

MARÍA XIMENA DÍAZ RAMÍREZ

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS PARA  
FERMENTAÇÃO DIRETA DE AMIDO DE MANDIOCA TIPO  
INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D542s  
2017

Díaz Ramírez, María Ximena, 1992-

Seleção e identificação de leveduras para fermentação  
direta de amido de mandioca tipo industrial / María Ximena Díaz  
Ramírez. – Viçosa, MG, 2017.

x, 47f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Monique Renon Eller.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Leveduras. 2. Álcool. 3. Amido. 4. Fermentação.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia  
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

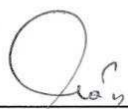
CDD 22 ed. 664.68


MARÍA XIMENA DÍAZ RAMÍREZ

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS PARA  
FERMENTAÇÃO DIRETA DE AMIDO DE MANDIOCA DO TIPO  
INDUSTRIAL**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de maio de 2017.

  
\_\_\_\_\_  
Mônica Ribeiro Pirozi  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Paulo Henrique Alves Da Silva  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Luciano Gomes Fietto

  
\_\_\_\_\_  
Monique Renon Eller  
(Orientadora)

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

(Carl Sagan)

A meus pais pelo apoio e dedicação à conquista dos meus sonhos, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente a Deus por me acompanhar neste longo caminho que um dia decidi começar longe de casa, Ele que me deu forças para chegar até o fim.

Agradeço aos meus pais que desde um início me apoiaram em cada decisão, por estar aí do meu lado mesmo de longe dando-me suporte para dar cada passo. Graças a vocês hoje mais um objetivo de vida culmina.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento de bolsa de iniciação científica.

Ao Departamento de Tecnologia em Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA/UFV) por possibilitar minha pesquisa.

À empresa Cassava s.a. pela doação do amido de mandioca industrial.

À empresa Prozyn pela doação da enzima StarMax 300, utilizada neste estudo.

Ao Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia Agrícola, pelo apoio e auxílio à minha pesquisa, fornecendo os equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento da mesma.

À minha orientadora Monique Renon Eller, por todo apoio, paciência e conhecimento a mim concedido. Obrigada por cada palavra de apoio, por cada incentivo e por não me deixar desistir.

Aos co-orientadores Mônica Ribeiro Pirozi e Paulo Henrique Alves da Silva pelas orientações dadas ao longo da minha pesquisa.

Ao Fernando Augusto da Silveira, Lorena Lima e Pedro Vidigal, pelas orientações dadas, e principalmente pela disponibilidade a me ajudar sempre que precisei. De coração, meus mais sinceros agradecimentos.

Às minhas estagiárias Isabela Fernandes e Palloma Lakitin, obrigada por aprenderem junto comigo, por não desistirem ainda com tantas dificuldades ao longo do caminho, agora podemos dizer que cada chegada na madrugada, cada dia a dia sem descanso no laboratório valeu a pena. Sem vocês não teria conseguido!!

À minha amiga Mayara Salgado Silva, obrigada por me ajudar desde o início da minha chegada, pelos ensinamentos concedidos, pela paciência, e por lutar ao meu lado para conseguir cumprir um grande objetivo na minha vida.

Aos meus amigos, que mesmo perto ou de longe me apoiaram e acreditaram em mim, especialmente a Oscar Medina e Luis Causado. Obrigada pela amizade e pela companhia.

Ao pessoal do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos (LAPROBQI) pela ajuda e principalmente pela amizade. Levo vocês no meu coração.

À minha amiga Maryoris pelo grande apoio e pela amizade.

Ao Breno Colares, por cada palavra de incentivo, pela paciência e apoio, e por estar aí para mim mesmo de longe.

Aos Laboratórios de Biomoléculas e Bioprocessos, Química e Tecnologia de Cereais e ao Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica, pela disposição de equipamentos e material para o desenvolvimento da minha pesquisa.

**OBRIGADA!!!**

## **BIOGRAFIA**

MARÍA XIMENA DÍAZ RAMÍREZ, filha de Ernelda María Ramírez Mercado e Luis Fernando Díaz Rodríguez, nasceu em Sincé, Sucre, Colômbia no dia 06 de novembro de 1992.

Em janeiro de 2015, graduou-se como Engenheira Agroindustrial pela Universidad de Sucre, Colômbia.

Em março de 2015, ingressou no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, na área de Processos Bioquímicos e Fermentativos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2. OBJETIVOS .....	12
2.1. OBJETIVO GERAL .....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA – PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE AMIDO .....	13
3.1. BIOETANOL .....	13
ASPECTOS ECONÔMICOS .....	13
3.2. PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE AMIDO .....	14
Características da matéria-prima .....	15
<i>Hidrólise do amido</i> .....	17
<i>Enzimas responsáveis pela hidrólise do amido</i> .....	17
<i>Liquefação</i> .....	19
<i>Sacarificação</i> .....	19
<i>Fermentação</i> .....	20
<i>Leveduras usadas na produção de bioetanol a partir do amido</i> .....	20
<i>Destilação</i> .....	21
<i>Desidratação</i> .....	22
3.3. FORMAS DE CONDUÇÃO DE PROCESSOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE AMIDO .....	22
<i>Hidrólise e fermentação separadas (SHF)</i> .....	23
<i>Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)</i> .....	24
BIOPROCESSO <i>consolidado</i> (CBP) .....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
MEIOS DE CULTURA .....	26
4.1. Isolamento e manutenção das leveduras .....	26
4.2. Caracterização morfológica .....	27
4.3. Avaliação da produção de etanol .....	27
4.4. Identificação dos isolados .....	29

4.5. Efeito do etanol sobre o crescimento dos isolados.....	30
4.6. Avaliação da fermentação de substrato sobre a produção de etanol. .....	30
4.7. Avaliação da modalidade do processo fermentativo sobre a produção de etanol.....	31
<i>Sacarificação e fermentação separadas (SHF)</i> .....	31
<i>Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)</i> .....	31
<i>Bioprocesso consolidado (CBP)</i> .....	32
<i>Determinação da concentração de amido residual no meio</i> .....	32
<i>Determinação dos coeficientes de rendimento</i> .....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	34
5.1. Isolamento e caracterização morfológica de leveduras .....	34
5.2. Avaliação da produção de etanol pelos isolados .....	36
5.3. Identificação dos isolados .....	40
5.4. Efeito do etanol sobre os isolados .....	43
5.5. Efeito da concentração de amido sobre a produção de etanol .....	44
5.6. Seleção da modalidade do processo fermentativo .....	45
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## RESUMO

RAMÍREZ, María Ximena Díaz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2017. **Seleção e identificação de leveduras para fermentação direta de amido de mandioca tipo industrial.** Orientadora: Monique Renon Eller. Coorientadores: Paulo Henrique Alves da Silva e Mônica Ribeiro Pirozi.

O objetivo deste trabalho foi o isolamento de leveduras para produção de etanol a partir de amido de mandioca industrial, uma variedade adaptável a diversas condições climáticas e, portanto, cultivável em locais onde outros alimentos não poderiam ser produzidos. Para tanto, 62 isolados foram obtidos a partir de inhame, milho, batata inglesa e mandioca industrial e avaliados quanto à sua capacidade de produção de etanol em um meio contendo amido. O isolado N43, obtido de inhame, apresentou maior capacidade de conversão ( $> 6 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol), enquanto o isolado BB4, obtido de batata inglesa, foi o mais produtivo ( $0,78 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de etanol), seguido por MB9, obtido de mandioca. Eles foram identificados por sequenciamento do gene 26S como *Cândida quercitrusa* (N43), *Pichia kudriavzevii* (BB4) e *Hanseniaspora opuntiae* (MB9) e avaliados quanto à tolerância a meios contendo etanol. Nesse contexto, a levedura BB4 foi selecionada e utilizada para a definição de condições de processo visando a maiores rendimentos em etanol. Em geral, menores concentrações de amido no meio induziram maior produção de etanol (até  $3,4 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol em  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de amido). A modalidade de sacarificação e fermentação separadas (SHF) foi a que gerou maior quantidade de etanol após 96 h de processo, seguida pelo bioprocesso consolidado (CBP) e então sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), mostrando a importância das condições de fermentação na produtividade dessa levedura e o potencial da BB4 em produzir enzimas amilolíticas. Os resultados evidenciam o potencial das matérias-primas amiláceas como fontes de leveduras para processos fermentativos, o que pode levar ao desenvolvimento de uma nova estratégia de baixo custo para a produção de biocombustíveis no Brasil.

## ABSTRACT

Ramirez, María Ximena Díaz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2017. **Yeast selection to production of ethanol from industrial cassava's starch.** Advisor: Monique Renon Eller. Co-advisors: Paulo Henrique Alves da Silva and Mônica Ribeiro Pirozi.

The objective of this investigation was the yeast's isolation for production of ethanol from industrial cassava's starch, which is adapted to several climate conditions and, therefore, possible to cultivate where other kinds of food cannot. To do so, 62 isolates were obtained from yam, corn, England potato and industrial cassava and analyzed by their capacity of ethanol's production in a medium containing starch. The isolate N43, obtained from yam, presented the highest capacity of conversion, while the isolates BB4 and MB9, obtained from England potato and cassava, respectively, were the most productive. The yeasts in these isolates were identified using a sequence of the gene 26S as *Cândida quercitrusa* (N43), *Pichia kudriavzevii* (BB4) and *Hanseniaspora opuntiae* (MB9) and then evaluated by their tolerance to media containing ethanol. In this sense, the BB4 yeast was selected and used to define the process conditions aiming a higher efficiency on ethanol production. In general, smaller concentrations of starch resulted in better yields. The Separated Hydrolysis & Fermentation (SHF) had the best yield in ethanol after 96 hours of process, followed by the Consolidated Bio-processing (CBP) and the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), respectively, showing the importance of the fermentation's conditions in the yeast productivity and the BB4 potential to produce amylolytic enzymes. The results shows the starchy raw materials' potential as yeast's sources to fermentation process. The optimization of the conditions is essential to simplify the ethanol production from this yeast, which can help the developing of a new low cost process to produce biofuel in Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de etanol combustível enfrenta uma série de desafios como à busca por matéria-primas que não concorram com a produção alimentícia e que sejam rentáveis. Uma fonte alternativa que tem sido estudada para esse fim é a mandioca, especificamente a do tipo “industrial”. Esta planta é capaz de se adaptar a uma grande diversidade de condições climáticas, podendo, portanto, ser cultivada em locais onde outras espécies vegetais não se desenvolveriam. Além disso, ela possui teores elevados de compostos cianogênicos, não sendo útil para consumo direto na alimentação humana.

A produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas passa por uma série de etapas, dentre as quais se destacam a hidrolítica, para disponibilização do substrato ao biocatalisador, e a fermentativa. Para a primeira são utilizadas enzimas amilolíticas, principais responsáveis pelos custos da produção do combustível. Para a etapa fermentativa são utilizados microrganismos, principalmente leveduras, essenciais para o rendimento do processo.

Nas indústrias cujo objetivo é o uso de matérias-primas amiláceas para produção de bioetanol, faz-se necessária a busca por microrganismos capazes de hidrolisar e fermentar de forma direta o amido, o que tornaria o processo mais viável. Ao longo dos anos, várias pesquisas têm buscado a obtenção de leveduras amilolíticas capazes de hidrolisar o amido e, ao mesmo tempo, capazes de utilizar os produtos resultantes com alta eficiência para a produção de álcool. Alguns pesquisadores identificaram essas leveduras, porém com baixa eficiência de conversão, o que tornaria necessário o uso de um segundo microrganismo para a transformação dos açúcares em etanol.

