

Avaliação da fermentação de leveduras visando produção de etanol de segunda geração

Silva, Fabio Sousa Guedes
Gomes, Winston Pinheiro Claro
Nascimento, Daniela Defávári do

Resumo

A preocupação das nações em reduzir a dependência de combustíveis fósseis incentiva a busca por fontes renováveis, como o etanol de segunda geração (2G). Esta pesquisa objetivou avaliar a fermentação de leveduras na presença de xilose, pentose presente no mosto de etanol 2G. Cepas de leveduras conservadas a -80°C foram reativadas e multiplicadas em dois meios de crescimento: a partir de cana de açúcar (CCA) e YPX. Em seguida, foram inoculadas, de acordo com a densidade óptica nos meios, em tubos de ensaio contendo meios de fermentação com 0, 7,5 ou 15% (m/v) de xilose e tubos de *Durham* invertidos. Ao longo da fermentação avaliou-se a altura da camada gasosa (CO_2) formada no interior dos tubos de *Durham* e ao fim quantificou-se o etanol por cromatografia gasosa. Antes e após a fermentação, determinou-se a viabilidade celular e células viáveis mL^{-1} , por contagem direta em microscópio. Observou-se que as leveduras que cresceram em YPX apresentaram menor número de células viáveis mL^{-1} e viabilidade celular antes da fermentação, em comparação com crescimento em CCA. Entretanto, apresentaram tanto melhor rendimento na fermentação quanto maior número de células viáveis mL^{-1} e viabilidade celular após a fermentação. Notou-se que, no meio de fermentação, quanto maior a concentração de xilose, menor é o rendimento da fermentação. Portanto, sugere-se que a presença de xilose (YPX) no meio de crescimento promove melhor rendimento na fermentação, porém sua presença no meio de fermentação afeta o rendimento de produção de etanol.

Palavras-chave: xilose; *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, leveduras selvagens.

Abstract

The concern of nations to reduce dependence on fossil fuels encourages the search for renewable sources, such as second-generation (2G) ethanol. This research aimed to evaluate yeast fermentation in the presence of xylose, pentose present in the ethanol 2G wort. Yeast strains conserved at -80°C were reactivated and multiplied in two growth mediums: from sugarcane (CCA) and YPX. Then, they were inoculated, according to the optical density in the mediums, into test tubes containing 0, 7.5 or 15% (m/v) xylose fermentation mediums and inverted *Durham* tubes. Throughout the fermentation the height of the gas layer (CO_2) formed inside the *Durham* tubes was evaluated and the ethanol was quantified by gas chromatography. Before and after the fermentation, cell viability and viable cells mL^{-1} were determined by direct microscopic counting method. Yeasts that grew on YPX were found to have a fewer number of viable cells mL^{-1} and cell viability prior to fermentation, compared to growth in CCA. However, they presented better fermentation yield as well as superior number of viable cells mL^{-1} and cell viability after fermentation. It was noted that, in the fermentation medium, the higher the xylose concentration, the lower the fermentation yield. Therefore, it is suggested that the presence of xylose (YPX) in the growth medium promotes a better yield in the fermentation, however its presence in the fermentation medium affects the yield ethanol production.

Keywords: xylose, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, wild yeasts.

Resumen

La preocupación de las naciones en reducir la dependencia de combustibles fósiles incentiva la búsqueda de fuentes renovables, como el etanol de segunda generación (2G). Esta investigación objetivó evaluar la

fermentación de levaduras en presencia de xilosa, pentosa presente en el mosto del etanol 2G. Las cepas de levaduras conservadas a -80°C fueron reactivadas y multiplicadas en dos medios de crecimiento: a partir de caña de azúcar (CCA) y YPX. Em seguida, fueron inoculadas, de acuerdo con la densidad óptica en los medios, en tubos de ensayo que contenían medios de fermentación con 0, 7,5 o 15% (m / v) de xilosa y tubos de *Durham* invertidos. Durante la fermentación se evaluó la altura de la capa gaseosa (CO_2) formada en el interior de los tubos de *Durham* y al final se cuantificó el etanol por cromatografía gaseosa. Antes y después de la fermentación, se determinó la viabilidad celular y las células viables mL^{-1} , por cuenta directa al microscopio. Se observó que las levaduras que crecieron en YPX presentaron menor número de células viables mL^{-1} y viabilidad celular antes de la fermentación, en comparación con el crecimiento en CCA. Sin embargo, presentaron tanto mejor rendimiento en la fermentación cuanto mayor número de células viables mL^{-1} y viabilidad celular después de la fermentación. Se observó que, en medio de fermentación, cuanto mayor es la concentración de xilosa, menor es el rendimiento de la fermentación. Por lo tanto, se sugiere que la presencia de xilosa (YPX) en el medio de crecimiento promueve mejor rendimiento en la fermentación, pero su presencia en el medio de fermentación afecta el rendimiento de producción de etanol.

Palabras clave: xilosa, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, levaduras selvajes.

INTRODUÇÃO

O Renovabio, Política Nacional de Biocombustíveis, teve sua lei sancionada pelo governo brasileiro em 2017, ajudando a definir uma tática que garanta o papel estratégico dos biocombustíveis, especialmente no que se trata à segurança energética e à diminuição de emissões de gases causadores do efeito estufa, de maneira a garantir a expansão sustentável do mercado de biocombustíveis no país (BRASIL, 2017a). O Brasil pretende, até 2030, obter 45% de energias renováveis em sua matriz energética, sendo que as metas incluem aumento na produção de etanol de primeira geração para aproximadamente 50 bilhões de litros e incremento de maneira significativa na síntese de etanol de segunda geração a partir de 2023, para atingir 2,5 bilhões de litros (BRASIL, 2017b).

A tendência do país é que o consumo de fontes não renováveis para geração de energia decaia em 4% de 2017 até 2027, e paralelamente a isso, a participação das fontes renováveis aumente 4% (BRASIL, 2018). Para que isso aconteça, é importante o estudo de novas tecnologias na geração de fontes renováveis, como os biocombustíveis, considerando o aumento da sustentabilidade no processo de geração de energia através dos recursos já existentes, sem aumentar a exploração do ambiente. O etanol de segunda geração (2G), também conhecido como etanol celulósico, se enquadra nessas condições, e foi o responsável por incentivar o desenvolvimento desta pesquisa.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Etanol

O etanol é responsável por desempenhar um importante papel na economia do Brasil, uma vez que é empregado como combustível nos veículos flex-fuel (etanol hidratado) ou em mistura com a gasolina, a fim de tornar mais barato o combustível, elevar sua octanagem e diminuir a emissão de poluentes (etanol anidro), além de ser utilizado na fabricação de tintas, vernizes, solventes etc (CONAB, 2018). De acordo com a CONAB (2019), Companhia Nacional de Abastecimento, em seu quarto levantamento da safra brasileira 2018/19 de cana-de-açúcar, produziu-se 33,14 bilhões de litros de etanol total, isto é, etanol hidratado e anidro, aumentando 21,7% ao comparar com a safra passada.

A produção de etanol é realizada através da conversão microbiológica de materiais de biomassa por fermentação. Esse processo consiste basicamente em: (1) converter biomassa em açúcares fermentescíveis; (2) fermentar açúcares em etanol; (3) separar e purificar o etanol. A princípio, a fermentação gera etanol com uma quantidade considerável de água. Por meio da destilação, remove-se a maior parte de água e obtém-se uma mistura com cerca de 95% de etanol puro, denominando-se etanol hidratado. Se a água residual for retirada, denomina-se o produto como etanol anidro, tornando-o adequado para ser misturado com gasolina (ZUURBIER; VOOREN, 2008).

Etanol de segunda geração (2G)

Ao produzir etanol partindo da cana-de-açúcar como matéria-prima, emprega-se, atualmente, a fermentação etanólica da sacarose. Frente à possibilidade da síntese de etanol celulósico, tanto o etanol advindo da sacarose quanto o proveniente do amido de milho, como nos Estados Unidos, tem sido reportado como etanol de primeira geração. Dessa maneira, a produção de etanol celulósico através dos polissacarídeos da parede celular vegetal gera um produto conhecido como etanol de segunda geração (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

No Brasil, a produção do etanol celulósico, advindo da palha e do bagaço da cana-de-açúcar, é capaz de aumentar em até 50% a produção de álcool no país, enfatizando a importância tanto econômica quanto ambiental dessa possibilidade, responsável por transformar resíduo em recurso (ARANTES, 2018). O novo paradigma do etanol de segunda geração pode aumentar de forma significativa a produção de etanol por hectare-ano, transformando os atuais 6000 litros no patamar projetado de 12000 litros (BONOMI, 2010).

