



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
COLEGIADO DE ALIMENTOS



JULIA CAMPORESI ROMANELLO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE
AMOSTRAS COLETADAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO
UTILIZADO EM USINA DE BIOETANOL**

OURO PRETO
2024

Julia Camporesi Romanello

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE
AMOSTRAS COLETADAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO
UTILIZADO EM USINA DE BIOETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Mariana Furtado Granato de Albuquerque

**OURO PRETO
2024**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R758i Romanello, Julia Camporesi.
Isolamento e seleção de leveduras provenientes de amostras coletadas antes e após o tratamento térmico utilizado em usina de bioetanol. [manuscrito] / Julia Camporesi Romanello. - 2024.
50 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Dra. Mariana Furtado Granado De Albuquerque.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Nutrição. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos .

1. Bioetanol. 2. Fermentação. 3. Levedura de Cerveja. 4. Leveduras.
I. De Albuquerque, Mariana Furtado Granado. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 664

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



FOLHA DE APROVAÇÃO

Julia Camporesi Romanello

Isolamento e seleção de leveduras provenientes de amostras coletadas antes e após o tratamento térmico utilizado em usina de bioetanol

Monografia apresentada ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Aprovada em 18 de outubro de 2024

Membros da banca

Doutora - Mariana Furtado Granato de Albuquerque - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Elisa da Silva Barreto - Universidade Federal de Ouro Preto
Professor Doutor - Erick Ornellas Neves - Universidade Federal de Ouro Preto

Mariana Furtado Granato de Albuquerque, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 18/10/2024



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Furtado Granato de Albuquerque, Usuário Externo**, em 29/10/2024, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0798080** e o código CRC **131060D3**.

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho e todas as minhas conquistas aos meus pais, Edineia e Nivaldo, que são minha constante fonte de motivação, força e principalmente amor. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) e a todos que por ele passaram e compartilharam um pouco de conhecimento.

Agradeço especialmente à equipe com quem tive o prazer de trabalhar: Aninha, Bianca, Margarete, Patrícia e Tássia, por todos os aprendizados.

Minha imensa gratidão à Mariana, pela paciência, dedicação e por transmitir diariamente seus ensinamentos, se mostrando um grande exemplo.

Agradeço à UFOP e ao ENUT pelo ensino gratuito e de qualidade, e a todos os professores que fizeram parte dessa caminhada.

RESUMO

A produção de bioetanol, a partir da cana-de açúcar, se destaca no cenário mundial, sendo uma das principais alternativas sustentáveis para a geração de energia renovável. O processo brasileiro de produção desse biocombustível emprega a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em bateladas alimentadas abertas com reciclagem de células de levedura, tratadas com ácido sulfúrico, para tentar manter a produtividade de etanol. Nesse contexto, a dinâmica da população microbiana presente nas dornas representa um grande desafio, já que tem sido bastante comum a rápida substituição das cepas iniciais por outras com características indesejáveis, como alta floculação e produção de espuma, prejudicando o rendimento do processo. No intuito de obter estirpes de leveduras com fenótipos desejáveis para a produção de bioetanol e contribuir para o melhor entendimento sobre as possíveis origens das leveduras atuantes no processo, um protocolo composto por análises bioquímicas e moleculares foi utilizado para selecionar cepas de leveduras provenientes de amostras coletadas antes e após tratamento térmico empregado em uma unidade produtora de bioetanol. Os resultados revelaram que o tratamento térmico utilizado para esterilizar a matéria-prima na usina foi bastante eficaz e que o protocolo adotado direcionou de forma satisfatória a seleção para cepas com características desejáveis à produção de bioetanol. Foram selecionadas quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo duas provenientes do caldo secundário (A7-1 e C4-1) e outras duas do mosto (H1-3 e C9-3). Todas as quatro foram resistentes a várias condições de estresse, bem como tolerantes à presença de melão, ácido aconítico e íons de alumínio. Além disso, se mostraram pouco floculantes, com apenas 3,7%, 0,0%, 23,9% e 24,5% de floculação, respectivamente. Seus desempenhos fermentativos foram estatisticamente iguais àquele apresentado pelo controle positivo PE-2, sem produção de espuma. Logo, as quatro cepas selecionadas são potencialmente capazes de aumentar a eficiência e competitividade da produção de bioetanol no Brasil, e o material genético das cepas finalistas de cada amostra pode fornecer informações importantes sobre a dinâmica microbiana presente nas dornas de fermentação desse biocombustível.