O objetivo desse trabalho foi isolar e selecionar leveduras capazes de viabilizar a produção de etanol a partir da mandioca industrial a fim de tornar o processo mais rápido e menos oneroso.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Isolar e identificar uma levedura apropriada para fermentação direta de amido de mandioca industrial para produção de etanol.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar leveduras a partir de fontes amiláceas;
- Caracterizar, identificar e selecionar as leveduras com maior capacidade de fermentar amido a etanol;
- Determinar as condições de maior produtividade pela levedura selecionada;
- Avaliar a produção de etanol pela levedura nas modalidades de processo de sacarificação e fermentação separadas, sacarificação e fermentação simultâneas e bioprocessos consolidados.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA – PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE AMIDO**

O Brasil é o maior exportador de bioetanol, o qual é produzido a partir de cana-de-açúcar com alto rendimento e baixo custo de produção (Brasil, 2014). Entretanto, a atual crise energética mundial tem aumentado o interesse pela busca de matérias-primas alternativas para a produção de biocombustíveis, assim como o desenvolvimento de novos processos que permitam fornecer um produto acessível ao mercado. Nesta revisão serão abordados os aspectos econômicos da produção de bioetanol e como essa produção pode ser realizada utilizando amido de mandioca industrial como matéria-prima.

#### **3.1. BIOETANOL**

##### ***Aspectos econômicos***

A população mundial está em constante crescimento e com ela cresce também a demanda energética. Em breve as fontes utilizadas para a produção de energia (combustíveis fósseis como o petróleo e seus derivados) não serão suficientes para cobrir a demanda mundial. Além disso, o uso deste tipo de combustível é apontado como uma das principais razões da poluição ambiental e do aquecimento global (Balat, 2011). A sua queima gera grandes quantidades de gases de efeito estufa, e por isso alternativas sustentáveis de produção de energia têm sido encorajadas, como os biocombustíveis.

Biocombustível é definido como “combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”, segundo a Legislação Brasileira (Conselho Nacional de Política Energética, 1997). O termo biocombustível inclui combustíveis líquidos como o etanol, metanol e o biodiesel, ou gasosos como o hidrogênio e o metano, os quais são produzidos a partir da biomassa e oferecem vantagens de

sustentabilidade, diversidade, aumento do número de empregos na área rural, desenvolvimento agrícola, competitividade internacional, redução da dependência do petróleo importado e, principalmente, redução das emissões de gases do efeito estufa (Balat, 2011; Balat, Balat e Öz, 2008).

O bioetanol é o biocombustível mais utilizado mundialmente. Sua produção aumenta a cada ano, passando de 65 bilhões de litros em 2008 a mais de 90 bilhões de litros em 2015, segundo dados da Renewable Fuel Association (2016). Os países com maior produção de biocombustível são os Estados Unidos e o Brasil, representando mais de 80% da produção mundial (RFA, 2016). As matérias-primas mais empregadas nesses países são o milho e a cana-de-açúcar, respectivamente.

O Brasil vem produzindo etanol desde o ano de 1975, quando o programa Pró-Álcool do Governo Federal foi implementado com o objetivo de garantir o fornecimento de energia à população em vista das crises do setor petrolífero (Kohlhepp, 2010). Nos últimos cinco anos o Brasil aumentou a produção de etanol em 30%, tendo produzido cerca de 27 bilhões de litros no ano 2016 (RFA, 2016).

Ao longo da história da produção de etanol há a preocupação com relação às fontes vegetais utilizadas, uma vez que estas são utilizadas também para a produção de alimentos, afetando sua disponibilidade no mundo. Matérias-primas alternativas são alvos de pesquisa, tais como o sorgo e a mandioca brava, também chamada de mandioca industrial (Kang *et al.*, 2014).

### **3.2. PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE AMIDO**

A produção tradicional de etanol a partir de amido ocorre em cinco etapas, iniciando-se com uma hidrólise, que é feita devido à dificuldade de ruptura da estrutura dos grânulos de amido, o que permite a liberação de açúcares fermentescíveis para a produção do etanol. A hidrólise inclui as etapas de liquefação e sacarificação; em seguida, é feita a fermentação usando principalmente leveduras; destilação do fermentado

para produção de etanol hidratado, e finalmente, a desidratação para obtenção do bioetanol anidro.

### ***Características da matéria-prima***

A produção de mandioca aumentou em 60% entre os anos de 2000 e 2012, segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization*). Ainda segundo a agência, este aumento foi impulsionado pelo incremento das aplicações industriais dessa matéria-prima, especialmente para a produção de etanol e amido.

Existem dois tipos de mandioca, as chamadas doces e as amargas, as quais se diferenciam nos teores de compostos cianogênicos e mediante os quais é estabelecida a destinação final da mandioca. As espécies doces possuem baixos teores destes compostos, portanto são destinadas ao consumo *in natura*, enquanto as variedades amargas, as quais possuem maiores teores de compostos cianogênicos, são utilizadas após processamento, sendo também conhecidas como mandioca tipo industrial (FAO, 2013).

A mandioca industrial possui teores de amido mais elevados em comparação com as espécies doces (quadro 1), sendo portanto uma matéria-prima cotada para produção de bioetanol. Além disso, mandiocas deste tipo possuem resistência a condições climáticas adversas e alta produtividade em terras improdutivas (Ajibola, Edema e Oyewole, 2012; Alves, 2002; Zhu, 2015). Dessa forma, a mandioca industrial pode ser cultivada em áreas onde outras culturas alimentares não se desenvolvem, favorecendo a estabilidade no fornecimento de alimentos uma vez que não compete com recursos como água e terra.

**Quadro 1.** Diferenças na composição da raiz de mandioca tipo doce e a raiz de mandioca tipo industrial.

<b>Composição média de mandioca doce e industrial na América Central (100 g de amostra, base seca)</b>		
<b>COMPOSTOS</b>	<b>RAIZ DE MANDIOCA DOCE</b>	<b>RAIZ DE MANDIOCA INDUSTRIAL</b>
Valor energético (Cal)	132	148
Úmidade (%)	65.2	60.6
Proteína (%)	1.0	0.8
Gordura (%)	0.4	0.3
Carboidratos totais (%)	32.8	37.4
Fibra (%)	1.0	1.0
Cinzas (%)	0.6	0.9
Cálcio (mg)	40.0	36.0
Fósforo (mg)	34.0	48.0
Ferro (mg)	1.4	1.1
Vitamina A (mg)	T2	5.0
Tiamina (mg)	0.05	0.06
Riboflavina (mg)	0.04	0.04
Niacina (mg)	0.60	0.70
Ácido ascórbico (mg)	19.0	40.0
Porção não comestível (%)	32.0	32.0

O amido é o principal carboidrato presente na mandioca, este é um polímero natural, semicristalino, renovável e biodegradável produzido por muitas plantas como fonte de energia. É o segundo material biomássico mais abundante na natureza, precedido apenas pela biomassa lignocelulósica. Também pode ser encontrado em grandes quantidades em diferentes resíduos gerados pelas empresas processadoras de alimentos (Corre, Le, Bras e Dufresne, 2010).

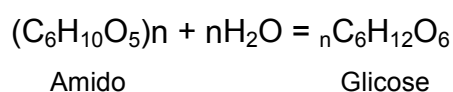
O amido é composto de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. Além disso, contém pequenas quantidades de outros componentes não pertencentes aos hidratos de carbono, tais como lipídeos, fosfatos e proteínas. Nos grânulos de amido, a amilose e a amilopectina estão densamente compactadas em um estado semicristalino com ligações inter e intramoleculares (Chen *et al.*, 2011; Martin e Smith, 1995).

A amilose apresenta predominantemente cadeia linear e é composta por até 3000 moléculas de glicose interconectadas por

ligações glicosídicas alfa-1,4 (Beninca *et al.*, 2013). Por outro lado, a amilopectina é um polímero ramificado que consiste de cadeias relativamente curtas de alfa-D-(1,4) glicopiranosose unidas por ligações alfa-D-(1,6) glicosídicas a cada 22 unidades de glicose, aproximadamente (Corre, Le, Bras e Dufresne, 2010). As proporções de amilose e amilopectina nos grânulos de amido geralmente correspondem à aproximadamente 30 e 70%, respectivamente, mas podem variar dependendo da fonte botânica (Martin e Smith, 1995).

### ***Hidrólise do amido***

A hidrólise do amido consiste na clivagem desse polímero em fragmentos de cadeia curta, como dextrina e maltose, ou monômeros de glicose. Essa fragmentação implica na ruptura de ligações glicosídicas e a adição de uma molécula de água por cada ligação rompida (Tasic´ e Veljkovic, 2011).



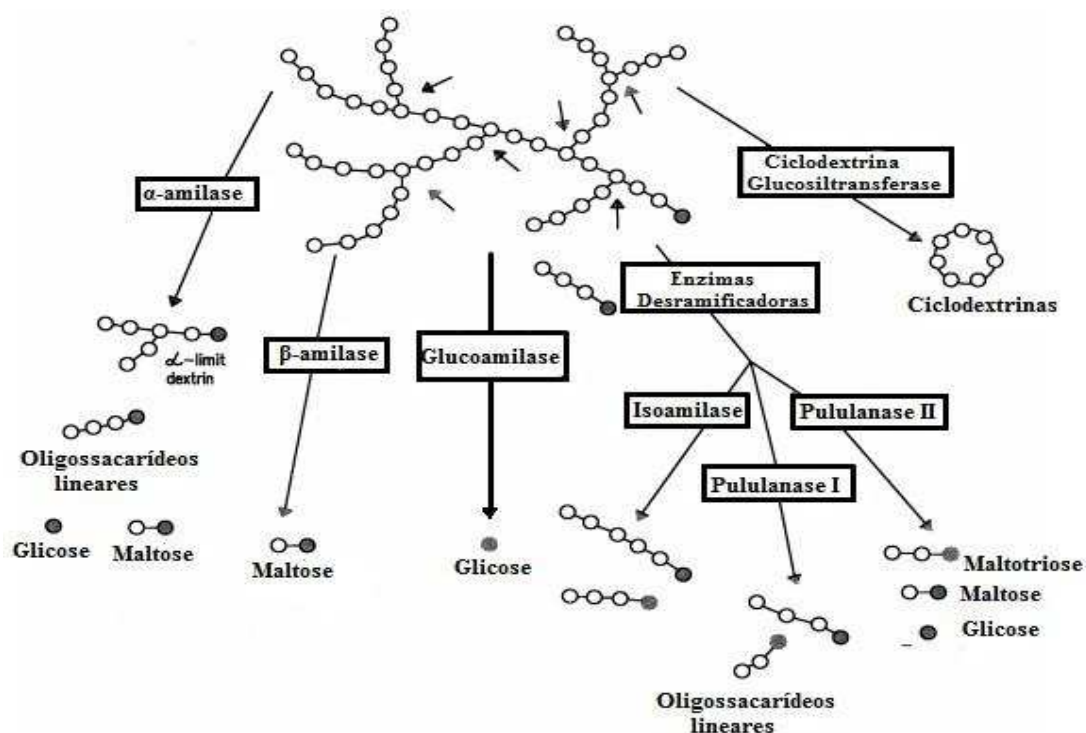
A hidrólise do amido pode ocorrer por via enzimática ou ácida. A hidrólise catalisada por ácidos é pouco utilizada, devido principalmente à necessidade de neutralização do hidrolisado antes da fermentação e de um maior investimento em equipamentos para a manutenção das condições ácidas. Assim, o método enzimático tem recebido maior atenção nas últimas décadas (Tasic´ e Veljkovic, 2011).

### ***Enzimas responsáveis pela hidrólise do amido***

As enzimas responsáveis pela hidrólise do amido são chamadas de enzimas amilolíticas, ou simplesmente de amilases, e são de grande importância na área da biotecnologia devido às aplicações em alimentos, fermentados, têxteis e na indústria de papel.

As amilases podem ser derivadas de plantas, animais e microrganismos e são classificadas em quatro principais grupos:

endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e ciclodextrinas glicosiltransferases (Gupta *et al.*, 2003). A figura 1 mostra a atuação dos diferentes tipos de enzimas amilolíticas e os seus produtos, derivados a partir da clivagem das moléculas de amido.



**Figura 1.** Atuação das enzimas amilolíticas. (•) Resíduo redutor de  $\alpha$ -D-glicose; (◦) resíduo não-redutor de  $\alpha$ -D-glicose. Fonte: (Horváthová, Janeček e Šturdík, 2000).

