnological for the production of ethanol

Crislaine Santos Moreira, Maria do Socorro Mascarenhas Santos, Neliane Soares Barros, Claudia Andrea Lima Cardoso, Margareth Batistote

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados/MS, Brasil

Resumo

O Brasil é considerado privilegiado pela sua diversidade de biomassas, e a cana-de-açúcar, tem contribuindo para elevada produção de etanol no cenário regional e nacional. Este estudo visou analisar os aspectos morfológicos, fisiológicos de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e seus parâmetros fermentativos em diferentes concentrações de graus Brix. Utilizou-se o meio YPD 2% para a caracterização morfológica por 72 horas de cultivo, na avaliação fermentativa utilizou-se mosto em diferentes concentrações de graus Brix por 24 horas de fermentação. Os parâmetros fermentativos as leveduras foram crescidas em meio YPSAC 5% e a biomassa foi inoculada em diferentes concentrações de Brix por 8 horas de fermentação. As leveduras apresentaram aspecto morfológico semelhante e indicativo da capacidade fermentativa nas diferentes concentrações de açúcares. Nas concentrações de 12° e 15° Brix, as linhagens de leveduras industriais apresentaram um bom desempenho fermentativo, no entanto, em concentrações mais altas, ocorreram variações nestes parâmetros. Estudos para avaliar os diferentes mecanismos fisiológicos para a produção de etanol por linhagens de leveduras em diferentes concentrações de graus Brix podem ser uma importante ferramenta para alavancar e assegurar o desenvolvimento do setor sucroenergético.

Palavras-chave: concentração de grau Brix, fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, cana-de-açúcar, biomassa

Abstract

Brazil is considered privileged for its diversity of biomass, and sugarcane, has contributed to increased production of ethanol in the regional and national scene. This study aimed to analyze the morphological, physiological aspects of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* and its fermentation characteristics in different concentrations of degrees Brix. We used the medium YPD 2% for the morphological characterization for 72 hours of cultivation, the fermentation wort evaluation was used in different degrees Brix concentrations for 24 hours fermentation. The fermentation characteristics of yeast were grown in YPSAC 5% and biomass was inoculated in different Brix concentrations for 8 hours fermentation. As yeast showed similar morphological aspect and indicative of the fermentative capacity in different concentrations of sugars. At concentrations of 12 and 15 Brix, industrial yeast strains showed good fermentation performance, however, at higher concentrations, there were variations in these parameters. Studies to evaluate the different physiological mechanisms for the production of ethanol by yeast strains in different degrees Brix concentrations can be an important tool to leverage and the expansion of the sugarcane industry.

Keywords: Brix concentration, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, sugar cane, biomass.

1 Introdução

Devido às alterações climáticas causadas por emissões provenientes da queima de compostos a partir de combustíveis fósseis, o mundo tem buscado propor políticas visando o uso de fontes renováveis de energia. Neste contexto, o etanol vem se destacando como um biocombustível renovável, pois sua produção é baseada em uma comprovada plataforma tecnológica, tornando-o uma das alternativas mais viáveis (ROBERTSON et al., 2008).

O processo de produção de etanol no Brasil utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima. Esta gramínea tropical perene acumula sacarose que é convertida em etanol através do metabolismo fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen sem a ação de um pré-tratamento enzimático (GOLDEMBERG, 2007; ROBERTSON et al., 2008). A transformação de carboidratos em etanol é denominada fermentação alcoólica e as leveduras têm um papel fundamental nesse processo (ALENCAR et al., 2009).

A fermentação é um processo bioquímico que ocorre no citoplasma da levedura, este mecanismo ocorre pela ação de inúmeras enzimas durante a fase da oxidação anaeróbica, transformando o açúcar em álcool, anidrido carbônico e outros produtos secundários. É um processo de grande importância no qual são obtidos os álcoois industriais, a produção de diversas bebidas alcoólicas destiladas e não destiladas, e, como produto secundário, o gás carbônico (OLIVEIRA, 2008). O processo fermentativo nas indústrias brasileiras para a obtenção de álcool é realizado de duas maneiras: batelada alimentada (processo descontínuo) com reciclo de células ou por processo contínuo (DIAS, 2008).