Palavras-chave: Bioetanol, Fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, Leveduras selecionadas.

ABSTRACT

Bioethanol production from sugarcane stands out on the global stage, being one of the main sustainable alternatives for generating renewable energy. The Brazilian process for producing this biofuel uses the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in open fed batches with recycling of yeast cells, treated with sulfuric acid, in an attempt to maintain ethanol productivity. In this context, the dynamics of the microbial population present in the vats represents a great challenge, since it has been quite common for the initial strains to be rapidly replaced by others with undesirable characteristics, such as high flocculation and foam production, compromising the process yield. In order to obtain yeast strains with desirable phenotypes for bioethanol production and to contribute to a better understanding of the possible origins of the yeasts involved in the process, a protocol consisting of biochemical and molecular analyses was used to select yeast strains from samples collected before and after heat treatment employed in a bioethanol production unit. The results revealed that the heat treatment used to sterilize the raw material at the plant was quite effective and that the adopted protocol satisfactorily directed the selection towards strains with desirable characteristics for bioethanol production. Four strains of *Saccharomyces cerevisiae* were selected, two from the secondary broth (A7-1 and C4-1) and the other two from the must (H1-3 and C9-3). They were resistant to various stress conditions, as well as tolerant to the presence of molasses, acetic acid and aluminum ions. In addition, they showed low flocculants, with only 3.7%, 0.0%, 23.9% and 24.5% flocculation rate, respectively. Their fermentation performances were statistically similar to that of the positive control PE-2, without foam production. Therefore, the four selected strains are potentially capable of increasing the efficiency and competitiveness of bioethanol production in Brazil, and the genetic material of the finalist strains of each sample can provide important information about the microbial dynamics present in the fermentation vats of this biofuel.

Keywords: Bioethanol, Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, Selected yeasts.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1 Fermentação Alcoólica.....	9
2.2 Bioetanol: combustível do presente e do futuro.....	11
2.3 Processamento do etanol a partir da cana-de-açúcar.....	12
2.4 Desafios da produção de bioetanol e a busca pela levedura ideal.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivo Específicos.....	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Obtenção das amostras.....	18
4.2 Isolamento das colônias e montagem das placas-mãe.....	19
4.3 Seleção de leveduras do gênero Saccharomyces.....	20
4.4 Resistência a diferentes tipos de estresse.....	21
4.5 Tolerância a diferentes compostos e substâncias.....	22
4.6 Floculação qualitativa.....	23
4.7 Floculação quantitativa.....	24
4.8 Identificação de espécie.....	25
4.8.1 PCR - ITS.....	25
4.8.2 Digestão Enzimática.....	26
4.9 Desempenho fermentativo.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	43
7. PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

A escassez iminente dos combustíveis fósseis, aliada à crescente demanda por alternativas energéticas, intensifica a busca por soluções sustentáveis e renováveis. Nesse cenário, a cana-de-açúcar se destaca como uma matéria-prima promissora uma vez que viabiliza a produção de bioetanol e contribui significativamente para a redução da dependência dos combustíveis fósseis e seus impactos ambientais (DIAS *et al.*, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol do mundo, sendo responsável por cerca de 30% da produção global desse biocombustível (REGO-COSTA *et al.*, 2023; BARROS, 2022). Além disso, o país, pioneiro na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, consolidou sua experiência nesse processo fermentativo na década de 1970, por meio da criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), e estabeleceu um mercado sólido para este biocombustível (ANTUNES *et al.*, 2019; MOREIRA, 1999). Todo o investimento nesse processo produtivo se deu pelo fato do bioetanol se apresentar como uma alternativa promissora frente aos combustíveis derivados do petróleo, pois oferece vantagens energéticas, econômicas e ambientais, além da ampla disponibilidade e baixo custo da cana-de-açúcar, uma das matéria-primas utilizada na obtenção desse biocombustível (MATSUOKA, *et al.*, 2009).