**Endoamilases:** Catalisam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula de amido, permitindo a formação de oligossacarídeos tanto lineares como ramificados de vários comprimentos de cadeia (Gupta *et al.*, 2003). A  $\alpha$ -amilase é a principal representante desse grupo e é capaz de catalisar as ligações glicosídicas internas  $\alpha$ -1,4 e gerar produtos de baixo peso molecular como glicose, maltotriose e ciclodextrinas (Souza e Magalhães, 2010).

**Exoamilases:** São enzimas que atuam a partir da extremidade não redutora, clivando as ligações  $\alpha$ -1, 4-glucano produzindo unidades sucessivas de maltose e  $\beta$ -límite-dextrina. No entanto, algumas exoamilases também são capazes de clivar ligações  $\alpha$ -1,6 como as glicoamilases (Gupta *et al.*, 2003; Horváthová, Janeček e Šturdík, 2000).

Enzimas desramificadoras: Nesse grupo podem ser encontradas as isoamilases e as pulalanases, ambas capazes de clivar especificamente ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina. (Hii *et al.*, 2012; Horváthová, Janeček e Šturdík, 2000).

Ciclodextrinas Glicosiltransferases (CGTases): Atuam sobre o amido produzindo ciclodextrinas, que são oligômeros cíclicos de 6 ou mais unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. As CGTases também podem catalisar a degradação das ciclodextrinas, as quais não possuem extremidades não redutoras, inibindo a ação das enzimas com exoatividade (Arellano-Carbajal, F; Olmos-Soto, 1999).

Por serem específicas para clivar cada ligação glicosídica dentro do amido, estas enzimas atuam em diferentes etapas dentro da própria hidrólise.

### **Liquefação**

A liquefação do amido consiste na hidrólise parcial da moléculas sob elevadas temperaturas, entre 90 e 110 °C, pH 6,0 – 6,5 e é catalisada por enzimas alfa-amilases termoestáveis, capazes de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,4- glicosídicas internas no amido, liberando oligômeros de dextrose (Derez *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Lucyna, Zielonka e Jaros, 2013).

A liquefação do amido envolve uma etapa prévia de gelatinização em água, na qual há quebra das associações intermoleculares de amilose e amilopectina em estado sólido (grânulos). Isso é feito mediante um tratamento hidrotérmico que envolve a absorção de água aquecida pelos grânulos, provocando o seu inchamento, e conseqüente ruptura com a liberação de amilose e amilopectina solúveis (Borglum, 1980; Charles *et al.*, 2014; Tako *et al.*, 2014; Xu, Yan e Feng, 2016).

### **Sacarificação**

Após a etapa de liquefação ocorre a sacarificação do amido, a qual é realizada em temperaturas relativamente brandas (60 - 70 °C) e preferencialmente na presença de enzimas como as glucoamilases,

capazes de hidrolisar as ligações  $\alpha$ - (1-4) e  $\alpha$ - (1-6), permitindo a obtenção de maltose ou xaropes de D-glicose (Ajibola, Edema e Oyewole, 2012).

### **Fermentação**

A fermentação baseia-se na conversão de fontes de carbono, especialmente açúcares, do substrato por microrganismos. Na fermentação alcoólica essas moléculas são transformadas principalmente em etanol e gás carbônico, gerando duas moléculas de ATP ao longo do processo (Nelson e Cox, 2008).

Processos fermentativos podem ser realizados em batelada, batelada com alimentação ou de forma contínua. Na fermentação em batelada, a matéria-prima já hidrolisada é adicionada ao reator, juntamente com os microrganismos, nutrientes e outros ingredientes. Na batelada alimentada, um ou mais ingredientes são acrescentados no decorrer da fermentação (Zabed *et al.*, 2014). Na fermentação contínua o reator é continuamente alimentado por uma ou mais correntes de entrada, contendo os nutrientes necessários, enquanto as células, produtos e resíduos são removidos continuamente (Lim e Shin, 2013).

A seleção do modo mais adequado de fermentação depende, principalmente, da cinética dos microrganismos utilizados e da natureza da matéria-prima (Zabed *et al.*, 2014). Os microrganismos usados na indústria para a produção de etanol são selecionados de forma que apresentem características tais como: habilidade de fermentar rapidamente um amplo espectro de carboidratos, capacidade de produzir e tolerar altas concentrações de etanol, produção de poucos subprodutos e tolerância a variações na temperatura e a baixos valores de pH (Binod, Sindhu e Pandey, 2013; Dien, Cotta e Jeffries, 2003).

### **Leveduras usadas na produção de bioetanol a partir do amido**

As leveduras são ubíquas ao meio ambiente, mas geralmente são isoladas de fontes ricas em açúcares, como exsudados de plantas, e também de fontes ricas em amido como tubérculos de mandioca, batata

doce, iname, dentre outras (Tikka *et al.*, 2013). Elas são o grupo microbiano mais importante na produção industrial de etanol, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a espécie mais utilizada (Hajar *et al.*, 2017). Assim há uma crescente demanda por leveduras com características que permitam maior eficiência desse processo, especialmente quando são utilizados substratos com estruturas complexas, como é o caso do amido e da biomassa lignocelulósica.

O amido é um substrato renovável e de alta disponibilidade, é facilmente hidrolisado em açúcares fermentescíveis usando enzimas amilolíticas produzidas por microrganismos, como as leveduras. Alguns desses microrganismos são capazes de se multiplicar em presença de amido e fermentá-lo, como por exemplo *Saccharomyces diastaticus* (Banerjee, Debnath e Majumdar, 1988; Verma *et al.*, 2000), *Endomycopsis capsularis* (Verma *et al.*, 2000), *Cândida albicans* (Aruna *et al.*, 2015) e *Scheffersomyces shehatae* (Tanimura *et al.*, 2015). O uso deste tipo de levedura contribuiria na redução dos custos de operação do processo de produção de etanol. A necessidade de adição de enzimas exógenas onera o processo, tornando o bioetanol obtido de fontes como o amido ou biomassa lignocelulósica um combustível menos viável economicamente em relação ao bioetanol produzido a partir da cana-de-açúcar (Tanimura *et al.*, 2015).

### **Destilação**

A destilação permite a separação de materiais por meio de diferenças na volatilidade, devido à possibilidade de vaporizar uma substância a partir de uma solução em ebulição. Assim, no final da fermentação, é obtida uma solução composta por etanol e água, a qual é transportada para o sistema de destilação para separação parcial da água presente e recuperação do etanol produzido (Ravagnani *et al.*, 2009).

Ao final da fermentação obtém-se uma solução de até 12% (m/v) de etanol, sendo necessária a sua concentração pelo processo de destilação (Kiss e Suszwalak, 2012), a qual permite que a solução atinja

concentrações similares à composição azeotrópica (96% m/v). Porém, para que o etanol possa ser misturado com a gasolina e utilizado como combustível, o teor de água deve ser ainda menor, pois a gasolina e a água são substâncias imiscíveis. Assim, é necessária uma etapa adicional, a desidratação (Palacios-Bereche *et al.*, 2014).

### ***Desidratação***

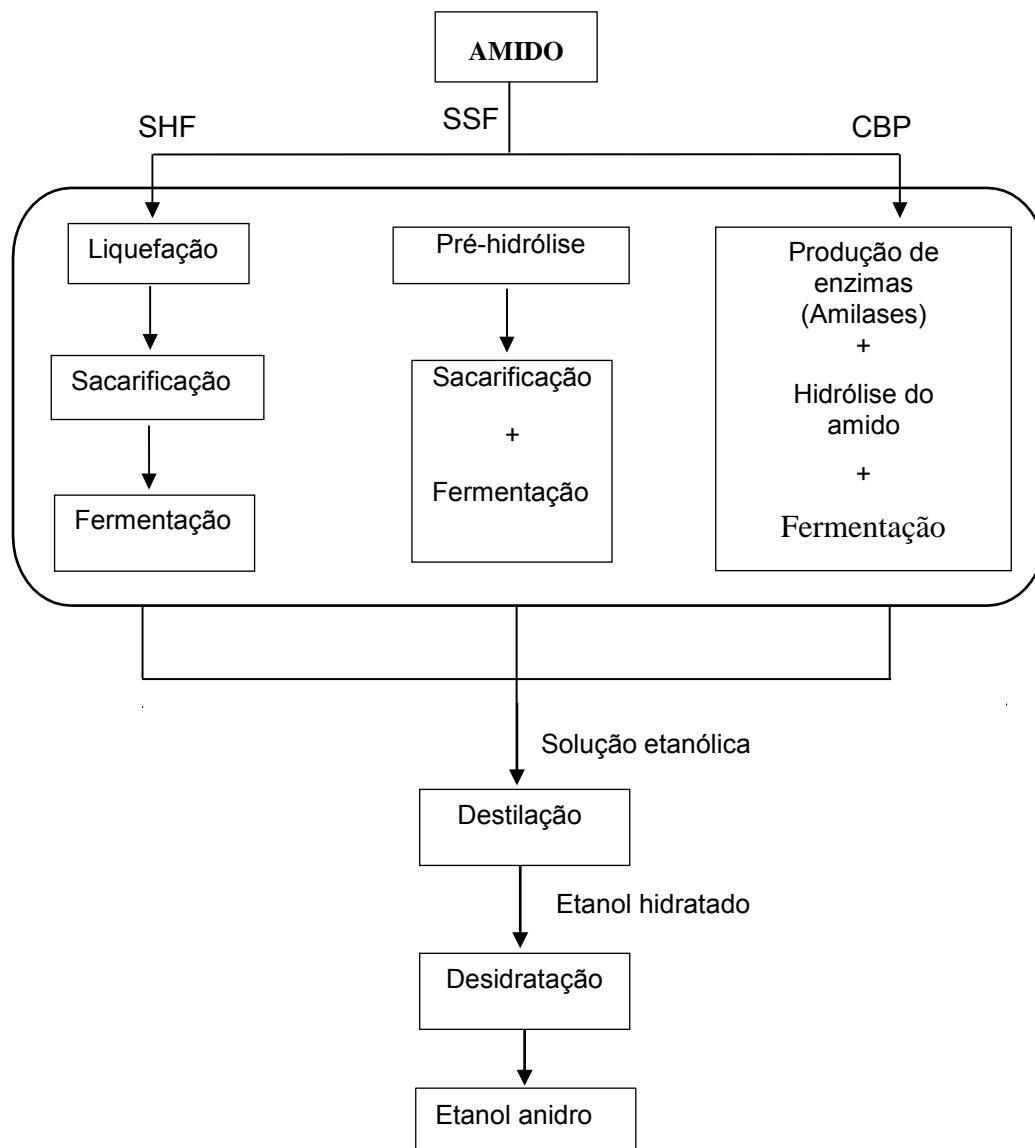
É a última etapa no processo de produção de etanol e permite a remoção de água remanescente para obtenção do etanol anidro (>99,6% (v/v)) (Karimi, Ghobadian e Omidkhan, 2016), representando altos custos no processo de produção de etanol.

A desidratação pode ser feita de modo isotérmico usando um fluido de aquecimento ou em modo adiabático usando vapor diluído (Maia *et al.*, 2016).

### **3.3. FORMAS DE CONDUÇÃO DE PROCESSOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE AMIDO**

Diferentes métodos têm sido aplicados para o desenvolvimento de cada uma das etapas anteriormente descritas na produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas. Os dois processos mais utilizados são: sacarificação e fermentação separadas (SHF), a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). O bioprocessos consolidado (CBP) corresponde a outra técnica, ainda está em processo de pesquisa.

A figura 2 mostra um esquema das etapas envolvidas na produção de etanol a partir de amido em diferentes modalidades de processo: SHF, SSF e CBP.



**Figura 2:** Etapas envolvidas na produção de etanol a partir de amido. Aqui, são apresentadas três possíveis rotas para a produção de bioetanol a partir de amido: Hidrólise e fermentação separadas (SHF), Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), Bioprocesso consolidado (CBP) (Ali *et al.*, 2016).