A fermentação é uma das etapas mais importantes e sem dúvida a mais crítica do processo. Nesta fase, há a necessidade de atenção no controle da contaminação. A contaminação microbiológica pode ser proveniente da cana-de-açúcar, sujidades vindas do campo ou mesmo

proveniente de equipamentos e utensílios mal higienizados que são utilizados no processo. Os microrganismos epifíticos (crescem e vivem sobre a superfície vegetal) estão presentes na bainha da cana, sendo a maioria compostos por *Lactobacillus* e *Bacillus*, isto sugere que podem ser os principais contaminantes do caldo de cana. Além dos microrganismos, deve-se considerar a cana deteriorada pela queima, o tempo de estocagem e a deterioração com pragas e moléstias (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). Ainda neste processo a escolha da linhagem de levedura que irá iniciar o processo fermentativo é sem dúvida um fator determinante para assegurar uma eficiente produção de etanol.

Saccharomyces cerevisiae são amplamente utilizadas pelo setor sucroenergético. As linhagens selecionadas tornaram-se disponíveis comercialmente no final da década de 1990, e, atualmente, mais da metade das destilarias brasileiras usam uma, ou mais comumente uma mistura de duas ou mais, destas linhagens selecionadas por possuírem uma combinação de alta eficiência fermentativa com prolongada persistência na safra e para iniciar o processo fermentativo, produzindo bilhões de litros de etanol. As linhagens mais amplamente utilizadas pelas usinas brasileiras são Pedra-2, Catanduva-1 e Barra Grande-1 por apresentarem uma notável capacidade de competir com linhagens nativas, sobrevivência e dominância durante o processo fermentativo industrial. Na safra de 2007/2008, as linhagens Pedra-2 e Catanduva-1 foram utilizadas em cerca de 150 destilarias, representando cerca de 60% do etanol combustível produzido no Brasil (BASSO et al., 2008).

A expectativa do setor sucroenergético é de até 2020 dobrar a produção, de 555 milhões de toneladas de cana para 1,2 bilhão de toneladas. Com a recente abertura do mercado americano para o biocombustível nacional, os números pressupõem o aumento das exportações de 1,5 bilhão para 13,5 bilhões de litros de etanol para os Estados Unidos segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2011).

O estado de Mato Grosso do Sul apresenta um total de 24 usinas e a implantação destas empresas tem propiciado um grande

desenvolvimento socioeconômico na região da Grande Dourados, dados da Associação dos produtores de Bioenergia de Mato Grosso do Sul (BIOSUL, 2014). No estado, o setor sucroenergético tem apresentado crescimento significativo, principalmente na região Sul do estado, em terras antes destinadas à pecuária e em áreas de pastagens degradadas, que agora estão sendo substituídas pela cana-de-açúcar (CENTENARO, 2012).

A região da Grande Dourados está se tornando um novo polo industrial e usinas têm sido implantadas em larga escala, na região. Portanto, é necessária a realização de estudos que caracterizem a performance fermentativa de linhagens de leveduras industriais com potencial para a produção de etanol e que venha propiciar o desenvolvimento econômico e a produção deste importante biocombustível de fonte renovável. O estudo visa analisar as características morfológicas, e fisiológicas de linhagens de leveduras industriais com o perfil de produção de etanol, devido ao seu importante potencial que apresentam, e para assegurar o crescimento e desenvolvimento da produção de etanol no estado do Mato Grosso do Sul.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção das linhagens

As linhagens Catanduva-1 e a Pedra-2 foram adquiridas, através da empresa LNF Latino Americana Biotecnologia Aplicada, localizada (Rua Fioravante Pozza, 198) em Bento Gonçalves, RS. As linhagens Red Star gentilmente doada pela Lasaffre, França e a linhagem Ragi Instan cedida por uma usina do estado do Mato Grosso do Sul.