A síntese de etanol utilizando materiais lignocelulósicos (2G) engloba os seguintes passos principais: hidrolisar a hemicelulose, hidrolisar a celulose, fermentar, separar a lignina, recuperar e concentrar o etanol e realizar o tratamento da água residual. Basear o processo na hidrólise enzimática e na fermentação torna-o na opção considerada atualmente a mais próspera para converter carboidratos – polissacarídeos – de materiais lignocelulósicos até etanol (GALBE; ZACCHI, 2010).

Assim sendo, a produção de etanol de segunda geração (2G), através da hidrólise química ou enzimática da fibra – celulose e hemicelulose – a fim de obter açúcares fermentescíveis e produzir combustíveis líquidos, já vem sendo produzido no Brasil por duas empresas, uma

localizada em São Miguel dos Campos-AL e a outra em Piracicaba-SP (DAROS; OLIVEIRA; BARBOSA, 2015).

Biomassa lignocelulósica

A conversão em etanol é muito mais difícil de se realizar nos materiais lignocelulósicos ao comparar com açúcares, amidos e óleos. A lignocelulose é o material fibroso responsável por formar a parede celular da arquitetura da planta e sua composição consiste em três principais substâncias: a celulose, que tipicamente participa em cerca de 40% da massa da lignocelulose; a hemicelulose, que usualmente contribui com aproximadamente 25%; e a lignina, que participa com cerca de 20% (QUINTERO-RAMIREZ, 2010).

Um impedimento relevante que surge ao tentar a síntese de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é a resistência na conversão de pentoses, como a xilose, a etanol. A xilose, no que se diz respeito à abundância na biomassa, ocupa a segunda posição entre os açúcares em maiores quantidades, alcançando, como por exemplo no caso do bagaço de cana-de-açúcar, 33% da totalidade de açúcares fermentescíveis (EMBRAPA, 2016).

Portanto, a produção de bioetanol utilizando biomassa como matéria-prima e empregando microrganismos fermentadores necessita de eficiência na metabolização de xilose. Assim sendo, para aplicação biotecnológica é relevante que se estude leveduras que sejam capazes de assimilar esta pentose, bem como realizar a conversão deste açúcar em etanol e a outros produtos que interessem a indústria (CAMPOS, 2015).

Metabolização da xilose

Apesar das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* possuírem alta tolerância ao álcool etílico e apresentarem certa tolerância aos inibidores produzidos durante o pré-tratamento da biomassa, como comprovado, ela realiza a fermentação de apenas hexoses, isto é, glicose, manose e, em certas situações, galactose. Dessa maneira, esse microrganismo é incapaz de fermentar pentoses, como a xilose e a arabinose, os principais constituintes da maior parte das hemiceluloses (GALBE; ZACCHI, 2010).

Diante disso, há uma procura por linhagens de leveduras que sejam capazes de realizar a fermentação da xilose, destacando-se as seguintes duas estratégias: identificar linhagens naturalmente hábeis para fermentar xilose e desenvolver linhagens recombinantes da levedura

Saccharomyces cerevisiae, a qual é um microrganismo empregado mundialmente na indústria a fim de produzir etanol (EMBRAPA, 2016).

A síntese de álcool etílico, partindo da xilose, é realizada em três etapas, tanto em bactérias quanto em leveduras ou fungos filamentosos. Primeiramente, a xilose é convertida a xilulose 5-P. No caso das bactérias isso é realizado por uma reação de isomerização, enquanto em leveduras e fungos filamentosos primeiramente acontece a redução da xilose em xilitol através da ação da enzima xilose redutase NADPH-dependente, sendo o xilitol oxidado posteriormente a xilulose através da atuação da enzima xilitol desidrogenase NAD^+ -dependente. Assim sendo, acontece a incorporação da xilulose à via das pentoses-fosfato e origina gliceraldeído 3-P e frutose 6-P. Após isso, é realizado a conversão de ambos a piruvato pela via glicolítica, responsável por originar o etanol por meio de duas reações sequenciais – descarboxilação e redução (CGEE, 2010).

METODOLOGIA

O experimento foi realizado na Faculdade de Tecnologia (FATEC) de Piracicaba, Deputado Roque Trevisan (22°41'33.7" S; 47°37'30.7" W e altitude 512 m). As atividades foram desenvolvidas nos Laboratórios de Química, Microbiologia e Cromatografia, de acordo com a metodologia empregada. A execução da pesquisa envolveu diferentes procedimentos, os quais serão descritos separadamente em detalhes, a saber: preparo de meios de cultura de multiplicação e fermentação; seleção, inoculação e multiplicação de leveduras; avaliação e acompanhamento da fermentação; análise de viabilidade celular e determinação do rendimento alcóolico da fermentação.

Meios de cultura de multiplicação

Foram preparados três meios de cultura para a multiplicação das leveduras, sendo que um apresentou consistência sólida e os demais consistência líquida. O meio de cultura sólido é designado de YPD, cuja composição (m/v) é extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose (glicose) 1%. Os meios de cultura líquidos apresentaram diferente composição, sendo que um foi preparado a partir de caldo de cana-de-açúcar (6°Brix) (CCA) e o outro é designado YPX, isto é, extrato de levedura 1%, peptona 2% e xilose 1%; m/v.

Meios de cultura de fermentação

Os meios de cultura de fermentação foram obtidos através de caldo de cana-de-açúcar e D-xilose. Foi necessário a utilização de água destilada para a diluição das soluções, sacarose P.A. para o acerto do °Brix, com a utilização de um refratômetro portátil (Homis modelo VBR-32 T), e ácido clorídrico (HCl) 0,1 e 1 N para ajuste do pH mensurado em medidor de pH - pHmetro microprocessado de bancada (Quimis modelo Q400MT).

Dessa maneira, obteve-se três meios de culturas de fermentação, com pH 4,5 e 16 °Brix, diferindo entre si pela concentração (m/v) de xilose: 0, 7,5 ou 15%. Por fim, as soluções preparadas foram esterilizadas com calor úmido, por meio de uma autoclave (Primatec modelo CS) durante 15 minutos a 120°C e 1 kgf/cm².

Seleção, inoculação e multiplicação de leveduras

Selecionou-se oito linhagens de leveduras disponíveis no mini banco de germoplasma da FATEC Piracicaba, caracterizando oito tratamentos (T), conforme a Tabela 1, conservadas em ultra freezer (-80°C) e glicerina (15%, v/v), que foram previamente plaqueadas para a obtenção de culturas puras e caracterizadas através de eletroforese em gel de agarose em trabalhos anteriores.

Tabela 1. Identificação e especificações das leveduras estudadas

Identificação	Nome	Gênero	Tipo
T1	B2	Levedura selvagem	Industrial indígena
T2	B3	Levedura Selvagem	Industrial indígena
T3	WLP002 English Ale-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cervejeira
T4	S23 France Lager-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cervejeira
T5	T58 Belga-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cervejeira
T6	Diamond-2	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Cervejeira
T7	Diamond-3	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Cervejeira
T8	Yndhira	Levedura selvagem	Cervejeira indígena

Fonte: Autores.

Em seguida, após descongelamento das cepas, foram estriadas em uma placa de Petri contendo o meio de cultura sólido de multiplicação (YPD), com o auxílio de uma alça de platina e tomando os cuidados de assepsia, utilizando capela de fluxo laminar vertical (Pachane modelo PA 050) e na presença de calor advindo de bico de Bünsen. Após inoculação das cepas de leveduras, foram mantidas à cerca de 28°C em uma estufa (Nova Ética) para crescimento.

Após obtenção de biomassa considerável de cada linhagem no meio de cultura sólido (YPD), a próxima etapa foi inocular estes microrganismos nos meios de cultura líquidos de multiplicação, sendo que cada linhagem foi transferida para cada um dos dois meios, CCA e YPX. Para isso, primeiramente cada meio líquido teve 5 mL transferidos individualmente com um pipetador automático (Discovery) em 8 tubos de ensaio, totalizando 16 tubos, então com auxílio de uma alça de platina e manuseio asséptico na capela de fluxo laminar vertical, os tubos de ensaio contendo as soluções receberam uma alçada da biomassa de levedura cultivada no meio de cultura sólido (YPD).