### ***Hidrólise e fermentação separadas (SHF)***

Envolve a realização das etapas de hidrólise e fermentação de forma individual, na qual as reações ocorrem em unidades separadas. A principal vantagem deste método consiste na eficiência de cada uma das etapas, já que ao serem realizadas de forma individual podem ser realizadas sob condições ótimas. Isso porque para cada agente de

catálise, as temperaturas ótimas de atuação das enzimas hidrolíticas são diferentes daquelas usadas pelos microrganismos capazes de fermentar os açúcares liberados (Axelsson, 2011; Olofsson, Bertilsson e Lidén, 2008). As enzimas responsáveis pela liquefação, por exemplo, hidrolisam o amido sob temperaturas de 90 a 110 °C, enquanto as atuantes na sacarificação possuem atividade máxima entre os 60 e 75 °C (Ajibola, Edema e Oyewole, 2012). Entretanto, a fermentação é realizada normalmente entre 28 a 30 °C pelas leveduras.

### ***Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)***

É uma alternativa ao método SHF e envolve a realização da hidrólise e da fermentação em uma mesma etapa, apresentando como principal vantagem o consumo imediato pelo microrganismo fermentador da glicose liberada durante a hidrólise, evitando a inibição das enzimas atuantes (Axelsson, 2011; CASTAÑO *et al.*, 2011). Outra vantagem da implementação desse método é a redução nos custos, uma vez que a reação acontece em um único reator. Porém, o SSF tem a desvantagem de estabelecer condições médias nos parâmetros do processo (temperatura, pH, tempo) que não seriam as ideais para nenhum dos agentes atuantes (enzimas e leveduras) (Olofsson, Bertilsson e Lidén, 2008).

A desvantagem dos processos de SHF e SSF consistem, entre outros, nos custos elevados de produção devido à necessidade de adição de enzimas endógenas ao processo. Devido a isso tem sido desenvolvida a técnica de condução de processo via Bioprocesso consolidado:

### ***Bioprocesso consolidado (CBP)***

O bioprocesso consolidado (CBP) combina de forma simultânea a produção de enzimas, hidrólise do substrato e a fermentação do etanol em um único biorreator (Hasunuma e Kondo, 2012; Li e Zhu, 2011; Tanimura *et al.*, 2015). O CBP tem sido reconhecido como um potencial avanço para a produção de bioetanol a baixo custo, mas a sua viabilidade depende em grande parte da capacidade do microrganismo utilizado de

produzir enzimas amilolíticas em quantidade suficiente e em fermentar os açúcares com alta eficiência de conversão (Zerva *et al.*, 2014). Fungos filamentosos, bactérias e leveduras têm sido utilizados para produção direta de etanol a partir de substratos complexos como o amido e a biomassa lignocelulósica (Ali *et al.*, 2016).

A busca por microrganismos com capacidade de fermentar matrizes complexas renováveis é essencial, para fazer do etanol um combustível com maior viabilidade econômica e, portanto, mais acessível.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Meios de cultura***

O meio de enriquecimento YW (0,3% m/v de extrato de levedura, 0,3% m/v de extrato de malte, 0,5% m/v de peptona e 1% m/v de glicose) foi utilizado para estimular a multiplicação das leveduras presentes nas matérias-primas amiláceas escolhidas como fontes de isolamento. O meio YEP (0,5% m/v de extrato de levedura e 1% m/v peptona) foi utilizado como base para os demais experimentos, adicionado de amido solúvel (YEPS), glicose (YEPG) e/ou ágar.

### **4.1. Isolamento e manutenção das leveduras**

As fontes amiláceas utilizadas para o isolamento de leveduras foram mandioca industrial, obtida em estado fresco de uma fazenda no Estado do Espírito Santo, além de inhame, milho e batata inglesa, obtidos em estado fresco no comércio local da cidade de Viçosa - MG. De cada fonte foram maceradas 25 g usando almofariz e pestilo. Em seguida, cada macerado foi adicionado de 75 mL de meio YW e posteriormente, incubado a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para enriquecimento. A cada 24 h durante 3 dias diluições foram plaqueadas em meio YEPS-ágar e as placas foram incubadas a  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 h. Finalizada a incubação, coletou-se 10 colônias de leveduras por placa com características morfológicas diferentes por placa. As colônias foram estriadas três vezes consecutivas para obtenção de culturas puras. (Moreira, Huising e Bignell, 2010).

Além destas, outras 19 leveduras isoladas a partir de fontes apícolas (Silva, 2016) e armazenadas no banco de leveduras do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram utilizadas para os testes.

Todas as leveduras foram ativadas em meio YEPG e concentradas por centrifugação. Os estoques foram congelados a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para ativação

de rotina.

Antes de cada teste, as leveduras foram ativadas em meio, YEPG 2% m/v, a  $28 \pm 1$  °C por 24 h e inoculadas na concentração de  $10^6$  células viáveis/mL no meio a ser testado. A viabilidade das células foi determinada em câmara de Neubauer utilizando corante azul de metileno.

#### **4.2. Caracterização morfológica**

As colônias foram avaliadas com relação às características macroscópicas em quatro aspectos: (I) forma, podendo ser circular ou irregular; (II) tamanho, com diâmetros pequeno (2 mm), médio (2-5 mm) ou grande (5 mm ou maior); (III) superfície, podendo ser com estrias concêntricas, estrias radiais, vales radiais ou granuladas; e (IV) bordas, sendo essas lisas, franjeadas, onduladas, pregueadas, crenadas, lobuladas ou filamentosas conforme ao descrito por Moreira, Huising e Bignell, 2010.

Microscopicamente, os isolados foram caracterizados em relação à sua forma como elipsoide, globoso, cilíndrico, apiculado, triangular, taloide, globular com hifas, globular com pseudo-hifas e formas variadas com ascósporos (Moreira, Huising e Bignell, 2010).

#### **4.3. Avaliação da produção de etanol**

Cada um dos isolados foi avaliado em relação à sua capacidade de produzir etanol a partir de amido. Aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células viáveis de leveduras foram inoculadas em 25 mL de meio YEPS Líquido (3 % m/v de amido), e incubadas a  $28 \pm 1$  °C durante 10 dias. Alíquotas de 2 mL dessa solução foram recolhidas, após 5 e 10 dias de incubação, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação da produção de etanol por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Os sobrenadantes foram filtrados em filtro Gelman poro de 0,22 µm (ANALITICA®) e diluídos 5 vezes. Posteriormente, o diluído foi

injetado no cromatógrafo CTO-20A, (Shimadzu, Japan) acoplado a um detetor de índice de refração e coluna Aminex® HPX- 87H a temperatura de 60 °C, com fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM (VETEC®). Padrões dos compostos de interesse (glicose - SYNTH®, etanol - VETEC®, maltose - VETEC®, glicerol - SYNTH®) foram submetidos ao mesmo processo para correlação do tempo de retenção e concentrações (SCMIDELL et al., 2001). As concentrações utilizadas para cada padrão foram de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 mM.

### **Determinação dos coeficientes de rendimento**

Os coeficientes de rendimento ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $Q_p$ ), e eficiência ( $\eta$ ) foram determinados segundo as equações a seguir:

$$Y_{P/S \text{ real}} = \frac{P_f - P_o}{S_o - S_f} \quad (\text{equação 1})$$

na qual  $P_f$  e  $P_o$  representam as massas (g) final e inicial de etanol, respetivamente;  $S_o - S_f$  representam as massas (g) de amido inicial e final, respetivamente. Neste caso, assumiu-se a conversão completa do amido à glicose na proporção de 100 g de amido:111 g de glicose, além do consume de toda a glicose presente no meio.

$$Q_p = \frac{P_{\text{máx}}}{t_f} \quad (\text{equação 2})$$

na qual  $P_{\text{máx}}$  indica a produção máxima de etanol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e  $t_f$  indica o tempo respectivo de fermentação (h).

$$\eta_{\text{etanol}} = \frac{Y_{P/S \text{ real}}}{Y_{P/S \text{ teórico}}} * 100 \quad (\text{equação 3})$$

na qual  $Y_{p/s \text{ real}}$  é o coeficiente de rendimento calculado por meio da equação 1 e  $Y_{p/s \text{ teórico}}$  é o coeficiente de rendimento teórico de conversão de glicose a etanol, de valor igual a  $0,51 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Okamoto *et al.*, 2014).

#### 4.4. Identificação dos isolados

Os isolados selecionados foram identificados por meio da análise das sequências de DNA da região D1/D2 que codificam parte da subunidade maior do gene do rRNA (Meyer, Rosa e Lachance, 1998).

A extração do DNA foi realizada pelo método descrito por Lachance (1990) com algumas modificações. Soluções contendo os isolados foram incubadas por 48 h em meio YEPG 2% a 28 °C, e o material foi centrifugado a 2.500 x g por 10 min. O material decantado foi então incubado em tampão de lise [50 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0; 10 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 20 mL de NaCl 5 M; 50 mL de SDS a 10% (m/v)] a 65 °C durante 30 min. Após este período foram adicionados 100 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isopropílico na proporção 25:24:1. Em seguida, cada amostra foi agitada por 3 min e submetida a centrifugação a 6.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 100 µL de etanol 95% v/v gelado e 20 µL de solução de acetato de sódio 3 mol·L<sup>-1</sup>. Cada amostra foi homogeneizada por inversão e novamente submetida à centrifugação a 6.000 xg por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspendido em 100 µL de solução tampão TE pH 8,0 (10 mL de Tris- HCL 1 M, pH 8,0; 2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) (Rosa *et al.*, 2003). O DNA genômico total foi quantificado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

Finalizada a extração do material genético cada uma das amostras foi enviada para a empresa MacroGen<sup>®</sup> Inc. (Coréia do Sul) para o sequenciamento da região D1-D2 com uso dos iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Meyer, Rosa e Lachance, 1998). As sequências foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank.

#### **4.5. Efeito do etanol sobre o crescimento dos isolados.**

Cada um dos três isolados foram inoculados em uma concentração de  $2,0 \times 10^6$  células viáveis. $\text{mL}^{-1}$  em meio YEPG líquido acrescido de diferentes concentrações de etanol (0; 50; 70; 100; 120 e 150  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e incubados a  $28 \pm 1$  °C, durante 24 h. A cada 3 h foram recolhidas alíquotas para determinação da densidade ótica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) da solução em espectrofotômetro. As velocidades específicas de crescimento dos isolados foram calculadas em função das concentrações de etanol.

Os resultados de inibição foram representados como a razão de inibição do crescimento: (velocidade específica de crescimento do isolado no meio contendo o inibidor/ velocidade específica de crescimento na ausência do inibidor) x 100.

O comparativo foi realizado mediante esquema factorial, no qual o fator 1 foi determinado pelo tipo da levedura e o fator 2 pela variação das concentrações de etanol no meio, com três repetições cada, totalizando 54 unidades experimentais. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre médias finais de inibição do crescimento frente às diferentes concentrações de etanol, usando o programa ASSISTAT 7.7 (distribuído gratuitamente pela Universidade Federal de Campina Grande, Brasil).

A linhagem que apresentou maior produtividade e estabilidade frente ao efeito do etanol foi escolhida para avaliação do efeito da concentração do substrato e da modalidade de condução do processo fermentativo sobre a produção de etanol.

#### **4.6. Avaliação da concentração de substrato sobre a produção de etanol**

A levedura selecionada foi inoculada em 25 mL de meio YEP com diferentes concentrações de amido (5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50;

55 e 60 g·L<sup>-1</sup>) em frascos Erlenmeyer de 125 mL, os quais foram incubados a 28 ± 1 °C, durante 5 dias. A cada 24 h alíquotas de 2 mL foram recolhidas para análises de produção de etanol, conforme ítem 4.3.

#### **4.7. Avaliação da modalidade do processo fermentativo sobre a produção de etanol**

Para a seleção da modalidade de processo fermentativo foram realizados de forma paralela tratamentos de sacarificação e fermentação separadas (SHF), de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e bioprocesso consolidado (CBP), com três repetições. Ao final de cada processo foi determinada a concentração de amido residual presente no meio e os coeficientes de fermentação, conforme descrito a seguir.