2.2 Análise microbiológica

A caracterização morfológica foi realizada no Laboratório LAMAI (Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial). Foi empregada a diluição seriada em solução salina (0,85%) até 1.10^{-5} cel/mL, e 0,1 mL das diluições foram plaqueadas por espalhamento na superfície do meio sólido YPD 2% (1,0% de extrato de levedo, 1,0% de peptona, 2,0% glicose e 2,0% Agar), na presença de corante rosa bengala (0,003%) e ácido propiônico (0,19%). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas.

Após o período de crescimento, as linhagens foram submetidas às análises morfológicas.

2.3 Avaliação fermentativa

No preparo do mosto, este foi filtrado em algodão, para retirar as impurezas maiores, e posteriormente filtrado em papel filtro. Para acertar as concentrações de graus Brix (12°, 24°, 15° e 30°) do mosto, utilizou-se sacarose, e, para diluir, utilizou-se água destilada, com o auxílio de um sacarímetro para calibrar as concentrações de graus Brix a serem analisadas.

Na avaliação fermentativa foram utilizadas 0,10g de amostras de leveduras liofilizadas. O mosto foi adicionado com o auxílio de uma pipeta e 10,0 mL foram colocados em tubos de ensaio contendo tubo de Durhan invertido, e o conjunto esterilizado em autoclave, a 120°C, por 20 minutos. Com uma alça de platina uma colônia de levedura foi inoculada em cada tubo e incubados em estufa, a 30°C, durante 24 horas, e foi observada a formação de bolhas no tubo de Durhan e espuma um indicativo do processo fermentativo.

2.4 Avaliação dos parâmetros fermentativos

Para o cultivo das leveduras, foi realizado um pré-inóculo, no meio de cultivo YPSAC 5%, contendo (5,0% sacarose, 1% de peptona e 1% de extrato de levedo) e o pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico 1N e esterilizados em autoclave 120°C por 20 minutos. Os frascos contendo as leveduras foram incubados e permaneceram em agitação em "shaker" modelo CT-712R, por 24h a 30°C a 200 rpm. Após o crescimento as células foram coletadas e centrifugadas a (800g, 20 min.), ressuspensas e lavadas por três vezes consecutivas em solução salina (0,85%) estéril, a biomassa obtida foi de 10 mg/mL massa úmida, esta utilizada nos ensaios fermentativos.

Os ensaios de fermentação foram realizados no mosto esterilizado nas concentrações (12°, 24°, 15° e 30° Brix), sem correção do pH, em erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do mosto e incubados a 30°C, por oito horas de fermentação, alíquotas foram retiradas para análises dos parâmetros fermentativos.

Para as análises dos parâmetros fermentativos, como a produção de biomassa celular foi realizada através de medidas

espectrofotométricas a 570nm, correlacionada com curva de calibração.

A determinação da viabilidade celular foi acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (LEE et al., 1981). Na determinação do pH, utilizou-se papel indicador de pH.

A concentração do etanol foi determinada no cromatógrafo a gás CG 3900 com detector de ionização de chama (Varian), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento (ZB-5). A condição cromatográfica empregada foi: volume de injeção 1µL, razão de split 1:20 e temperatura do forno de 90°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C, as amostras foram filtradas em ultrafiltro de 0,22µm.

3 Resultados e Discussão

As análises microbiológicas caracterizaram os aspectos morfológicos das colônias entre as linhagens. Os dados mostraram que houve uma variação de tamanho entre as colônias de 1 mm a 3 mm das leveduras, o aspecto cor a linhagem Ragi Instam apresentou cor rosa e as demais leveduras cor branca, no entanto não ocorreram variações nos aspectos tais como textura, superfície, borda e elevação, como mostra a (tabela 1).