Assim sendo, os tubos de ensaio foram vedados com filme de PVC e submetidos à agitação em uma incubadora shaker de bancada (Cientec modelo CT-712) à 250 rpm e 28-30 °C para multiplicação. Conforme a produção de biomassa, a suspensão de cada tubo de ensaio foi transferida para frascos de erlenmeyers individuais, além de ser adicionado mais 5 mL do meio de cultura líquido equivalente, totalizando 10 mL. Após isso, os frascos foram vedados com tampão de algodão e submetidos novamente à agitação nas mesmas condições de agitação e temperatura anteriores, de maneira a continuar sua reprodução até a próxima fase. Ressalta-se que os materiais utilizados nesta etapa também foram esterilizados previamente em autoclave.

Acompanhamento e avaliação da fermentação

Para avaliar a capacidade de fermentação, de maneira a selecionar as linhagens que mais se demonstraram adaptadas às condições de teste, realizou-se primeiramente a transferência individual de 10 mL de cada meio de cultura de fermentação (3 meios), com auxílio de uma pipeta automática (Discovery) para tubos de ensaio tampados.

Esses tubos de ensaio continham em seu interior tubos de *Durham* invertidos (AUGUSTO et al., 2018; BARROS et al., 2015; ABREU et al., 2010; VIELMO et al., 2016; BUZANELLO et al., 2008).

Para isso, utilizou-se uma pipeta automática, caracterizando delineamento experimental com os seguintes fatores: 8 linhagens x 2 meios de cultura líquido de multiplicação x 3 meios de cultura de fermentação x 3 repetições = 144 amostras. Por fim, ressalta a utilização de materiais esterilizados em autoclave.

A próxima etapa foi realizar a adição dos meios de cultura líquidos de crescimento contendo os microrganismos, entretanto, para saber a quantidade de levedura a ser adicionada, de maneira a manter homogeneidade entre os tratamentos quanto ao número de células, realizou-se

previamente a análise de densidade óptica em espectrofotômetro UV-VIS (Nova modelo 2100UV), através da medição da absorbância das amostras (SANDRI et al., 2018; VIANA, 2017) em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}).

Com esses resultados, obtidos tanto para as linhagens que cresceram quanto em CCA quanto YPX, foi possível determinar a quantidade dos meios de cultura líquido de multiplicação que deveria ser inoculada para cada linhagem. Portanto, com o auxílio de uma pipeta automática, realizou-se a adição da suspensão com as leveduras em cada tubo de ensaio de acordo com o tratamento.

Dessa maneira, após inoculação dos microrganismos, realizou-se a homogeneização das amostras e retirada do ar presente nos tubos de *Durham*. Após o início deste teste, avaliou-se a quantidade de gás formado no interior dos tubos de *Durham* sendo mensurado com auxílio de uma régua a altura da camada gasosa formada, e ao atingir a capacidade máxima dos tubos ou próximo a isso, realizou-se o procedimento de retirada do gás formado, a fim de permitir mais captura deste produto. A avaliação deste parâmetro foi realizada 8 vezes, sendo que se deram após 12, 19, 24, 35, 41, 49, 59 e 68 horas após a inoculação dos microrganismos. Após o término das medidas, a fim de confirmar que o gás formado era o dióxido de carbono (CO_2) advindo da fermentação etanólica, verificou-se o odor resultante do processo, com a expectativa de ser característico deste tipo de fermentação (alcoólica).

Análise de viabilidade celular

O procedimento de viabilidade celular empregado foi contagem em câmara de Neubauer, descrito por Lee, Robinson e Wang (1981), citado por Mongelo (2012), o qual é um método padronizado que as usinas adotam (MONGELO, 2012). Foi realizado tanto para as leveduras presentes nos meios de cultura líquidos de multiplicação, isto é, antes da fermentação, quanto para as leveduras presentes nos tubos de ensaio após a avaliação do processo fermentativo, sendo possível estabelecer uma comparação entre o antes e o depois da fermentação. Para isso, realizou-se a contagem manual em câmara de Neubauer espelhada (Optik Labor) em um microscópio óptico (Olympus modelo BX41) com câmara digital (Olympus modelo DP72) e adaptador de câmera (Olympus modelo U-TV0.63XC). Entretanto, primeiramente realizou-se adição do corante azul de metileno (1%, m/v)/citrato de sódio (2%, m/v) sobre a amostra a ser analisada em uma diluição de 1:1 sobre a malha de leitura da câmara de Neubauer. Dessa maneira, realizou-

se a análise em três quadrantes para cada amostra, com auxílio do microscópio óptico em um aumento de 400 vezes, responsável por projetar a imagem em um computador acoplado a ele.

A contagem direta ao microscópio permitiu calcular a viabilidade celular, indicando a porcentagem de células que estão em atividade na população de leveduras em questão (CECCATO-ANTONINI, 2011), e pôde ser calculada da seguinte maneira (FUGITA, 2010; CECCATO-ANTONINI, 2011):

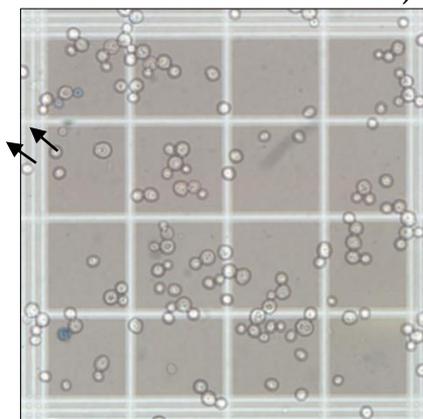
$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Número de células vivas})}{(\text{Número de células vivas} + \text{células não viáveis})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Considerando que a profundidade da lamínula até a malha de leitura corresponde à 0,1 mm e que a área de cada quadrante corresponde a 0,04 mm², é possível determinar o volume por quadrante, que resulta em 0,004 mm³. Assim sendo, o volume de cada quadrante corresponde a 0,000004 mL ou 0,004 µL. Então, sabendo que a diluição da amostra com o corante ocorreu na proporção 1:1 (fator de diluição igual a 1/2), é possível estimar o número de leveduras viáveis por mL de amostra, conforme demonstra a Equação 2.

$$\text{células viáveis/mL} = \frac{\text{nº de células viáveis}}{\text{volume do quadrante} \times \text{fator de diluição}} \quad \text{Equação 2}$$

As células viáveis possuem enzimas que são capazes de reduzir o azul de metileno que penetrou no seu interior até compostos incolores, enquanto essas enzimas estão inativas nas células não viáveis e ficam coradas com azul (COLORAÇÃO, 2003). Diante disso, é possível diferenciá-las pela coloração resultante das leveduras, segregando as células viáveis das não viáveis, conforme demonstra a Figura 1.

Figura 1. Análise de viabilidade celular de levedura em câmara de Neubauer (as setas indicam as células não-viáveis)



Fonte: Autores.

Determinação do rendimento alcóolico da fermentação

Para determinação da quantidade de etanol gerada após o processo de avaliação da fermentação nos tubos de ensaio utilizou-se cromatografia gasosa (CG). Para isso, primeiramente realizou-se a diluição de uma alíquota de cada tratamento, na proporção 1:100, com auxílio de balões volumétricos, pipeta volumétrica e pipetas automáticas (Discovery e Kasvi). Dessa maneira, com auxílio de uma pipeta automática (Gilson), foram transferidos 3 mL das soluções preparadas anteriormente para vials, a fim de quantificar o etanol por CG, totalizando 48 análises.

As análises por CG foram realizadas em cromatógrafo gasoso (PerkinElmer modelo Clarus 600), acoplado a um detector de ionização de chama (FID) e utilizando uma curva analítica preparada com 5 soluções aquosas de etanol de diferentes concentrações: 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,10% (v/v). Utilizou-se uma coluna capilar (PerkinElmer modelo Elite-WAX) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,5 μm . O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão de 1,20 mL min^{-1} . A injeção foi executada com um amostrador automático (Combpal, modelo CTC Analytics, Pal System), com o forno para *headspace*. O volume de injeção da amostra foi de 500 μL a uma velocidade de 250 $\mu\text{L s}^{-1}$, a qual foi incubada anteriormente a 80°C por 5 min. A temperatura inicial do forno foi de 45°C, seguida por uma rampa de aquecimento de taxa de 9°C min^{-1} , até 153°C, permanecendo nesta temperatura por 1,5 min. O tempo total de corrida foi de 15 min. O injetor foi operado a 150°C e o detector a 300°C.