##### ***Sacarificação e fermentação separadas (SHF)***

Uma suspensão com 60 g·L<sup>-1</sup> de amido foi submetida a aquecimento com a finalidade de incentivar a quebra dos grânulos. Durante 45 min, a suspensão foi mantida a 80 °C e homogeneizada com um bastão de vidro a cada 10 min. Passado o tempo, foi acrescentada a enzima StarMax 300 (Prozyn) em uma dosagem de 0,2% m/v sobre a quantidade em base seca de amido (recomendação da empresa), e por mais 45 min a solução foi mantida à mesma temperatura.

Finalizada a hidrólise do amido, a suspensão foi resfriada até 30 °C e inoculada uma concentração de leveduras de 2,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> para iniciar a produção de etanol durante 96 h. A cada 12 h foram recolhidas alíquotas de 2 mL para determinação da concentração de etanol via HPLC.

##### ***Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)***

Uma suspensão de 60 g·L<sup>-1</sup> de amido foi submetida a aquecimento (80 °C) por 45 min, seguido de resfriamento até 30 °C. Uma vez atingida essa temperatura, foi acrescentada 0,2% m/v da enzima StarMax 300 (Prozyn), e após 15 min a levedura foi inoculada. Esse procedimento visa a liberação prévia de uma quantidade de glicose que permita a adaptação da levedura ao meio. A produção de etanol foi avaliada a cada 12 h,

durante 96 h.

### ***Bioprocesso consolidado (CBP)***

A fim de avaliar a capacidade das células para fermentar o amido de forma direta até etanol, a levedura foi inoculada em uma concentração de  $2,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> em uma suspensão de amido 6% m/v, e incubada a 30 °C. Levando em consideração que a levedura precisa de um tempo maior de adaptação em ausência de enzimas amilolíticas puras, o tempo de incubação foi estendido a 10 dias com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade fermentativa nessa modalidade de processo. A produção de etanol foi avaliada a cada 12 h. Os coeficientes de rendimento obtidos pela levedura em cada modalidade foram comparados no tempo de incubação de 96 h.

### **Determinação da concentração de amido residual no meio**

Para determinação do amido residual foi utilizado o kit GOPOD® (Megazyme), segundo metodologia recomendada pelo fabricante. Para isso, 2 mL da solução foram diluídas 20X para o tratamento CBP e 5X para os tratamentos SHF e SSF. Um total de 2 mL dessas amostras foram acrescidos de 8 mL de etanol 95% v/v e incubados por 30 min, com o objetivo de solubilizar os açúcares simples remanescentes. As soluções foram centrifugadas a 1800 x g por 10 min e o passo foi repetido para garantir a retirada completa dos açúcares do meio. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de água. O volume da solução foi ajustado até 3,9 mL com tampão acetato 100 mM, pH 5,0 e, em seguida, foi adicionado 0,1 mL da enzima amiloglicosidase (AMG) (diluída 50X em tampão acetato). A solução foi incubada em banho-maria a 50 °C durante 30 min. Passado o tempo de incubação, 0,1 mL da solução foi transferido a um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 3 mL do reagente GOPOD e o tubo foi incubado a 50 °C por 20 min. Uma solução padrão de glicose (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi utilizada como controle desta reação. Finalizada a incubação a absorbância da solução foi lida a 510 nm e a quantidade de amido foi calculada utilizando

a equação 4:

$$Amido = A \times F \times \frac{100}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times 2 \times D \quad (\text{equação 4})$$

na qual A é a absorbância da amostra, F é o fator de conversão e D é o fator de diluição da mesma.

### ***Determinação dos coeficientes de rendimento***

Finalizada a fermentação, os coeficientes de rendimento ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $Q_p$ ), e eficiência ( $\eta$ ) foram determinados em cada tratamento usando as equações 1 a 3, mas considerando a conversão real do amido à glicose, o que foi calculado por meio da diferença entre a massa de amido adicionada e a massa de amido residual encontrada.

As médias referentes aos coeficientes de rendimento foram comparadas a fim de determinar se os tratamentos testados apresentaram diferenças significativas. Para isso, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Isolamento e caracterização morfológica de leveduras

Com o isolamento realizado a partir das fontes amiláceas após 24 h de fermentação se obteve leveduras com uma variabilidade morfológica maior do que a correspondente às 72 h. Após 48 h de fermentação o número de colônias aumentou, deixando em evidência a multiplicação das leveduras predominantes de acordo com as condições de isolamento utilizadas (tabela 1)

**Tabela 1.** Contagem de leveduras nas fontes amiláceas após incubação em meio de enriquecimento.

Fonte	Tempo de fermentação (h)		
	24	48	72
	*Contagem (log UFC·mL <sup>-1</sup> )		
Mandioca industrial	4,32	5,40	5,46
Inhame	4,36	5,43	5,51
Milho	4,49	5,58	5,60
Batata inglesa	4,39	5,03	5,08

\*Média de três repetições.

Oguntoyinbo (2008) e Schwan e colaboradores (2007) realizaram o isolamento de leveduras em fermentados de mandioca em diferentes tempos e, similarmente a este trabalho, encontraram menores contagens no início da fermentação, com aumento progressivo após 24 e 48 h. Da mesma forma, leveduras mais adaptadas às condições de cultivo se tornaram mais populosas, ao mesmo tempo impossibilitando o desenvolvimento de outras menos adaptadas e, portanto, diminuindo a variabilidade morfológica.

Dentre as colônias obtidas, 62 foram capazes de se multiplicar nas condições de isolamento utilizadas e foram posteriormente caracterizadas quanto à sua morfologia e quanto à capacidade em produzir etanol. A codificação utilizada para identificação dos isolados selecionados é apresentada na tabela 2.

**Tabela 2.** Número de isolados com seus respectivos códigos por fonte.

Isolados	Nº de isolados	Código
Mandioca industrial	20	MB0, MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6, MB9, MB10, MB11, MA0, MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6, MA7, MA8, MA9
Inhame	14	N21, N22, N23, N24, N25, N26, N27, N28, N29, N41, N42, N43, NA21, NA22
Milho	17	M21, M22, M23, M26, M27, M28, M29, M41, M42, M43, M44, M45, M46, MA01, MA21, MA22, MA25
Batata inglesa	11	BB0, BB1, BB2, BB3, BB4, BB5, BB6, BB7, BB8, BB9, BB10

As colônias formadas pelos isolados eram predominantemente de forma circular (71%) com um tamanho médio entre 2 a 5 mm (54%), e superfície granulosa (97%); com bordas lisa (37%), ondulada (11%), crenada (34%) ou filamentosa (14%). Durante a observação microscópica foi observada uma predominância da forma de reprodução assexuada por brotamento (71%) com formato globoso (47%) e cilíndrico (23%). O isolado MA6, proveniente da mandioca industrial, gerou colônias com superfícies de estrias concêntricas, lisa e côncava e reprodução assexuada por fissão. A diversidade obtida a partir das diferentes matérias-primas utilizadas mostra o seu potencial como fontes de leveduras, as quais poderiam ser verificadas para os mais distintos processos.

Caraterísticas morfológicas similares foram relatadas por Guimarães (2016), em estudo com isolados de sorgo sacarino, as quais foram atribuídas aos gêneros *Cândida*, *Meyerozyma* e *Pichia*, conhecidos também por agruparem espécies capazes de usar o amido como substrato para ser fermentado.

## 5.2. Avaliação da produção de etanol pelos isolados

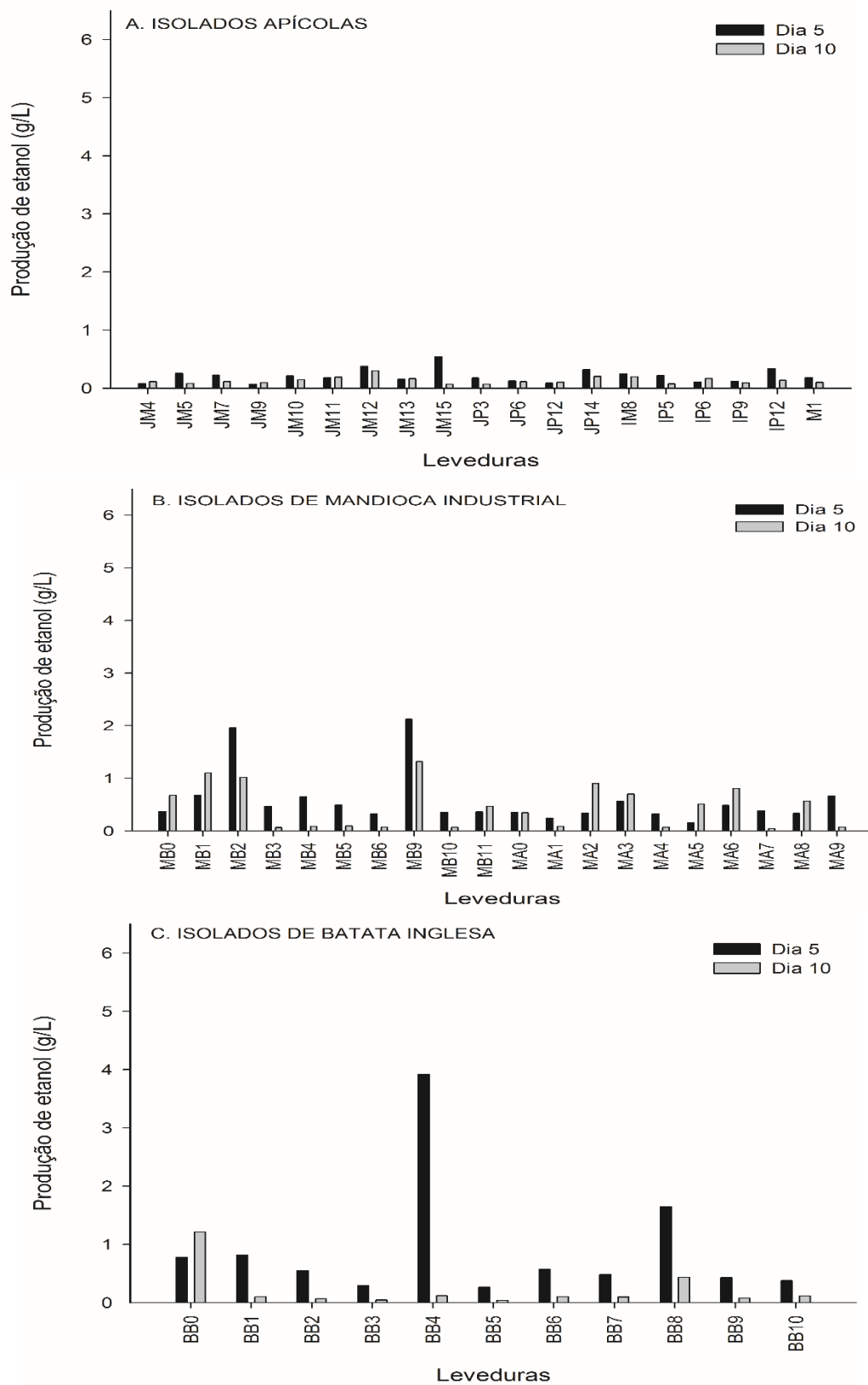
Dentre os 62 isolados obtidos das fontes amiláceas e os 19 de fontes apícolas, o de código N43, obtido a partir de inhame, apresentou a maior conversão de amido em etanol após 10 dias de fermentação, com uma eficiência de conversão de 37%. Os isolados BB4 e MB9, isolados de batata inglesa e mandioca industrial, respectivamente, apresentaram menores eficiências, mas foram mais produtivos uma vez que produziram as maiores quantidades de etanol em apenas 5 dias de fermentação (Tabela 3). Menores tempos de fermentação reduzem a incidência de possíveis contaminações e os custos do processo.

**Tabela 3.** Coeficientes de rendimento de etanol ( $Y_{P/S}$ ),  $\eta'$  (eficiência),  $Q_p$  (produtividade) obtidos pelos isolados.