A caracterização morfológica de leveduras é um fator básico, porém importante para determinação de semelhanças e diferenças entre os micro-organismos. Na dorna, onde ocorre o processo fermentativo, um ambiente com alta biodiversidade em que organismos diversos convivem, o conhecimento das características

morfológicas e fisiológicas auxilia na escolha de métodos e técnicas para o controle ou para o estímulo de crescimento microbiano (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Estudos de isolamento de leveduras com potencial para a produção de biossurfactantes, na avaliação dos aspectos morfológicos analisados ocorreu uma pequena variação quanto ao tamanho da colônia entre os isolados. Sendo que cinco dos isolados apresentaram superfície e bordo lisos. Dois isolados apresentaram as características de superfície convexa e crespa de bordo, ondulado e denteado respectivamente, e o aspecto cor variou entre branca e amarela (ACCORSINI, 2010).

Estudos realizados por Batistote et al. (2010), utilizando quatro linhagens de leveduras indústrias que apresentaram crescimento de colônias com aspectos morfológicos semelhantes, mostraram que houve uma variação de tamanho entre as colônias de < 1 mm a 2 mm e todas as linhagens apresentaram uma textura brilhante. A cor predominante foi branca, com exceção da linhagem Fleischmann que apresentou coloração rosa. A superfície das colônias apresentou-se lisa para a maioria das leveduras, sendo o mesmo observado para as bordas. A elevação predominante foi do tipo convexa. Os nossos resultados corroboram com a literatura, mostrando que as características morfológicas são dados importantes, tem mostrado variação entre as leveduras, refletindo no comportamento morfológico, fisiológico e bioquímico, resultado da variabilidade existente para gênero e mesma espécie.

Tabela 1 – Avaliação dos parâmetros morfológicos de linhagens de leveduras indústrias em meio sólido (YPD 2%) cultivadas a 30°C por 72 horas de incubação.

Linhagens	Diâmetro	Textura	Cor	Superfície	Borda	Elevação
Catanduva-1	1 mm	Brilhante	Branca	Lisa	Lisa	Convexa
Pedra-2	< 1 mm	Brilhante	Branca	Lisa	Lisa	Convexa
Red Star	2-3 mm	Brilhante	Branca	Lisa	Lisa	Convexa
Ragi Instan	2-3 mm	Brilhante	Rosa	Lisa	Lisa	Convexa

Fonte: Elaborado pelos autores.

Na análise do teste indicativo da capacidade fermentativa das leveduras nas diferentes concentrações de graus Brix. As linhagens Pedra-2, Catanduva-1, Red Star e Ragi Instan apresentam indicativos da presença de espumas e bolhas no tubo de Durhan, uma importante característica de linhagens ditas como boas fermentadoras. As leveduras apresentaram capacidade fermentativa nas concentrações de 12^o, 15^o e 24^o graus Brix, com exceção da concentração de 30^oBrix. Os dados mostraram que em altas concentrações de Brix mesmos em fermentações mais curta ocorre o efeito da pressão osmótica nas leveduras analisadas (tabela 2). Uma vez que, leveduras são agentes ativos, responsáveis pela fermentação alcoólica, e por isso, a escolha da linhagem apropriada é de fundamental importância para o êxito da fermentação (PACHECO, 2010).

Em fermentações utilizando o mosto a base de caldo de cana, recomenda-se que o valor para fermentação deve ser entre 18^o e 22^o graus Brix, que é o teor de sólidos solúveis no caldo, sendo a concentração de 18^o Brix a ideal para que se tenha uma produção máxima de etanol (CEBALHOS-SCHIAVONE, 2009). Os nossos estudos mostraram que as concentrações variando de 12^o a 24^o graus Brix permitiu que as leveduras desenvolvessem a capacidade fermentativa. Os nossos dados da variação graus Brix apresentaram próximos aos descritos na literatura, mostrando que as leveduras industriais apresentam performance fermentativa em diferentes concentrações graus Brix.

Tabela 2– Análise do teste indicativo da capacidade fermentativa de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, em mosto em diferentes concentrações de grau Brix.