Análise estatística

Os resultados de densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), viabilidade celular e células viáveis durante o crescimento e após avaliação da fermentação, altura do gás formado nos tubos de *Durham* e rendimento alcóolico, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e em caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ou análise de regressão, a 5% de probabilidade. Esses procedimentos foram realizados utilizando o software Sistema de Análise Estatística (SANEST) (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002), desenvolvido por Elio Paulo Zonta e Amauri Almeida Machado no Departamento de Física da ESALQ/USP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro parâmetro que disponibilizou informações relevantes referentes às leveduras estudadas foi a avaliação da densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) das amostras no meio de cultura líquido de multiplicação (CCA e YPX), sendo responsável por fornecer a quantidade de alíquota que

deveria ser inoculada nos tubos de ensaio contendo os tubos de *Durham* e os meios de cultura de fermentação, de maneira a ser adicionada a mesma quantidade de células por tratamento.

Conforme observado na Tabela 2, nota-se que as leveduras tiveram seu crescimento desacelerado em meio YPX, uma vez que a média da DO_{600nm} dos tratamentos que cresceram nesse meio (0,661) diferiram estatisticamente das leveduras que cresceram em CCA (1,582). Isso indica que as alíquotas dos inóculos para as leveduras crescidas no meio de fermentação preparado a partir de caldo de cana a 6° Brix (CCA) foi menor do que aquelas crescidas em YPX, revelando que havia mais células por unidade de área no primeiro caso do que no segundo e que, com o propósito de adicionar a mesma quantidade de células por amostra, houve variação no volume das alíquotas. Assim sendo, sugere-se que a presença de xilose no meio YPX dificultou o crescimento das leveduras. A dificuldade que as leveduras tiveram na fase de crescimento em YPX, ao comparar com CCA, também foi confirmada ao avaliar a viabilidade celular e quantidade de células viáveis mL^{-1} antes da fermentação, conforme será discutido a seguir.

Tabela 2. Densidade óptica das leveduras que cresceram em YPX ou CCA

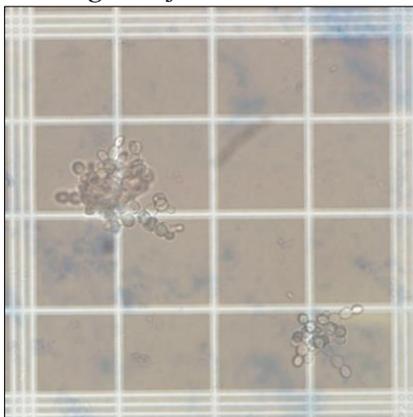
Tratamentos	Densidade óptica*
CCA	1,582 a
YPX	0,661 b
Valor F	88,8**
Prob. > F	0,00001
CV (%)	17,4

*:Densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}); **: valor F altamente significativo ($p < 0,01$); CV: coeficiente de variação; Prob.: probabilidade. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Fonte: Autores.

Com relação à análise de viabilidade celular e células viáveis mL^{-1} , não foi possível avaliar os resultados referentes à levedura do T2, uma vez que a organização de suas células (Figura 2) impossibilitou a contagem manual no microscópio.

Figura 2. Organização das células da levedura T2



Fonte: autores.

Com relação aos demais tratamentos no parâmetro viabilidade celular, conforme a Tabela 3, ao avaliar a interação entre o fator tipo levedura e o fator crescimento em CCA ou YPX, não foi observado diferença entre as linhagens de leveduras durante a fase de crescimento em CCA, indicando que todas as leveduras estudadas apresentaram bom desenvolvimento nessas condições, com viabilidade celular acima de 94%, enquanto na presença de xilose (YPX) algumas leveduras tiveram seu desenvolvimento afetado e as leveduras T1, T3 e T4 foram as que apresentaram melhor viabilidade, 90,4, 97,9 e 87,7%, respectivamente. Ao avaliar como fator o crescimento nos diferentes meios de culturas líquidos (CCA ou YPX), nota-se que as leveduras que cresceram em CCA apresentaram melhor viabilidade celular (97,5%) que as que cresceram em YPX (77,2%), diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 3. Análise de viabilidade celular e células viáveis mL⁻¹ das leveduras durante a fase de crescimento

Viabilidade celular (%)		
Leveduras ^[1]	Interação entre fator leveduras e fator crescimento em CCA ou YPX	
	Crescimento em CCA	Crescimento em YPX
T1	99,4 a	90,4 ab
T2	-	-
T3	96,5 a	97,9 a
T4	97,3 a	87,7 ab
T5	94,1 a	61,7 d
T6	99,5 a	81,3 bc
T7	97,8 a	73,7 c
T8	97,8 a	47,6 e
CV (%)	----- 7,70 -----	-----
Valor F	----- 10,96* -----	-----
Prob. >F	----- 0,00002 -----	-----
Fator crescimento em CCA ou YPX		
CCA	97,5 a	
YPX	77,2 b	
CV (%)	----- 7,70 -----	
Valor F	----- 95,5* -----	
Prob. >F	----- 0,00001 -----	

[1]: T1: B2; T2: B3; T3: WLP002 English Ale-3; T4: S23 France Lager-2; T5: T58 Belga-2; T6: Diamond-2; T7: Diamond-3; T8: Yndhira; *: valor F altamente significativo (prob.<0,01); CV: coeficiente de variação; Prob.: probabilidade. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Fonte: autores.

Com relação às células viáveis mL⁻¹, conforme a Tabela 4, as leveduras T1, T6 e T7 na fase de crescimento em CCA obtiveram os melhores resultados, 1,58 10⁸, 2,14 10⁸ e 2,18 10⁸, respectivamente, enquanto durante a fase de crescimento em YPX destacaram-se as leveduras T1, T3, T5 e T7, com valores de, respectivamente, 2,37.10⁷, 2,80.10⁷, 1,25.10⁷ e 1,45.10⁷. Ao avaliar o fator crescimento em CCA ou YPX, sem considerar a linhagem de levedura, nota-se diferença significativa no número de células viáveis por mL, sendo que o crescimento em CCA proporcionou maior valor.

Tabela 4. Análise de viabilidade celular e células viáveis mL⁻¹ das leveduras durante a fase de crescimento

Células viáveis mL ⁻¹		
Leveduras ^[1]	Interação entre fator leveduras e fator crescimento em CCA ou YPX	
	Crescimento em CCA	Crescimento em YPX
	----- 10 ⁸ -----	----- 10 ⁷ -----
T1	1,58 b	2,37 ab
T2	-	-
T3	0,78 d	2,80 a
T4	0,63 d	0,70 b
T5	0,72 d	1,25 ab
T6	2,14 a	0,78 b
T7	2,18 a	1,45 ab
T8	1,38 c	0,58 b
CV (%)	----- 13,3 -----	----- 13,3 -----
Valor F	----- 65,75* -----	----- 65,75* -----
Prob. >F	----- 0,00001 -----	----- 0,00001 -----
Fator crescimento em CCA ou YPX		
CCA	1,38 10 ⁸ a	
YPX	1,42 10 ⁷ b	
CV (%)	----- 13,3 -----	
Valor F	----- 1562* -----	
Prob. >F	----- 0,00001 -----	

[1]: T1: B2; T2: B3; T3: WLP002 English Ale-3; T4: S23 France Lager-2; T5: T58 Belga-2; T6: Diamond-2; T7: Diamond-3; T8: Yndhira; *: valor F altamente significativo (prob.<0,01); CV: coeficiente de variação; Prob.: probabilidade. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Fonte: autores.

Partindo agora para a avaliação da fermentação no experimento com tubos de *Durham*, notou-se que todos os tubos de ensaio apresentavam odor característico de etanol, corroborando com a ideia de que a fermentação responsável por liberar gás (CO₂) foi a etanólica. De acordo com a Tabela 5, nota-se que, ao avaliar primeiramente a interação entre os três fatores estudados – leveduras, crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose na fermentação – não houve valor F significativo.