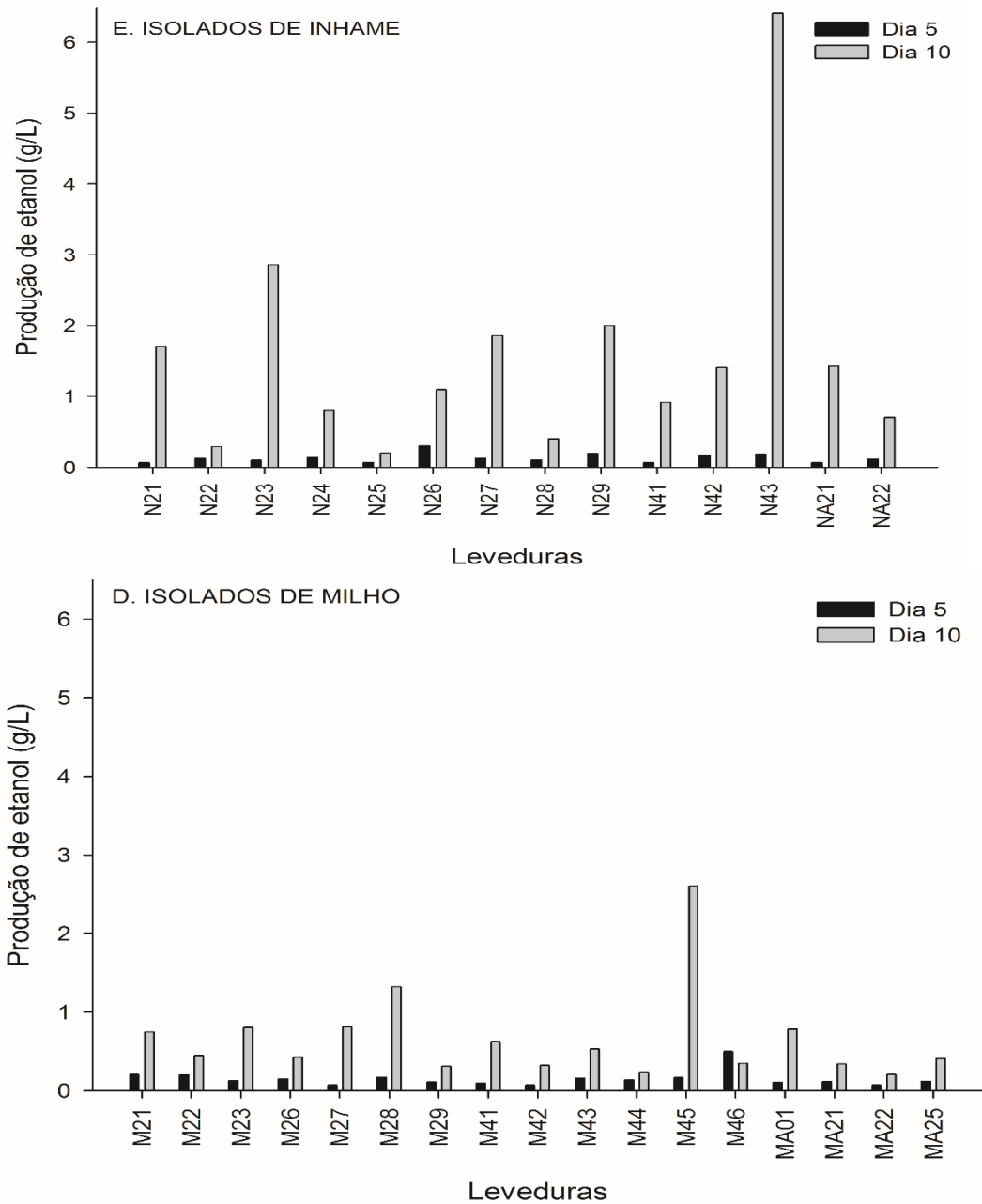
Isolado	Fonte	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	$Y'_{p/s}$ etanol (g.g <sup>-1</sup> )	$\eta'$ etanol (%)	Tempo de fermentação (dias)	$Q_p'$
N43	Inhame	6,42	0,19	37	10	0,642
BB4	Batata inglesa	3,92	0,12	24	5	0,784
MB9	Mandioca industrial	2,13	0,064	13	5	0,426

\*Média de três repetições.

De forma geral, isolados de inhame e milho se mostraram mais eficientes no 10º dia da fermentação. Já os isolados de batata inglesa e mandioca industrial tiveram as maiores concentrações de etanol detectadas em menor tempo (Figura 3), o que pode ser graças à similaridade do substrato (amido de mandioca industrial) em relação às matérias-primas de onde estes últimos foram isolados. O grânulo de amido na forma solúvel apresenta características similares com os grânulos de batata e mandioca nos teores de amilose, enquanto os amidos de milho e inhame possuem teores de amilose mais elevados em seus grânulos (Cereda, 2001).



**Figura 3.** Produção de etanol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a partir de amido solúvel (3% m/v) pelos isolados obtidos de fontes apícolas, de mandioca industrial e batata inglesa.



**Figura 4.** Produção de etanol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a partir de amido solúvel (3% m/v) pelos isolados obtidos de milho e inhame.

As leveduras isoladas de pólen apícola e mel foram as que obtiveram em geral menor eficiência de conversão. O pólen apresenta amido em sua composição, o qual é hidrolisado dentro da colmeia no decorrer do armazenamento feito pelas abelhas. Supõe-se que as modificações que ocorrem nos produtos apícolas dentro da colmeia sejam consequência da ação de leveduras amilolíticas (Ahmed *et al.*,

2013; Modro *et al.*, 2009), dentre as quais se destacam os gêneros *Cândida*, usado na produção de etanol a partir de fermentação direta de amido, e *Cryptococcus (Papiliotrema)*, capaz de produzir biodiesel a partir de amido mediante bioprocesso consolidado (Pereira, Fernandes e Ulhoa, 2016; Tanimura *et al.*, 2014). Entretanto os isolados testados não podem ser considerados como fermentadores diretos de amido, podendo ser consequência das condições de isolamento utilizadas para a obtenção destes, nas quais não foi empregado meio seletivo contendo amido. Além disso, o teor deste substrato nos produtos apícolas como o pólen é baixo em comparação com as matérias-primas amiláceas utilizadas como fontes de isolamento neste estudo (Silva, 2016).

Embora a otimização das condições do processo seja essencial para acessar todo o potencial das leveduras para a produção de etanol, a comparação dos rendimentos obtidos na primeira avaliação de eficiência de fermentação já evidencia o potencial do isolado N43 para produção de etanol a partir de amido. Uma levedura da espécie *Scheffersomyces shehatae*, por exemplo, produziu  $9,78 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol também em 10 dias de fermentação, a partir de meio contendo 10% m/v de amido solúvel (Tanimura *et al.*, 2015) sendo, até onde se tem conhecimento, a levedura com o maior rendimento já obtido via fermentação direta de amido a etanol.

A nível industrial, as produtividades de etanol variam de acordo com a fonte botânica (tabela 3). Enquanto o processo industrial gera cerca de 147 litros de etanol por tonelada de matéria-prima, a N43 foi capaz de produzir o equivalente a  $62,4 \text{ L.ton}^{-1}$ . As leveduras BB4 e MB9 geraram cerca de 38 e  $20 \text{ L.ton}^{-1}$ , respectivamente, porém na metade do tempo produtivo (Tabela 4). Vale ressaltar que nenhum estudo de otimização havia sido até então realizado para a produção de etanol por essas leveduras.

**Tabela 4.** Rendimento em etanol obtido de diferentes matérias-primas utilizadas na indústria.

<b>Matéria-prima</b>	<b>Produção de álcool (L.ton<sup>-1</sup>)</b>
Cana moída	74
Milho	400
Mandioca	174
Beterraba	110
Sorgo	380

Fonte: FAO, 2008

Mandioca industrial (N43)*	62
Mandioca industrial (BB4)*	38
Mandioca industrial (MB9)*	20

\* Considerando meios contendo 3% m/v de amido solúvel e que 1 ton de raízes de mandioca fresca geram 230 kg de amido.

A produtividade é o fator mais importante a ser considerado para escolha do biocatalisador a ser utilizado em um processo fermentativo. Longos tempos de fermentação podem gerar problemas de contaminação, tornando o mosto susceptível à ação de microrganismos contaminantes capazes de reduzir o rendimento fermentativo (Cherubin, 2003). Com base nessas informações, três isolados - N43, BB4 e MB9 - foram selecionados para avaliação da estabilidade da população em meios contendo etanol.

### **5.3. Identificação dos isolados**

A comparação das sequências obtidas da região D1/D2 de cada um dos isolados, com as sequências disponíveis no GenBank usando o programa BLASTn (Basic Locus Alignment Search Tool), permitiu a identificação dos mesmos a nível de espécie (Tabela 5).

**Tabela 5.** Alinhamento das sequências dos isolados via software Blast®.

Isolado	Descrição*	Código*	Ident (%)	E-value
N43	<i>Candida quercitrusa</i> strain JHSb	EF375703.1	100	0.0
BB4	<i>Pichia kudriavzevii</i> isolate JW2-1	KU316741.1	100	0.0
MB9	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> isolate JW11-4	KU316739.1	100	0.0

\*Descrição e códigos das sequências alinhadas com maior identidade e cobertura.

O isolado N43, obtido do inhame e com a maior capacidade de conversão registrada, foi identificado como pertencente à espécie *Cândida quercitrusa*. Organismos desse gênero são reconhecidos como eficientes produtores de etanol, inclusive por meio da modalidade de bioprocessamento consolidado para fermentação de matrizes complexas como amido e xilose (Okamoto *et al.*, 2014). A exemplo, nos estudos realizados por Jeffries (1981) e Oguntoyinbo (2008), a espécie *C. guilliermondii*, às vezes denominada como *C. tropicalis*, foi capaz de converter xilose e maltose até etanol sob condições aeróbicas, mas não sob condições anaeróbicas. O etanol foi produzido em maior velocidade pelas células em presença de meio mínimo enriquecido com xilose do que com glicose (Jeffries, 1981; Oguntoyinbo, 2008).

Em 2012 foi isolada uma nova linhagem de *C. shehatae* ATY839 capaz de produzir etanol a partir de xilose a 37 °C, sendo considerada a linhagem mais termotolerante dentre todas as *C. shehatae* (Tanimura *et al.*, 2012). Mais tarde em um novo estudo foram identificadas espécies de *C. subhashii* apropriadas para converter diretamente o amido em etanol, atingindo produções de até 6 g.L<sup>-1</sup> a partir de 10% m/v de amido (Tanimura *et al.*, 2015), habilidade também determinada para *C. albicans* a partir de 5% m/v de amido (Aruna *et al.*, 2015) e *C. tropicalis* a partir de 9% m/v de amido (Jamai *et al.*, 2007). Tal eficiência foi associada à capacidade dessas espécies de produzir grandes quantidades de glucoamilases e fermentar simultaneamente os açúcares

liberados. A espécie *C. quercitrusa* já tinha sido caracterizada como produtora de arabitol, um poliálcool utilizado como edulcorante na indústria de alimentos (Kordowska-Wiater, 2015), mas até então não havia sido descrito nenhuma cepa dessa espécie capaz de produzir etanol.

As espécies pertencentes ao gênero *Pichia* possuem um grande potencial biotecnológico, como por exemplo, as espécies *P. pastoris* e *P. angusta*, utilizadas na expressão de proteínas recombinantes; e *P. stipitis* e *P. kudriavzevii*, capazes de fermentar xilose para produção de etanol (Caspeta *et al.*, 2012). Leveduras da espécie *P. kudriavzevii*, à qual pertence o isolado de maior produtividade, BB4, podem ser utilizadas na biorremediação dos solos, pois produzem a enzima fitase e hidrolisam o fitato, liberando fósforo (Chan *et al.*, 2012). *P. kudriavzevii* MTCC 5493 é caracterizada como uma levedura oleaginosa, capaz de produzir biodiesel a partir de substratos de baixo custo como o glicerol cru, o que permitiria uma redução nos custos de produção deste combustível (Sankh *et al.*, 2013).