Amostras	Concentrações de Brix			
	12 ^o	15 ^o	24 ^o	30 ^o
Pedra-2	+	+	+	-
Catanduva-1	+	+	+	-
Ragi Instan	+	+	+	-
Red Star	+	+	+	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

Na avaliação dos parâmetros fermentativos em diferentes concentrações de graus Brix, são importantes, à medida, que o mosto é o principal substrato utilizado nas destilarias brasileiras para a produção de etanol combustível. Processos fermentativos mais eficientes e a busca por entender a capacidade fermentativa, e a utilização de diferentes concentrações de sacarose em linhagens de leveduras industriais pode ser um dos fatores importantes para promover melhor eficiência na produção de etanol nas usinas, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* analisadas mostraram diferença na cinética da produção de biomassa, viabilidade celular, pH e concentração de etanol nas concentrações de graus Brix analisados.

Na avaliação da produção de biomassa, em diferentes concentrações Brix, o melhor desempenho fermentativo foi na concentração de 15^oBrix na temperatura de 30^oC para todas as linhagens analisadas. A linhagem Red Star 5,5 mg/mL apresentou a melhor produção de biomassa, a levedura Pedra-2 mostrou um crescimento de 4,8 mg/mL e as linhagens Catanduva-1 e Ragi Instan apresentaram produção de biomassa semelhantes nas condições analisadas. As leveduras estudadas mostraram mais sensíveis quando cultivadas em altas concentrações de Brix, como mostra a (figura 1A).

Altas concentrações de açúcares propiciam o estresse celular induzindo o aumento da osmolaridade externa levando à perda de crescimento e a taxa de viabilidade celular das células, por causar alterações no gradiente osmóticos através da membrana plasmática. Isto acarreta, em perdas de volume das células que se contraem por causa de diferenças da pressão osmótica entre o meio intracelular e extracelular (SOUZA, 2009).

Estudos realizados por Batistote et al. (2010), utilizando linhagens de leveduras utilizadas em usinas do estado do Mato Grosso do Sul, comparando as linhagens indústrias (Pedra-2 e Catanduva-1) e a levedura de panificação. As leveduras indústrias apresentaram melhores rendimentos de biomassa, viabilidade celular e produção de etanol superior a linhagem pão. Devido a esta performance fermentativa, as linhagens Cantanduva-1 e Pedra-2 são as mais utilizadas em processos industriais,

representando 80% de levedura comercializada para a produção de etanol no Brasil. Estas leveduras tem sido as mais empregadas para a produção de álcool nas usinas, sendo responsáveis por 60% da produção de etanol do país (BASSO et al., 2011).

Estudos realizados em usinas implantadas a região da Grande Dourados no estado do Mato Grosso do Sul em relação à concentração de graus Brix e temperatura de fermentação, os dados mostraram que as usinas analisadas realizam a fermentação na concentração de 18ºBrix e a temperatura variando na faixa de 30°C a 35°C (FERRI et al., 2014). As temperaturas ótimas para uma boa fermentação industrial ocorrem na faixa de 30°C a 35°C, porém esta temperatura pode ser superior levando em conta o clima da região e o tempo de fermentação.

Na análise da taxa de viabilidade celular, a linhagem Catanduva-1 apresentou a maior taxa de 96% na concentração de 15º Brix. A levedura Red Star mostrou uma viabilidade de 97% na concentração de 24º Brix, as linhagens Pedra-2 e

Red Star apresentaram melhores taxas de viabilidade na concentração 12º Brix, na concentração mais alta de Brix todas as linhagens analisadas mostraram serem mais sensíveis (figura 1B). Os dados mostram que em concentrações de graus Brix mais elevados as leveduras indústrias perdem a viabilidade mostrando serem mais sensíveis sob a ação da pressão osmótica durante o processo fermentativo.

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de microrganismos, influenciando no metabolismo, na capacidade fermentativa e na perda da viabilidade celular em leveduras (BATISTA, 2001).

Estudos realizados por Li et al. (2009), utilizando leveduras, mostram que a pressão osmótica do substrato, a forte inibição do etanol durante a fase de produção e o aumento do tempo de fermentação podem causar a perda da viabilidade celular.