Entretanto, ao comparar os resultados do fator crescimento em CCA ou YPX das leveduras, sugere-se que a presença de xilose (YPX) durante a fase de crescimento ajudou no rendimento da fase de fermentação, indicando pré-adaptação das células a esta pentose na fase de crescimento, uma vez que houve diferença significativa na altura da camada gasosa (CO₂) das leveduras que cresceram em YPX (14,8 cm) em relação ao meio que não possuía xilose na fase de crescimento (CCA) (8,79 cm).

Porém, ao avaliar a concentração de xilose durante o período de fermentação, a Tabela 5 indica que conforme aumenta a concentração dessa pentose no meio, 0, 7,5 e 15% (m/v), o rendimento da fermentação decresce em sentido linear, 13,0, 12,5 e 9,8 cm, respectivamente, com um bom ajuste da linha de tendência da regressão linear (R²=0,88).

Tabela 5. Análise da altura de gás formado nos tubos de *Durham* durante o período de fermentação das leveduras

Altura do gás formado (cm)						
Interação entre fatores leveduras, crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose na fermentação						
Leveduras ^[1]	----- Crescimento em CCA -----			----- Crescimento em YPX -----		
	----- Concentração de xilose na fermentação -----					
	0%	7,5%	15%	0%	7,5%	15%
T1	9,5	11,5	7,0	13,9	14,5	13,8
T2	11,6	7,4	8,6	17,6	15,5	16,5
T3	12,0	7,8	5,5	17,0	13,7	8,4
T4	6,1	3,0	3,6	14,4	16,4	11,6
T5	10,1	11,6	7,4	24,2	17,4	13,5
T6	12,0	10,0	8,3	12,4	20,3	10,5
T7	9,5	10,2	7,5	10,0	13,2	12,7
T8	12,6	10,9	7,3	15,8	15,9	14,8
CV (%)	----- 31,7 -----					
Valor F	----- 1,10 ^{NS} -----					
Prob. >F	----- 0,37 -----					
Fator crescimento em CCA ou YPX						
CCA	8,79 b					
YPX	14,8 a					
Valor F	92,0*					
Prob. >F	0,00001					
Fator concentração de xilose na fermentação						
0%	13,0					
7,5%	12,5					
15%	9,8					
Valor F	10,3*					
Prob. >F	0,00001					
Valor F: RL	18,2*					
Prob. >F: RL	0,0002					
Valor F: RQ	2,43 ^{NS}					
Prob. >F: RQ	0,12					
CD (R ²): RL	0,88					
RL	Y = -0,22x + 13,4					

[1]: T1: B2; T2: B3; T3: WLP002 English Ale-3; T4: S23 France Lager-2; T5: T58 Belga-2; T6: Diamond-2; T7: Diamond-3; T8: Yndhira; *: valor F altamente significativo (p<0,01); NS: não significativo (p>0,05); Prob.: probabilidade; CV: coeficiente de variação; RL: regressão linear, RQ: regressão quadrática; CD: coeficiente de determinação. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 6, a qual agrega os valores referentes à variável teor de etanol obtidos por cromatografia gasosa, nota-se novamente diferença significativa entre o crescimento das leveduras estudadas em CCA ou YPX, em relação ao rendimento da fermentação, sugerindo mais uma vez que a presença de xilose (YPX) durante a fase de crescimento fez com que gerasse mais quantidade de etanol durante a fermentação (4,34%, v/v), em relação ao crescimento em CCA (1,83%, v/v). Prompt (2012) ao estudar seis cepas de leveduras do gênero *Spathaspora*, fermentadoras de xilose, notou que, apesar de todas elas serem capazes de sintetizar etanol a partir de glicose ou xilose durante o crescimento aeróbico, elas apresentaram, com exceção de

uma cepa, rendimento na produção de etanol superior durante o crescimento em xilose como fonte de carbono, ao comparar com o crescimento em glicose.

Contudo, conforme demonstra a Tabela 6, durante o período da fermentação, a presença de xilose neste trabalho afetou seu rendimento, produzindo menos álcool etílico, e observa-se também que, assim como na Tabela 5, ao aumentar a concentração desta pentose durante este período, mais o rendimento das leveduras é afetado, sendo que a concentração dessa xilose em 0, 7,5 e 15% (m/v) resultou em teores alcoólicos, respectivamente, de 5,61, 4,31 e 3,10% (v/v), demonstrando significância para regressão linear e quadrática ao nível de 5% de probabilidade, porém com melhor ajuste na linha de tendência na equação de regressão linear ($R^2=1,00$).

Tabela 6. Análise do rendimento alcoólico da fermentação das leveduras

Teor de etanol [% (v/v)]	
Fator crescimento em CCA ou YPX	
CCA	1,83 b
YPX	4,34 a
CV (%)	15,0
Valor F	354*
Prob. >F	0,00001
Fator concentração de xilose na fermentação	
0%	5,61
7,5%	4,31
15%	3,10
CV (%)	15,0
Valor F	91,6*
Prob. >F	0,00001
Valor F: RL	118,2*
Prob. >F: RL	0,00001
Valor F: RQ	0,05**
Prob. >F: RQ	0,81
CD (R ²): RL	1,00
RL	$Y = -0,17x + 6,0$

*: valor F altamente significativo (prob.<0,01); **: valor F significativo a 5% de probabilidade; Prob.: probabilidade; CV: coeficiente de variação; RL: regressão linear, RQ: regressão quadrática; CD: coeficiente de determinação. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Fonte: Autores.

De acordo com Prompt (2012), para ocorrer a fermentação da biomassa lignocelulósica, é necessário que os microrganismos sejam hábeis em fermentar vários açúcares. Assim sendo, essa habilidade que as leveduras estudadas neste trabalho apresentaram de realizar fermentação em mosto contendo sacarose, glicose, frutose e, principalmente xilose (7,5 ou 15%), é uma característica importante para a produção de etanol de segunda geração. Entretanto, seria interessante averiguar o consumo de açúcares, para avaliar qual dessas fontes de carbono está sendo metabolizada pelas leveduras e a quantidade consumida, conforme realizado por Prompt (2012).

Apesar da grande maioria das linhagens naturalmente ocorrentes de *Saccharomyces cerevisiae* não serem capazes de metabolizar xilose (CGEE, 2010), é importante a descoberta de linhagens capazes de realizar fermentação de glicose a etanol na presença de xilose, diante da possibilidade de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes, com auxílio de ferramentas de engenharia genética. Assim sendo, segundo CGEE (2010), têm sido realizada a inserção de genes que codificam para o catabolismo de xilose em linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Prompt (2012), ao estudar novas espécies fermentadoras de xilose do gênero *Spathaspora*, avaliou se estas são capazes de (1) contribuir na produção de etanol a partir de co-fermentações xilose/glicose e (2) realizar fermentação de hidrolisados enzimáticos de biomassa lignocelulósica, a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

Com relação à (1), a autora verificou produção de etanol até cerca de 17 g L⁻¹ e que o consumo de glicose ocorreu primeiro, sendo a xilose consumida após a glicose ter sido fermentada pelas células. Ainda, Prompt (2012) notou uma diferença entre as leveduras quanto aos produtos da fermentação, como a concentração de etanol e xilitol. A autora observou levedura que produziu quantidade maior de xilitol em relação ao etanol, vice-versa ou praticamente a mesma quantidade e explica que o xilitol foi produzido apenas durante o consumo da xilose, sugerindo que ocorre um desvio na via de produção de etanol em direção à produção de xilitol, e possivelmente uma implicação direta do desbalanço de cofatores entre a xilose redutase (geralmente NADPH-dependente) e xilitol desidrogenase (geralmente NAD⁺-dependente).

No que se refere à (2), Prompt (2012) observou que o consumo da xilose pelas leveduras ocorreu mais lento do que o consumo da glicose e que a produção máxima de etanol, em 8 horas de fermentação, foi de cerca de 8 g L⁻¹. Assim sendo, a autora conclui que seus resultados obtidos de fermentação com hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana sugerem que, as novas espécies de leveduras capazes de fermentar xilose, sendo estudadas mais profundamente, possam ser no futuro utilizadas na síntese de bioetanol, partindo diretamente da biomassa lignocelulósica.