Em 2016, a cepa *P. kudriavzevii* ITV-S42 foi isolada a partir de fermentados de sorgo doce e caracterizada, apresentando osmotolerância (acima de 200 g.L<sup>-1</sup> de glicose), termotolerância (até 40 °C), tolerância a ácido acético e à presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural (Díaz-Nava *et al.*, 2017). Espécies do gênero *Pichia* mostram-se como microrganismos com alto potencial nos diferentes processos biotecnológicos, oferecendo soluções a gargalos encontrados em pesquisa e a nível industrial, como resistência a altas temperaturas, pHs variados, altas concentrações de substratos, dentre outros.

O gênero *Hanseniaspora*, ao qual pertence a levedura MB9, se diferencia a partir da produção e tolerância aos níveis de etanol (MOLINA, 2007). Mesmo não apresentando boa capacidade de produção de etanol durante a fermentação do vinho, elas contribuem com características sensoriais, produzindo compostos aromáticos como ésteres, aldeídos e álcoois, entre outros (Fleet, 1993). Recentemente, foi observado que *H.*

*opuntiae* ou *H. guilliermondii* exercem um papel importante na formação de compostos voláteis, que contribuíram para a aceitação do aroma do vinho, embora tenham um período de fermentação menor que a *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA, 2014).

#### 5.4. Efeito do etanol sobre os isolados

Após determinação da razão da inibição do etanol sobre a velocidade de crescimento das leveduras, constatou-se que as leveduras apresentaram comportamentos diferentes com a variação das concentrações de etanol testadas.

**Tabela 6.** Avaliação da sobrevivência (%) das leveduras nas diferentes concentrações de etanol testadas.

Concentrações de etanol (g·L <sup>-1</sup> )	Leveduras		
	N43	BB4	MB9
0	100 aA	100 aA	100 aA
50	89,5 ± 2,1 aB	83,5 ± 2,1 bB	93,0 ± 1,4 aB
70	67,0 ± 3,0 bC	66,0 ± 0,3 bC	86,5 ± 2,1 aC
100	n.d.	50,5 ± 2,1 bD	68,5 ± 2,1 aD
120	n.d.	n.d.	n.d.
150	n.d.	n.d.	n.d.

\* Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha (letras minúsculas) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna (letras maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

n.d. = não foi observada multiplicação celular em nenhuma das repetições.

Em geral, MB9 possui maior resistência ao etanol em relação aos demais, enquanto que N43 apresentou menor resistência ao etanol, sendo a concentração de 100 g·L<sup>-1</sup> (12,7 °GL) suficiente para causar a completa inibição do seu crescimento. Os isolados BB4 e MB9 apresentaram comportamento similar, com inibição completa observada em valores de 120 g·L<sup>-1</sup> (15,2 °GL) e 150 g·L<sup>-1</sup> (19,1 °GL).

O etanol é um inibidor natural da multiplicação de microrganismos pois aumenta a fluidez da membrana plasmática, destruindo sua integridade, reduzindo a disponibilidade de água, o que induz a desnaturação e inibição de enzimas glicolíticas (Silva, Da, Batistote e Cereda, 2013). As leveduras são capazes de responder a esse efeito, o que envolve vários aspectos da sinalização celular, transdução de sinal, controle transcricional e pós-traducional, reparo das proteínas desnaturadas, alteração na composição da membrana, como aumento n número de moléculas de ácidos graxos insaturados e ergosterol, necessitando de um tempo de adaptação para responder ao estresse proporcionado pelo etanol (Ding *et al.*, 2009). Durante o processo fermentativo de produção de etanol, o aumento da concentração desse metabólito é gradativo no meio, podendo-se inferir que os isolados em estudo podem ser capazes de se desenvolver em soluções ainda mais concentradas desse composto.

Considerando a elevada produtividade e estabilidade a meio contendo etanol, a levedura BB4 foi selecionada para a avaliação das condições de processo visando maiores rendimentos em etanol.

### **5.5. Efeito da concentração de amido sobre a produção de etanol**

A levedura BB4 foi capaz de fermentar diretamente o mosto de amido até etanol até mesmo nas maiores concentrações de amido testadas, embora os maiores rendimentos tenham sido obtidos nas menores concentrações (Tabela 7). Concentrações baixas de amido permitem um melhor tratamento do meio de cultura, como a gelatinização, tornando-o mais fluido e reduzindo a retrogradação do amido presente, a qual impede o acesso da levedura aos grânulos.

**Tabela 7.** Produção, rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e eficiência ( $\eta$ ) de etanol nas diferentes concentrações testadas de amido.

Concentração de amido (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s \text{ etanol}}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$\eta$ etanol (%)
5	2,360	0,425	83,377
10	3,100	0,279	54,760
15	1,910	0,114	22,493
20	1,545	0,069	13,646
25	2,685	0,097	19,144
30	3,420	0,102	20,137
35	0,825	0,021	4,163
40	1,845	0,041	8,147
45	1,390	0,027	5,456
50	1,470	0,026	5,193
55	0,930	0,015	2,986
60	0,860	0,012	2,531

\*Resultados obtidos pela média de três repetições.

A determinação da capacidade fermentativa da levedura BB4 nos mostos com altas concentrações é necessária uma vez que, tradicionalmente, as concentrações de amido nos mesmos oscilam em uma faixa de 12 – 38% m/v (Bialas, Czerniak e Szymanowska-Powalowska, 2014). À medida que a concentração do substrato no mosto aumenta, há a necessidade de maior quantidade de enzimas para a quebra dos grânulos de amido, podendo levar à necessidade de adição de enzimas exógenas, o que oneraria o processo. O fato de a levedura BB4 ter sido capaz de fermentar diretamente o amido a etanol mesmo nas concentrações de substrato mais elevadas reforça seu potencial uso nessa indústria e a necessidade de padronização das condições de processo visando aumento de sua produtividade.

## 5.6. Seleção da modalidade do processo fermentativo

O tratamento SHF foi o que levou à maior produtividade de etanol pela levedura BB4 (Tabela 8). Embora o processo SSF seja

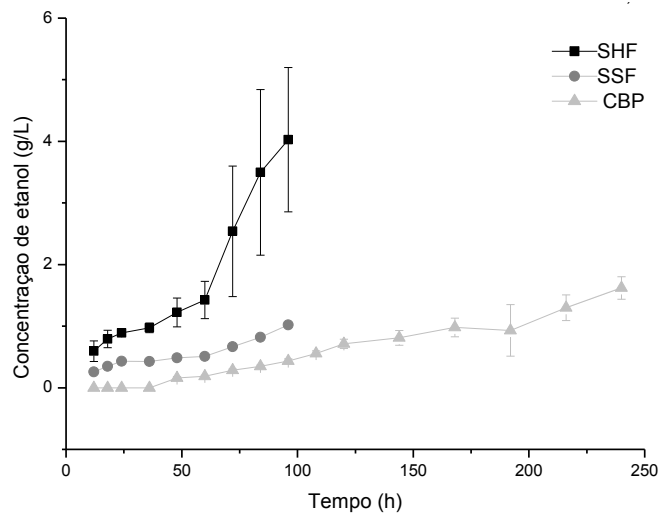
rotineiramente empregado como uma forma de aumentar a produção de etanol, reduzindo os tempos de fermentação, o emprego desta modalidade de processo, nas condições avaliadas, levou às menores concentrações de etanol obtidas. Dessa forma, sugere-se trabalhar com tratamento SHF usando a levedura BB4.

**Tabela 8.** Parâmetros de rendimento da levedura BB4 nos tratamentos de sacarificação e fermentação separados (SHF), sacarificação e fermentação simultâneos (SSF) e bioprocessamento consolidado (CBP).

Modalidade de processo	Amido residual (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s etanol</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p etanol</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	η etanol (%)
SHF	1,08	4,05	0,069±0,02 a	0,042±0,01 a	0,135±0,03 a
SSF	2,46	1,02	0,018±0,01 a	0,011±0,01 b	0,035±0,01 a
CBP	46,77	0,66	0,014±0,05 a	0,007±0,04 b	0,133±0,09 a

\*Resultados obtidos pela média de três repetições, obtidas dos três tratamentos: SHF, SSF, CBP.

Os tratamentos SHF e SSF, nos quais foi utilizada a enzima exógena, foram conduzidos durante 96 h e resultaram em baixas quantidades de amido residual graças à eficiência de hidrólise da enzima, disponibilizando os açúcares fermentescíveis em menor tempo em comparação com o CBP. Neste último, a levedura necessita de um maior tempo de adaptação para sintetizar as enzimas hidrolíticas capazes de clivar a matriz de amido e fornecer açúcares fermentescíveis. A baixa taxa de hidrólise refletiu na eficiência de conversão observada nesta modalidade de processo, a qual foi idêntica à encontrada no SHF, mesmo em uma concentração final de etanol 6 vezes inferior em 96 h de fermentação. A disponibilização dos açúcares de forma gradual também permitiu que a fermentação fosse mantida até o 10º dia de fermentação, quando foram cessadas as análises (Figura 4).

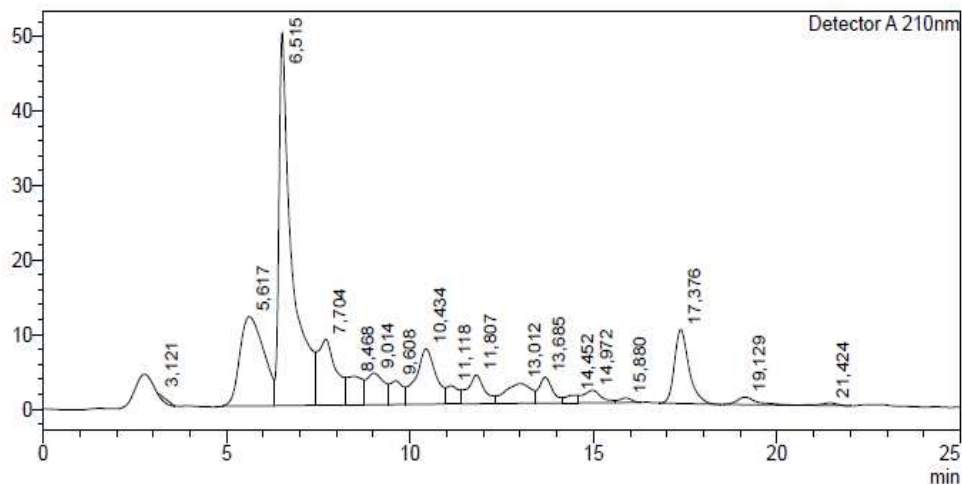


**Figura 4.** Produção de etanol pela levedura BB4 nas modalidades de processo de sacarificação e fermentação separados (SHF), sacarificação e fermentação

De forma geral, nos tratamentos SHF e SSF a quantidade de substrato hidrolisado foi alta, correspondente a um potencial para produção de até de  $35 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol. Deste valor, somente 11% foi obtido no tratamento SHF e 2,85% no SSF. Uma das explicações para a baixa eficiência de conversão da levedura nesses processos seria a possível indução de vias alternativas no metabolismo da levedura, gerada pelo excesso de açúcares no meio. Chandrakant e colaboradores (Chandrakant *et al.*, 1991) descreveram a obtenção industrial de sorbitol a partir de hidrolisados de amido de milho e mandioca, evidenciando que existe a possibilidade de que a levedura BB4 tenha produzido esse composto além de etanol. Os cromatogramas obtidos ao final do processo fermentativo por essa levedura mostram que ela utilizou os açúcares hidrolisados para produzir outros compostos, tais como sorbitol (min. 17 na figura 5), um poliálcool obtido a partir de glicose, e que a nível industrial é produzido a partir de hidrolisados de amido de milho e mandioca.

### <Chromatogram>

mV



**Figura 5.** Cromatograma obtido durante a análise de produção de etanol da levedura BB4. O pico no min 17,376 supõe-se que representa o sorbitol produzido.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foram isoladas linhagens de leveduras provenientes de fontes amiláceas para produção de etanol a partir de amido de mandioca industrial. As fontes amiláceas foram consideradas boas para a obtenção de microrganismos capazes de fermentar diretamente o amido. Dos 62 isolados obtidos, três deles (N43, BB4 e MB9) apresentaram a maior produtividade em etanol.