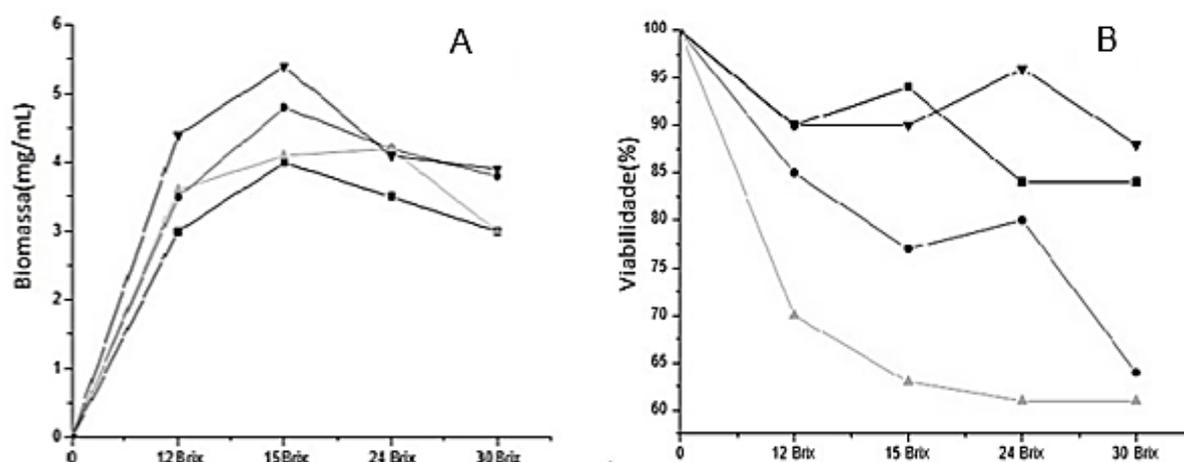


Figura 1 – Determinação dos parâmetros fermentativos da biomassa (A) e viabilidade celular (B) das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* Pedra-2 (●), Catanduva-1 (■), Ragi Instan (▲), Red Star (▼). Condições de cultivo 30°C em estufa em 8 horas de fermentação.

Na avaliação do pH, os dados mostram que a faixa de pH 5,5 foi ótimo em todas as concentrações de Brix analisadas. No entanto, as linhagens Ragi Instan, Pedra-2 e Red Star mostraram ser mais sensíveis às variações de pH, em concentrações mais altas de Brix. A linhagem Catanduva-1 apresentou um pH 5,5 constante,

para todas as concentrações de açúcares analisadas, (figura 2A).

Um dos fatores importantes nos processos fermentativos industriais é o pH devido a sua importância para o efeito do controle da contaminação e em relação ao crescimento das leveduras, na taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009).

No mosto industrial o pH geralmente se apresenta na faixa de 4,5 e 5,5, propiciando uma boa capacidade tamponante, no entanto as leveduras mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio e por isto são mais tolerantes ao tratamento ácido (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Segundo Ribeiro (2010), na maioria dos processos fermentativos o pH do meio pode alterar o crescimento como a formação do produto.

Na análise da produção de etanol, os dados mostram que ocorreram diferenças na concentração de álcool em relação às diferentes concentrações de grau Brix avaliadas, ocorreu a melhor produção de etanol na concentração de 15ºBrix para todas as leveduras avaliadas com uma concentração de 8,5% (v/v) de etanol, como apresenta a (figura 2B). Nas concentrações de 24º e 30ºBrix, ocorreu queda na concentração de etanol para todas as linhagens avaliadas.

Os dados mostram que as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* indústrias apresentaram desempenho fermentativo em relação aos parâmetros fermentativos avaliados. Talvez as diferentes variações metabólicas apresentadas entre as linhagens estudadas, mostram o quanto estas linhagens estão adaptadas às diferentes condições dos processos fermentativos aos quais são submetidas.