De acordo com Fugita (2010), o xilitol, além de ser um produto intermediário da via que realiza fermentação da xilose, é também fonte de carbono para certas espécies de leveduras. O autor, ao avaliar a capacidade fermentativa em hidrolisado hemicelulósico concentrado e sintético de bagaço de cana-de-açúcar das estirpes de leveduras metabolizadoras de xilose J10, J19.1 e CG, respectivamente, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula minuta* e *Candida guilliermondii*, observou produção de xilitol apenas no hidrolisado hemicelulósico concentrado sintético, sendo possível que as leveduras tenham metabolizado os açúcares por diferentes vias metabólicas, com síntese de

etanol partindo da glicose e produção de xilitol partindo da xilose. Com relação ao hidrolisado hemicelulósico concentrado, o autor sugere que também tenha sido possível a produção de xilitol, entretanto ele pode ser sido consumido pelas leveduras a fim de sintetizar etanol.

Segundo CGEE (2010), a maioria dos açúcares presentes nos hidrolisados são glicose e xilose - com quantidades inferiores de arabinose, galactose e manose – e os esforços iniciais têm sido focalizado, ao construir um microrganismo etanologênico, na co-fermentação de glicose e xilose. Nesse contexto, genes que codificam para que a xilose seja catabolizada têm sido implantados em linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, e tem sido construído linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de co-fermentar glicose e xilose, pela inserção de genes *Pichia stipitis* (XYL₁ e XYL₂) responsáveis por codificar para xilose redutase NADPH-dependente e xilitol desidrogenase NAD⁺-dependente, assim como para aumentar a expressão de xiluloquinase (CGEE, 2010).

Ao utilizar a linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, a qual é condicionada ao processo de produção de etanol 1G no Brasil, como plataforma de inserção de genes pertinentes a via de consumo de xilose, Santos (2017) construiu linhagens aplicando as duas vias conhecidas para converter xilose - via Xilose Redutase – Xilitol Desigrogenase (XR-XDH) e via Xilose Isomerase (*xyIA*). Assim sendo, com os procedimentos de engenharia metabólica e evolutiva, foram construídas diversas linhagens eficientes em converter xilose a etanol, atingindo rendimentos de até 0,46 g etanol/g xilose.

Com relação aos valores referentes à viabilidade celular após o processo fermentativo deste trabalho, também não foi possível analisar os resultados deste parâmetro e de células viáveis mL⁻¹ para a levedura T2, pelo mesmo motivo já apresentado. No que se refere aos demais tratamentos, conforme a Tabela 7, nota-se que não houve interação entre os três fatores estudados – tipo de levedura, crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose na fermentação.

Entretanto, houve interação entre os fatores crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose durante a fermentação, sendo que a análise de variância demonstrou valor F significativo para essa interação, enquanto a análise de regressão demonstrou significância para o valor F apenas no crescimento em YPX, com melhor ajuste quadrático na linha de tendência ($R^2 = 1,00$).

Ao considerar a concentração de xilose no meio de fermentação, 0, 7,5 ou 15% (m/v), os maiores valores de viabilidade celular para as leveduras foram alcançados com a concentração intermediária de xilose, tanto em YPX (95,7%) quanto em CCA (93,0%), enquanto o valor mais

baixo encontrado foi quando a concentração da pentose no meio de fermentação era de 15% (m/v), demonstrando que somente esta concentração afetou a viabilidade celular das leveduras.

Tabela 7. Análise de viabilidade celular das leveduras após a avaliação da fermentação

Viabilidade celular (%)						
Interação entre fator leveduras, crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose						
Leveduras ^[1]	-- Crescimento em CCA --			--- Crescimento em YPX ---		
	Concentração de xilose na fermentação					
	0%	7,5%	15%	0%	7,5%	15%
T1	97,4	100,0	96,7	89,9	98,3	90,5
T2	-	-	-	-	-	-
T3	91,5	93,5	86,6	93,8	94,8	84,8
T4	84,3	85,2	94,6	88,4	93,7	93,5
T5	99,6	96,6	96,4	97,0	97,3	75,7
T6	88,5	88,0	93,1	93,0	97,5	85,2
T7	93,6	96,3	89,3	95,9	90,9	82,3
T8	91,4	91,4	85,7	93,6	97,4	96,8
CV (%)	----- 7,71 -----					
Valor F	----- 0,93 ^{NS} -----					
Prob. >F	----- 0,52 -----					
Interação entre fator crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose						
Concentração de xilose na fermentação	Crescimento em CCA		Crescimento em YPX			
0%	92,3		93,1			
7,5%	93,0		95,7			
15%	91,8		87,0			
Valor F	----- 3,15* -----					
Prob. >F	----- 0,05 -----					
Valor F: RL	0,07 ^{NS}		7,83**			
Prob. >F: RL	0,79		0,006			
Valor F: RQ	0,25 ^{NS}		8,89**			
Prob. >F: RQ	0,62		0,004			
CD (R ²): RL	-		0,47			
RL	-		y = -0,41x + 95,0			
CD (R ²): RQ	-		1,00			
RQ	-		y = -0,10x ² + 1,10x + 93,1			

[1]: T1: B2; T2: B3; T3: English 3; T4: S23 2; T5: T58 2; T6: Diamond 2; T7: Diamond 3; T8: Yndhira; *: valor F significativo a 5% de probabilidade; **: valor F altamente significativo (prob.<0,01); NS: não significativo (p>0,05); Prob.: probabilidade; CV: coeficiente de variação; RL: regressão linear, RQ: regressão quadrática; CD: coeficiente de determinação.

Fonte: Autores.

Fugita (2010), desta vez ao avaliar a capacidade fermentativa em hidrolisado hemicelulósico original e sintético de bagaço de cana-de-açúcar das estirpes J10, J19.1 e CG, observou que a viabilidade celular se manteve acima de 94%, sendo que houve uma pequena redução deste parâmetro a partir de 6 horas de fermentação, decorrente provavelmente do esgotamento do meio. Porém, essa redução manteve acima de 92% durante as 12 horas de fermentação, não afetando negativamente o processo.

A característica positiva que essas leveduras apresentaram de manter a viabilidade celular alta durante a fermentação também foi observada pelas leveduras avaliadas neste trabalho, uma vez que as leveduras que tiveram seu crescimento em CCA mantiveram a viabilidade em cerca de

92%, sendo que no início do processo esse valor era quase 98%, sugerindo, assim como observou Fugita (2010), redução da viabilidade celular devido ao esgotamento do meio.

Entretanto, as leveduras que cresceram em YPX, apresentaram viabilidade celular de cerca de 92% após a fermentação, enquanto antes de iniciar o processo esse valor era de 77%. Nesse caso, pode ser que as leveduras estavam sob condições de estresse durante a fase de crescimento em YPX, devido à presença de xilose, porém, durante a fermentação, essas leveduras demonstraram-se mais adaptadas a essa pentose do que aquelas que cresceram no meio que não possuía xilose (CCA).

A alta viabilidade celular durante a fermentação também indica que as leveduras estudadas apresentaram tolerância ao etanol produzido, sendo esta uma característica almejada nos processos fermentativos, uma vez que, de acordo com BNDES e CGEE (2008), o processo de fermentação mais empregado nas destilarias do Brasil é o Melle-Boinot, cuja principal característica é a recuperação das leveduras do vinho através de sua centrifugação, possibilitando, após a fermentação, a recuperação e tratamento das leveduras para novo uso.

Sandri et al. (2018), ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de etanol – 0, 20, 40 e 60 g/L de etanol – sobre a fermentação de xilose pela levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* MDS 130 em meio YPX – 1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% xilose; m/v – observou que esta cepa sofreu expressiva influência do etanol, apresentando limite extremamente baixo de tolerância, em torno de 20 g/L, demonstrando a levedura recombinante ser menos resistente aos efeitos nocivos do etanol, ao comparar com as leveduras selvagens comumente empregadas nos processos fermentativos industriais.

Assim sendo, Sandri et al. (2018) concluíram que concentrações inferiores a 20 g/L de etanol no meio não inibe ou apresenta toxicidade sobre o metabolismo das células, mesmo com exposição prolongada ao etanol, uma vez que até 120 horas de avaliação o perfil da velocidade de fermentação não apresentou alterações significativas. Ao avaliar a viabilidade celular ao final das fermentações para o meio YPX sem suplementação de etanol e nas concentrações de 20, 40 e 60 g/L, os autores notaram, respectivamente, valores de viabilidade de 98, 97, 88 e 33%, sendo o efeito nocivo do etanol, em concentrações superiores, sobre as células, corroborado pela densidade óptica mensurada também ao final das fermentações, com valores de 3,10, 2,32, 2,08 e 0,3 em ordem crescente da suplementação de álcool etílico no meio.