O isolado BB4, identificado como *Pichia kudriavzevii*, apresentou estabilidade em diferentes concentrações de etanol, tendo seu crescimento inibido somente a partir de concentrações superiores a 100 g·L<sup>-1</sup>. A modalidade de sacarificação e fermentação separadas (SHF) foi a mais eficiente na conversão do amido a etanol, com uma produção de até 4,05 g·L<sup>-1</sup>. Dessa forma, a levedura BB4 pode ser indicada para a produção de etanol a partir de amido de mandioca industrial a partir dessa modalidade de processo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.; DJEBLI, N.; AISSAT, S.; KHIATI, B.; MESLEM, A.; BACHA, S. In vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 10, p. 816–821, 2013.

AJIBOLA, F. O.; EDEMA, M. O.; OYEWOLE, O. B. Enzymatic Production of Ethanol from Cassava Starch Using Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nigerian Food Journal**, v. 30, n. 2, p. 114–121, 2012.

ALI, S. S.; NUGENT, B.; MULLINS, E.; DOOHAN, F. M. Fungal-mediated consolidated bioprocessing: the potential of *Fusarium oxysporum* for the lignocellulosic ethanol industry. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 13, 2016.

Alves, A. A. C.. Cassava botany and physiology. In R. J. Hillocks, J. M. Thresh, & A. Bellotti (Eds.), *Cassava: Biology, production and utilization*, p. 67–89. Wallingford, UK: CABI, 2002.

ARELLANO-CARBAJAL, F.; OLMOS-SOTO, J. Enzimas amilolíticas microbianas. **Biotecnología**, v. 4, n. 3, p. 115–121, 1999.

ARUNA, A.; NAGAVALLI, M.; GIRIJASHANKAR, V.; PONAMGI, S. P. D.; SWATHISREE, V.; VENKATESWAR RAO, L. Direct bioethanol production by amyolytic yeast *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 229–236, 2015.

AXELSSON, J. **Separate hydrolysis and fermentation of pretreated spruce**. Master Thesis, Linköping University, p. 50, 2011.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.

BANERJEE, M.; DEBNATH, S.; MAJUMDAR, S. K. Production of alcohol from starch by direct fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 32, p. 831–834, 1988.

BENINCA, C.; COLMAN, T. A. D.; LACERDA, L. G.; SILVA CARVALHO FILHO, M. A. DA; DEMIATE, I. M.; BANNACH, G.; SCHNITZLER, E. Thermal, rheological, and structural behaviors of natural and modified cassava starch granules, with sodium hypochlorite solutions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2217–2222, 2013.

BIALAS, W.; CZERNIAK, A.; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, D. Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 1, p. 153–162, 2014.

BINOD, P.; SINDHU, R.; PANDEY, A. The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. *In: Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Springer Berlin Heidelberg, p. 131–149, 2013.

BORGLUM, G. B. Starch Hydrolysis for Ethanol Production. **ACS Division of Fuel Chemistry, Preprints**, v. 25, n. 4, p. 264–269, 1980.

BRASIL, Biocombustíveis, 2014. Site: <http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2011/12/pais-revoluciona-o-uso-e-a-producao-de-biocombustivel>. Acessado em: Abril, 2017.

CASPETA, L.; SHOAIE, S.; AGREN, R.; NOOKAEW, I.; NIELSEN, J. Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in silico evaluation of their potentials. **BMC systems biology**, v. 6, n. 1, p. 24, 2012.

CASTAÑO, H.; CARDONA, B. M.; MEJÍA, G. C.; CÁRDENAS, A. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. **DYNA - ISSN 0012-7353**, v. 78, n. 169, p. 158–166, 2011.

CHAN, G. F.; GAN, H. M.; LING, H. L.; RASHID, N. A. A. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 10, p. 1300–1301, 2012.

CHANDRAKANT, M. U.; NEHETE, P. N.; SHAH, D. N.; SHAH, N. K.; ANKLESHWAR, V. S. M.; KOTHARI, R. M. Alternate Economical Starchy Substrates for the Production of 70% Sorbitol. **Starch - Stärke**, v. 43, n. 3, p. 107–113, 1991.

CHARLES, A. L.; CATO, K.; HUANG, T. C.; CHANG, Y. H.; CIOU, J. Y.; CHANG, J. S.; LIN, H. H. Functional properties of arrowroot starch in cassava and sweet potato composite starches. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 187–191, 2014.

CHEN, Y.; HUANG, S.; TANG, Z.; CHEN, X.; ZHANG, Z. Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of alpha-amylase and glucoamylase. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 272–275, 2011.

CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade da levedura da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado em Agronomia – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, p, 124, 2003.

CORRE, D. LE; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: A review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139–1153, 2010.

DEREZ, F.; CORNEEL, S. J. W. G. DE; KETSMAN, J.; NATALONI, L. **Process for starch liquefaction**. Patent, Cargill, Incorporated, n. WO2014025872 A1, 2014.

DÍAZ-NAVA, L. E.; MONTES-GARCIA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from sweet sorghum juice. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2017.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel

ethanol production: Current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258–266, 2003.

DING, J.; HUANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, N.; YANG, D.; ZHANG, K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 253–263, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación - **Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades**. ISSN 0251-1371, 2008.

FLEET, G. H. Wine Microbiology and Biotechnology. *In*: **Wine Microbiology and Biotechnology**. CRC Press. p. 510, 1993.

GUIMARÃES, M. **Diversidade e afiliação filogenética de leveduras associadas á plantas de sorgo sacarino [ sorghum bicolor (L.) moench ] cultivadas no cerrado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, p. 65, 2016.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial alpha-amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.

HAJAR, S.; AZHAR, M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; AZLAN, J.; AZIFA, A.; FAIK, M.; FRANCIS, K. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, n. February, p. 52–61, 2017.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1287–1294, 2012.

HII, S. L.; TAN, J. S.; LING, T. C.; ARIFF, A. BIN. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.

HORVÁTHOVÁ, V.; JANEČEK, Š.; ŠTURDÍK, E. Amylolytic enzymes:

their specificities , origins and properties. **Biologia, Bratislava**, v. 55, n. 6, p. 605–615, 2000.

JAMAI, L.; ETTAYEBI, K.; YAMANI, J. EL; ETTAYEBI, M. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of  $\alpha$ -amylase. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2765–2770, 2007.

JEFFRIES, T. W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, n. 5, p. 213–218, 1981.

KANG, Q.; APPELS, L.; TAN, T.; DEWIL, R. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

KARIMI, S.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. Experimental investigation of bioethanol liquid phase dehydration using natural clinoptilolite. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 435–444, 2016.

KISS, A. A.; SUSZWALAK, D. J.-P. C. Enhanced bioethanol dehydration by extractive and azeotropic distillation in dividing-wall columns. **Separation and Purification Technology**, v. 86, p. 70–78, 2012.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223–253, 2010.

KORDOWSKA-WIATER, M. Production of arabitol by yeasts: Current status and future prospects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 303–314, 2015.

LI, P.; ZHU, M. A consolidated bio-processing of ethanol from cassava pulp accompanied by hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10471–10479, 2011.

LI, Z.; LIU, W.; GU, Z.; LI, C.; HONG, Y.; CHENG, L. The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 189–196, 2015.

LIM, H. C.; SHIN, H. S. Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactor. **Fed-Batch Cultures**, ISBN: 9780521513364, Cambridge, 2013.

LUCYNA, S.; ZIELONKA, R.; JAROS, L. The unconventional single stage hydrolysis of potato starch. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 15, n. 3, p. 7–14, 2013.

MAIA, J. G. S. S.; DEMUNER, R. B.; SECCHI, A. R.; JR, E. C. B. MODELING AND SIMULATION OF THE PROCESS OF DEHYDRATION OF BIOETHANOL TO ETHYLENE. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 479–490, 2016.

MARTIN, C.; SMITH, A M. Starch biosynthesis. **The Plant cell**, v. 7, n. 7, p. 971–985, 1995.

MEYER, T.; ROSA, C. A.; LACHANCE, M.-A. The yeast genus *Starmerella* gen . nov . and *Starmerella bombicola* sp . nov ., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 48, p. 1413–1417, 1998.

MODRO, A. F. H.; SILVA, I. C.; LUZ, C. F. P.; MESSAGE, D. Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, n. 2, p. 281–285, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais**. 1. ed. Lavras. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY**. New York : W.H. Freeman, 5th ed, 2008.

OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 465–469, 2008.

OKAMOTO, K.; UCHII, A.; KANAWAKU, R.; YANASE, H. Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **SpringerPlus**, v. 3, p. 121, 2014.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. Biotechnology for Biofuels A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology Biofuels**, v. 1, n. 7, p. 1–14, 2008.

PALACIOS-BERECHE, R.; ENSINAS, A.; MODESTO, M.; NEBRA, S. A. New alternatives for the fermentation process in the ethanol production from sugarcane: Extractive and low temperature fermentation. **Energy**, v. 70, p. 595–604, 2014.

PEREIRA, S. E.; FERNANDES, K. F.; ULHOA, C. J. Immobilization of *Cryptococcus flavus*  $\alpha$ -amylase on glass tubes and its application in starch hydrolysis. **Starch - Stärke**, p. 1–8, 2016.

RAVAGNANI, M. A. S. S.; REIS, M. H. M.; FILHO, R. M.; WOLF-MACIEL, M. R. Anhydrous ethanol production by extractive distillation: A solvent case study. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 88, n. 1, p. 67–73, 2009.

RFA, Renewable Fuel Association. **World Fuel Ethanol Production**. Site: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>. Acessado em febrero 2017.

ROSA, C.; LACHANCE, M.; SILVA, J.; TEIXEIRA, A.; MARINI, M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271–275, dez. 2003.

SANKH, S.; THIRU, M.; SARAN, S.; RANGASWAMY, V. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. **Fuel**, v. 106, p. 690–696, 2013.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6,

p. 966–972, 2007.

SILVA, M. S. **DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL**. Tese de Doutorado, Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, p. 108, 2016.

SILVA, R. O. DA; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, osmotic and ethanol stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 161–169, 2013.

SOUZA, P. M. DE; MAGALHÃES, P. DE O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–861, 2010.

TAKO, M.; TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKEDA, Y. The Principles of starch gelatinization and retrogradation. **Food and Nutritional Sciences**, v. 5, n. January, p. 280–291, 2014.

TANIMURA, A.; KIKUKAWA, M.; YAMAGUCHI, S.; KISHINO, S.; OGAWA, J.; SHIMA, J. Direct ethanol production from starch using a natural isolate, *Scheffersomyces shehatae*: Toward consolidated bioprocessing. **Nature: Scientific reports**, v. 5, n. 9593, 2015.

TANIMURA, A.; NAKAMURA, T.; WATANABE, I.; OGAWA, J.; SHIMA, J. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. **SpringerPlus**, v. 1, n. 1, p. 27, 2012.

TANIMURA, A.; TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; ENDOH, R.; KIKUKAWA, M.; YAMAGUCHI, S.; SAKURADANI, E.; OGAWA, J.; OHKUMA, M.; SHIMA, J. *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. **Scientific reports**, v. 4, p. 4776, 2014.

TASIC´, B. M.; VELJKOVIC, B. V. Simulation of fuel ethanol production from potato tubers. **Computers and Chemical Engineering**, v. 35, p. 2284–2293, 2011.

TIKKA, C.; OSURU, H. P.; ATLURI, N.; RAGHAVULU, P. C. V.; YELLAPU, N. K.; MANNUR, I. S.; PRASAD, U. V.; ALURU, S.; K, N. V.;

BHASKAR, M. Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. **Bioinformation**, v. 9, n. 8, p. 421–425, 2013.

VERMA, G.; NIGAM, P.; SINGH, D.; CHAUDHARY, K. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 3, p. 261–266, 2000.

XU, Q.-S.; YAN, Y.-S.; FENG, J.-X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 216, 2016.

ZABED, H.; FARUQ, G.; SAHU, J. N.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; NASRULHAQ BOYCE, A. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ZERVA, A.; SAVVIDES, A. L.; KATSIFAS, E. A.; KARAGOUNI, A. D.; HATZINIKOLAOU, D. G. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 294–299, 2014.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 456–480, 2015.