Estudos realizados com isolados de leveduras de destilarias na temperatura de 30°C em batelada simples mostram que a

concentração de etanol do meio foi superior a 8% (v/v) e que acima deste valor a presença do álcool na fermentação ocorre de forma reduzida (SOUZA, 2009). A concentração de etanol também pode influenciar na captação de nutrientes e no potencial da membrana celular, podendo diminuir a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática (BREISHA, 2010).

O efeito inibitório do etanol produzido por *S. cerevisiae* durante o processo fermentativo é complexo, sendo um fator que propicia a fermentação incompleta e conseqüentemente perde no rendimento. Concentrações acima de 8%(v/v) de álcool influência no crescimento celular da levedura, reduz a taxa de viabilidade, perda da capacidade fermentativa (FERREIRA, 2002).

Os nossos dados corroboram com a literatura mostrando que etapas críticas do processo fermentativo devem ser controladas, tais como a concentração osmótica, temperatura, pH e produção de etanol, estas etapas podem propiciar condições ideais para bom desempenho das leveduras industriais e assegurar uma boa produção de etanol combustível.

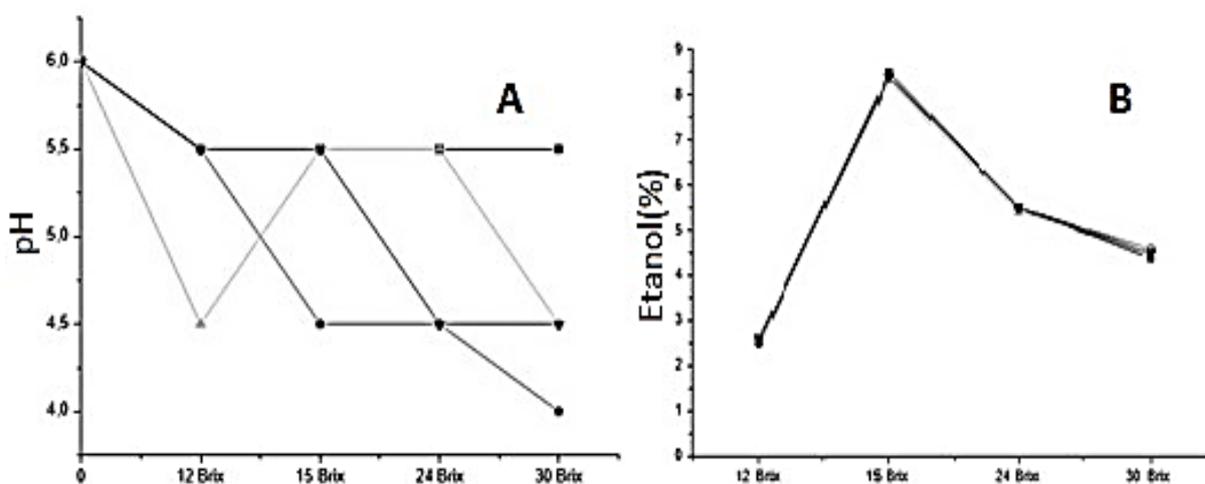


Figura 2 – Determinação dos parâmetros fermentativos do pH (A) e etanol (B) das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* Pedra-2 —●—, Catanduva-1 —■—, Ragi Instan —▲—, Red Star —▼—. Condições de cultivo 30°C em estufa em 8 horas de fermentação.

4 Conclusões

Na avaliação morfológica, as leveduras apresentaram-se semelhantes em relação aos aspectos analisados.

Na análise do teste indicativo da capacidade fermentativa, em diferentes concentrações de graus Brix, as leveduras apresentaram capacidade fermentativa nas concentrações de 12^o, 15^o e 24^oBrix.

As linhagens de leveduras indústrias cultivadas em diferentes concentrações de graus Brix apresentaram alterações na performance fermentativa. Na avaliação da biomassa e viabilidade celular, nas concentrações de 12^o e 15^o Brix as linhagens analisadas apresentaram melhor desempenho fermentativo e nas concentrações mais altas as leveduras mostraram-se mais sensíveis ocorrendo perda da produção de biomassa e viabilidade celular. A melhor concentração de etanol, para todas as linhagens analisadas foi a maior na concentração de 15^o Brix, e a menor em 30^o Brix.