Com relação à avaliação das células viáveis mL⁻¹ após o término de avaliação da fermentação (Tabela 8), nota-se valor maior deste parâmetro nas células que tiveram seu crescimento na presença de xilose (YPX). Partindo disso, ao considerar agora também a

concentração de xilose durante a fermentação, nota-se um valor próximo deste parâmetro entre 0% ($3,18 \cdot 10^{-7}$) e 7,5% ($3,16 \cdot 10^{-7}$) de xilose (m/v), indicando que a concentração de xilose de 7,5% (m/v) pouco afetou a quantidade de células viáveis mL^{-1} , diferentemente de 15% (m/v) de xilose ($2,51 \cdot 10^{-7}$). Portanto, os melhores resultados para este parâmetro, dentro das leveduras que cresceram na presença de xilose (YPX) durante a fase de crescimento e realizaram fermentação na presença de 7,5% (m/v) de xilose, foram T3, T5 e T6.

Tabela 8. Análise de células viáveis mL^{-1} das leveduras após a avaliação da fermentação

Células viáveis mL^{-1} (10^7)						
Interação entre fator leveduras, fator crescimento em CCA ou YPX e concentração de xilose						
Leveduras ^[1]	----- Crescimento em CCA -----			----- Crescimento em YPX -----		
	----- Concentração de xilose na fermentação -----					
	0%	7,5%	15%	0%	7,5%	15%
T1	1,92 bcd	0,53 b	0,83 b	2,85 b	2,65 cd	1,63 d
T2	-	-	-	-	-	-
T3	3,90 a	1,68 a	1,28 b	3,68 b	3,58 abc	1,97 bcd
T4	1,27 d	0,45 b	2,87 a	2,82 b	2,47 d	1,70 cd
T5	3,78 a	0,97 ab	1,35 b	4,75 a	3,68 ab	2,63 abc
T6	2,83 b	0,88 ab	1,45 b	3,67 b	4,52 a	3,38 a
T7	2,40 bc	0,67 b	1,10 b	1,57 c	2,25 d	2,90 ab
T8	1,48 cd	0,65 b	0,80 b	2,92 b	2,97 bcd	3,37 a
CV (%)	----- 24,2 -----					
Valor F	----- 4,00* -----					
Prob. >F	----- 0,0002 -----					
Fator crescimento em CCA ou YPX ^[2]						
CCA	1,58 b					
YPX	2,95 a					
Valor F	197,3					
Prob. F	0,00001*					
Interação entre fator crescimento em CCA ou YPX ^[2] e concentração de xilose						
Concentração de xilose na fermentação	--- Crescimento em CCA ---			----- Crescimento em YPX ^[1] -----		
0%	2,51			3,18		
7,5%	0,83			3,16		
15%	1,38			2,51		
Valor F	----- 3,15** -----					
Prob. >F	----- 0,05 -----					
Valor F: RL	44,4*			15,5*		
Prob. >F: RL	0,0001			0,0004		
Valor F: RQ	57,7*			4,59**		
Prob. >F: RQ	0,0001			0,033		
CD (R ²): RL	0,44			0,77		
RL	y = -250794x + 7134921			y = -148148x + 10944444		
CD (R ²): RQ	1,00			1,00		
RQ	y = 66032x ² - 1241270x + 8373016			y = -18624x ² + 131217x + 10595238		

[1]: T1: B2; T2: B3; T3: English 3; T4: S23 2; T5: T58 2; T6: Diamond 2; T7: Diamond 3; T8: Yndhira; *: valor F altamente significativo (prob.<0,01); **: valor F significativo a 5% de probabilidade; NS: não significativo (p>0,05); Prob.: probabilidade; CV: coeficiente de variação; RL: regressão linear, RQ: regressão quadrática; CD: coeficiente de determinação. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Por fim, Moraes (2012) avaliou a fermentação das linhagens de leveduras RL1 e RL5, extraídas da casca de uva rubi, variando a concentração de xilose no meio ou o potencial hidrogeniônico (pH). A autora notou, no que se refere à tolerância dos diferentes teores de xilose (2, 3, 4 e 5%), que quanto maior a concentração desta pentose, maior foi a produção de etanol, variando de 2,0 (2% xilose) a 6,2 g/L (5% xilose), entretanto nem sempre o maior teor de xilose representou melhor rendimento da conversão de substrato a etanol.

No presente estudo, notou-se, como discutido, resultado inverso ao obtido por Moraes (2012), uma vez que quanto maior foi a concentração de xilose no meio, menor foi o rendimento etanólico, demonstrando que a xilose promoveu certa inibição no metabolismo fermentativo das leveduras estudadas, porém não anulou a síntese de álcool. Assim sendo, ressalta-se a importância da condução de novos estudos, em que se avalie, além de 0, 7,5 e 15% (m/v) de xilose, outras concentrações dentro deste intervalo. Sugere-se que, a concentração da pentose avaliada não ultrapasse 15%, já que alguns estudos conduzidos com hidrolisado de materiais lignocelulósicos (PROMPT, 2012; FUGITA, 2010), indicaram que este mosto, caso preparado a partir de bagaço, não ultrapassa a concentração de xilose em 7% (m/v).

Com relação ao potencial hidrogeniônico, Moraes (2012) observou, ao avaliar dez distintos valores de pH, variando de 3,5 a 6,0, que houve alteração nos valores iniciais deste parâmetro ao final de 48 horas de fermentação, com exceção do pH 6,0, que se manteve. A autora concluiu que os pHs iniciais testados de 3,5 a 5,5 não eram os ideais para que as leveduras avaliadas fermentassem xilose, já que elas alteram estes valores iniciais. Entretanto, alcançou-se bons resultados com pH 6,0, sendo este valor que as leveduras consumiram mais xilose. Assim sendo, o presente estudo foi conduzido com pH 4,5, sendo sugerido a condução de novos experimentos em pH 6,0, a fim de avaliar se esta modificação é capaz de aprimorar a atuação das leveduras na produção de etanol.

CONCLUSÃO

As leveduras estudadas não tiveram seu metabolismo fermentativo inibido pela presença de xilose, de forma que o crescimento prévio delas em YPX (1% xilose) melhorou a eficiência fermentativa, sugerindo que a presença de xilose (YPX) na fase de crescimento permita uma pré-adaptação das leveduras a esta pentose na etapa de fermentação. Entretanto, a presença de xilose no mosto de fermentação afetou o rendimento da produção de etanol, sendo que quanto maior sua concentração (7,5 e 15%, m/v), menor é a produção de álcool.

As leveduras estudadas não apresentaram diferença significativa na produção de etanol por fermentação, sendo possível selecionar as mais eficientes pela viabilidade celular e células viáveis mL⁻¹ antes e após a fermentação. Entretanto, é necessário avaliar para cada variável do experimento, como o crescimento em CCA ou YPX e a concentração de xilose (0, 7,5 ou 15%, m/v) na fase de fermentação, uma vez que as leveduras apresentaram diferentes comportamentos de acordo com as variáveis em que foram submetidas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E. S. et al. Eficácia dos métodos de higienização de utensílios em restaurantes comerciais. *Rev. Simbio-Logias*, v. 3, n. 5, 2010. Disponível em: http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Educacao/Simbio-Logias/eficacia_metodos_higienizacao_utensilios.pdf. Acesso em: 10 mar. 2019.
- ARANTES, J. T. Descoberta na Amazônia enzima-chave para obtenção do etanol de segunda geração. *Agência FAPESP*, 11 maio 2018. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/descoberta-na-amazonia-enzima-chave-para-obtencao-do-etanol-de-segunda-geracao/27778/>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- AUGUSTO, M. et al. Teste de assimilação e fermentação de seis isolados utilizando a xilose. In: Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, 5.; ENEPE UFGD, 12.; EPEX UEMS, 9., 2018, Dourados. *Anais...* Disponível em: <http://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/3076.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2019.
- BARROS, D. F. et al. Avaliação microbiológica do suco de laranja *in natura* comercializado em via pública na zona central de São Paulo-SP. *Revista Univap*, São José dos Campos, v. 21, n. 37, p. 50-56, 2015. Disponível em: <https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/viewFile/175/264>. Acesso em: 10 mar. 2019.
- BNDES; CGEE (Org.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- BONOMI, A. Workshop hidrólise de material lignocelulósico. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Blucher, 2010. P. 679-695.
- BRASIL. *Entenda o que é e como funciona o RenovaBio*. 2017a. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/economia-e-financas/2017/12/entenda-o-que-e-e-como-funciona-o-renovabio>. Acesso em: 24 fev. 2019.
- BRASIL. *Plano Decenal de Expansão de Energia 2027*. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME/EPE, 2018. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-332/PDE%202027.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2018.