Na análise de pH ideal para linhagens estudadas variou na faixa de 4,5 a 5,5.

5 Referências

- ACCORSINI, F. R. Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono. 76f (Dissertação) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP-SP, 2010
- ALENCAR, E. M. B.; MOTTA, C. M. S.; WALTER, B. S.; SANTOS, R. M. P.; MARQUES, O. M.; QUEIROZ, L. A. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, p.819-824, 2009.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*, v.8, p. 1155-63, 2008.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Santos Bernardes.S, M. A dos (ed). *Biofuel production recent developments and prospects*.Croatia: Intech, charp-5, p.85-100, 2011.
- BATISTA, A. S. *Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses. 94f (Dissertação) Faculdade de Eng. Agrônômica-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2001.
- BATISTOTE, M.; CARDOSO. A. C.; ERNANDES. J. R.; DOFFINGER, R. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto à base de caldo de cana. *Revista Ciência e Natura*, v.32, p. 83-95, 2010.
- BREISHA, G. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass & Bioenergy*, v. 34, p. 1243-1249, 2010.
- BIOSUL. Associação dos Produtores de Bioenergia de Mato Grosso do Sul, disponível em: <<http://www.biosulms.com.br/bioenergia>>. Acesso em: 03 de setembro de 2014.
- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - *Lactobacillus*–na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol 177f (Dissertação) Faculdade de Ciência de alimentos - Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba- SP, 2009.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. Microbiologia da fermentação alcoólica. A importância do monitoramento microbiológico em

- destilarias. São Carlos: EduFSCar, p. 105, 2010.
- CENTENARO, M. Um estudo do sobre investimento direto externo no setor sucroenergético do estado de Mato Grosso do Sul. 194f (Tese) Faculdade de Administração, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo- RS, 2012.
- DIAS, M. O. S. Simulação do processo de produção do etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço. 282f (Mestrado)-Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP, Campinas-SP, 2008.
- FERRI, A.; COSTA, M. A. S.; BATISTOTE, M.; NAKA, M. H. Análise do perfil de produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados – MS. *Revista Enciclopédia Biosfera*, v. 10, p. 251-268, 2014.
- FERREIRA, L. V. Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados. 266f (Dissertação) Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, - UNICAMP, Campinas-SP, 2002.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, v.315, p. 808-810, 2007.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. An innovative consecutive batch fermentation process for very – high – gravity ethanol fermentation with self – flocculating yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 1079-1086, 2009.
- LIMA, U. A., BASSO L. C.; AMORIM, H.V. *Produção de Etanol*. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, v. 3. Cap. 1, São Paulo: Editora Edgard. Blucher, p.1-40, 2001.
- OLIVEIRA, R.H. A. Estudo dos processos de sacarificação, fermentação e destilação de cascas e pontas de mandioca no processo de obtenção de aguardente. In: *XII Seminário de Iniciação Científica*. Universidade Federal de Uberlândia-MG, 2008.
- PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 96f (Dissertação) Faculdade de Eng. Química -Universidade Federal de Uberlândia- MG, 2010.
- RIBEIRO. F. A. M. Fermentação Alcoólica. Processamento na indústria sucroalcooleira. Apostila – Modulo II. Uberaba – MG, 2010.
- ROBERTSON, G. P. ; DALE, V. H. ; DOERING, O. C.; HAMBURG, S. P.; MELILLO, J. M.; WANDER, M. M.; PARTON, W. J. ; ADLER, P. R.; BARNEY, J. N.; CRUSE, R M . *Agriculture Sustainable biofuel redux. Science*, v. 322, p.49-50, 2008.
- SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. 155f (Tese) Programa de Pós-Graduação Interunidades em biotecnologia- Instituto Butantã São Paulo-SP, 2009.
- UNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 31/Out/2011.