Bioenergia em revista: diálogos, ano 9, n. 2, julh./dez. 2019. P. 35-61.
Silva, Fabio Sousa Guedes; Gomes, Winston Pinheiro Claro; Nascimento, Daniela Defávares do
Avaliação da fermentação de leveduras visando produção de etanol de segunda geração

BRASIL. *RenovaBio: Biocombustíveis 2030*. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro: MME/EPE, 2017b. (Nota Técnica: Papel dos biocombustíveis na matriz). Disponível em:

http://www.mme.gov.br/documents/10584/7948692/EPE_NT1_PAPEL+DOS+BIOCOMBUST%20VEIS.pdf/779d7ffd-4169-4e10-a1a1-9a93184f6209;jsessionid=BC69E6F175F98A700035966D239A65BA.srv154. Acesso em: 24 fev. 2019.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Blucher, 2010. P. 365-380.

BUZANELLO, E. B. et al. Determinação de coliformes totais e termotolerantes na água do lago municipal de Cascavel, Paraná. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 6, supl. 1, p. 59-60, 2008. Disponível em:

<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/1087/811>. Acesso em: 10 mar. 2019.

CAMPOS, V. J. *Caracterização fisiológica de leveduras fermentadoras de xilose*. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Disponível em:

<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/10016/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 jan. 2019.

CECCATO-ANTONINI, S. R. *Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias*. São Carlos: EdUFSCar, 2011. (Coleção UAB-UFSCar).

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. *Química verde no Brasil: 2010-2030*. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. Disponível em:

https://www.cgее.org.br/documents/10195/734063/Livro_Quimica_Verde_9560.pdf. Acesso em: 23 jan. 2019.

COLORAÇÃO com azul-de-metileno. *Revista Interna Técnica do Vinho*, p. 1, 2003. Disponível em: <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto14401-01-1.pdf>. Acesso em 19 nov. 2018.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar*, v. 5 – Safra 2018/19, n. 3 – Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-71, dez. 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 28 dez. 2018.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar*, v. 5 – Safra 2018/19, n. 4 – Quarto levantamento, Brasília, p. 1-75, abril 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 25 maio 2019.

DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; BARBOSA, G. V. S. (Org.). *45 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 25 anos de Ridesa*. Curitiba: Graciosa, 2015.

Bioenergia em revista: diálogos, ano 9, n. 2, julh./dez. 2019. P. 35-61.

Silva, Fabio Sousa Guedes; Gomes, Winston Pinheiro Claro; Nascimento, Daniela Defávares do
Avaliação da fermentação de leveduras visando produção de etanol de segunda geração

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Genômica funcional, transcriptômica e metabolômica, de leveduras fermentadoras de xilose para aumento da eficiência na produção de etanol de segunda geração*. [site institucional que contém informação sobre o projeto desenvolvido pela empresa]. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/204338/genomica-funcional-transcriptomica-e-metabolomica-de-leveduras-fermentadoras-de-xilose-para-aumento-da-eficiencia-na-producao-de-etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em: 23 jan. 2019.

FUGITA, T. P. L. *Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana*. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/m/83722.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

GALBE, M; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Blucher, 2010. P. 697-716.

MONGELO, A. I. *Validação de método baseado em visão computacional para automação da contagem de viabilidade de leveduras em indústrias alcooleiras*. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande. Disponível em: <http://www.gpec.ucdb.br/pistori/orientacoes/dissertacoes/arnaldo2012.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

MORAES, D. C. *Seleção de micro-organismos fermentadores de xilose em etanol a partir de diferentes variedades da casca de uvas (*vitis spp*)*. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Bociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88389/moraes_dc_me_sjrp.pdf?sequence=1. Acesso em: 28 abril 2019.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. *Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos*. Piracicaba, FEALQ, 2002.

PROMPT; A. H. *Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição*. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/100823/315055.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 jan. 2019.

QUINTERO-RAMIREZ, R. Hidrólise da biomassa lignocelulósica. In: CORTEZ, L. A. Moraes B. (Coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Blucher, 2010. P. 717-731.

SANDRI, J. P. et al. Fermentação da xilose por *S. Cerevisiae* recombinante: tolerância ao etanol. In: Congresso brasileiro de Engenharia Química, 22., 2018, São Paulo; Encontro brasileiro sobre o ensino de engenharia química, 17., 2018, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Blucher, 2018. P. 3394-3397. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2018/PT.0897.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

SANTOS, L. V. dos. *Da ciência à indústria – engenharia metabólica e evolutiva de Saccharomyces cerevisiae para a produção de etanol de segunda geração*. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/331434>. Acesso em: 25 maio 2019.

VIANA, N. C. *Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica*. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-04082017-151130/pt-br.php>. Acesso em: 23 mar. 2019.

VIELMO, N. I. C. et al. Presença de coliformes, fungos e leveduras em méis de abelhas africanizadas comercializados sem fiscalização. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25.; CIGR Section IV Internacional Technical Symposium, 10., 2016, Gramado. *Anais...* Porto Alegre: FAURGS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/1474.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2019.

ZUURBIER, P; VOOREN, J. V. D. Introduction to sugarcane ethanol contributions to climate change mitigation and the environment. In: ZUURBIER, P; VOOREN, J. V. D (Ed.). *Sugarcane ethanol: Contributions to climate change mitigation and the environment*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2008. P. 19-27.

1 Fabio Sousa Guedes SILVA concluiu o Ensino Médio e a Educação Profissional Técnica de Nível Médio em Química na ETEC Coronel Fernando Febeliano da Costa, em Piracicaba/SP. Atualmente está cursando Ensino Superior, graduação em Tecnologia em Biocombustíveis (3º ano) pela Faculdade de Tecnologia (FATEC), em Piracicaba/SP, estagiando no laboratório de físico-química da Mérieux Nutriscience, no mesmo município. Cursa inglês no nível B1+ na Achieve Languages, em Piracicaba/SP.

2 Winston Pinheiro Claro GOMES é Graduando em Tecnologia em Alimentos na Faculdade de Tecnologia de Piracicaba - Centro Paula Souza, onde é estagiário no Laboratório de Cromatografia sendo que no período de agosto de 2018 até dezembro de 2018 teve a orientação da MSc. Fabiana Yoshinaga e Dra. Ana Lúcia Piedade Sodero Martins Pincelli e a partir de fevereiro de 2019 passa a ser orientado pela Dra. Gisele Gonçalves Bortoleto, onde a partir de agosto de 2019 passar se aluno de Iniciação Científica no projeto “Análise de álcoois superiores em cervejas artesanais por Cromatografia Gasosa empregando Headspace” e também é estagiário no Laboratório de Biotecnologia, orientado pela Dra. Daniela Defávares do Nascimento. Graduado em Tecnologia Têxtil pela Faculdade de Tecnologia de Americana - Centro Paula Souza, em dezembro de 2010, com o título “Como ter uma confecção de toalha de mesa e pano de prato, eficiente e com o maior retorno possível em pequeno prazo”, onde foi bolsista pelo “Programa de Iniciação Científica e Tecnológica para Micro e Pequenas Empresas - BITEC” na Europa Indústria Têxtil LTDA no período de julho de 2008 à fevereiro de 2009 em Americana, SP. Atualmente é professor nos cursos técnico na Faculdade de Americana - FAM.

3 Daniela Defavari do NASCIMENTO possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo (1997), graduação em Licenciatura Em Ciências Agrárias pela ESALQ/USP (1998), mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela ESALQ/USP (2000) e doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela ESALQ/USP (2005). Especialista (MBA) em Agronegócios pelo PECEGE/ESALQ/USP (2012). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura de tecidos, micropropagação de plantas, clonagem gênica, transformação genética de plantas (Tabaco, Arabidopsis, Eucalipto e cana-de-açúcar), análises moleculares. Desde 2010 é professora concursada por prazo indeterminado para as disciplinas: Biotecnologia dos cursos de Graduação em Biocombustíveis e em Alimentos, e Bioquímica de Alimentos do curso de Graduação em Alimentos todos da FATEC Piracicaba.