Acontece que a maior parte das usinas de bioetanol de primeira geração brasileiras, que utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima, emprega a fermentação por batelada alimentada, com alta densidade de células, o que garante uma estabilidade de produção superior àquela obtida pelo processo operado de modo contínuo. Assim, após cada ciclo de fermentação, as leveduras utilizadas são centrifugadas e tratadas com ácido sulfúrico diluído para, em seguida, mais de 90% delas serem recicladas e empregadas em um novo ciclo de fermentação. Dessa forma, a alta densidade de células é mantida, o que é crucial para fermentações de curta duração e alta produtividade (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2021).

A produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar envolve várias etapas-chave como a colheita e limpeza da cana, extração dos açúcares

(moagem), tratamento do caldo (mosto), fermentação, destilação e desidratação. O tratamento térmico é realizado através do aquecimento do caldo de cana tratado para aumentar a concentração de sacarose e eliminar microrganismos provenientes das etapas anteriores (DIAS *et al.*, 2011). Entretanto, a fermentação da cana-de-açúcar a bioetanol, em larga escala e em condições não assépticas como ocorre nas biorrefinarias, gera um ambiente ecológico particular no qual a levedura *Saccharomyces cerevisiae* atua como organismo dominante (REGO-COSTA *et al.*, 2023). Este processo fermentativo apresenta algumas características que o tornam muito peculiar: o inóculo é formado por cerca de 30% (v/v) de leveduras, que são utilizadas em ciclos de fermentação aberta por 8-9 meses ao ano; as leveduras são recicladas a cada 12 horas após tratamento com ácido diluído combinado ou não com antimicrobianos específicos para controlar a contaminação bacteriana e manter a performance fermentativa (REGO-COSTA *et al.*, 2023; AMORIM *et al.*, 2011).

Pesquisas voltadas para as mudanças microbiológicas que ocorrem nos fermentadores industriais têm mostrado uma rápida renovação de cepas de leveduras durante a produção do bioetanol. Conseqüentemente, a levedura inicial é completamente substituída por outras cepas em semanas. Muitas cepas de leveduras contaminantes capazes de sobreviver dentro das dornas industriais das usinas de bioetanol podem apresentar fenótipos indesejados como filamentação, crescimento invasivo, floculação, formação de biofilme e produção excessiva de espuma (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2021). Por outro lado, cepas específicas de leveduras exibem dominância dentro dos fermentadores, o que permite a identificação de cepas industriais com capacidades fermentativas robustas e resiliência contra as condições exigentes dos ambientes industriais. Essas condições abrangem altas temperaturas e pressões osmóticas, concentrações elevadas de etanol, baixos níveis de pH, presença de agentes antiespumantes industriais, possíveis interrupções do processo, dentre outras (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2021).

Cepas especializadas têm sido empregadas para iniciar a safra em usinas de bioetanol. Elas têm contribuído para melhorar o desempenho geral da indústria sucroenergética. No entanto, a invasão por cepas de leveduras desconhecidas ainda é bastante comum devido à variação significativa entre uma planta e outra

no que se refere às matérias-primas, práticas industriais, condições ambientais e até possíveis mudanças evolutivas nas leveduras ao longo de uma temporada de fermentação (REGO-COSTA *et al.*, 2023). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar leveduras com características desejáveis a partir de amostras provenientes de uma usina de bioetanol brasileira, coletadas em etapas do processo produtivo que ocorrem antes e após o tratamento térmico empregado para esterilizar a matéria-prima. Assim, os resultados apresentados permitirão o aprofundamento das investigações relacionadas às possíveis origens das cepas de leveduras presentes nas dornas de fermentação para produção de bioetanol e contribuirão para melhor elucidação da dinâmica microbiana envolvida neste processo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

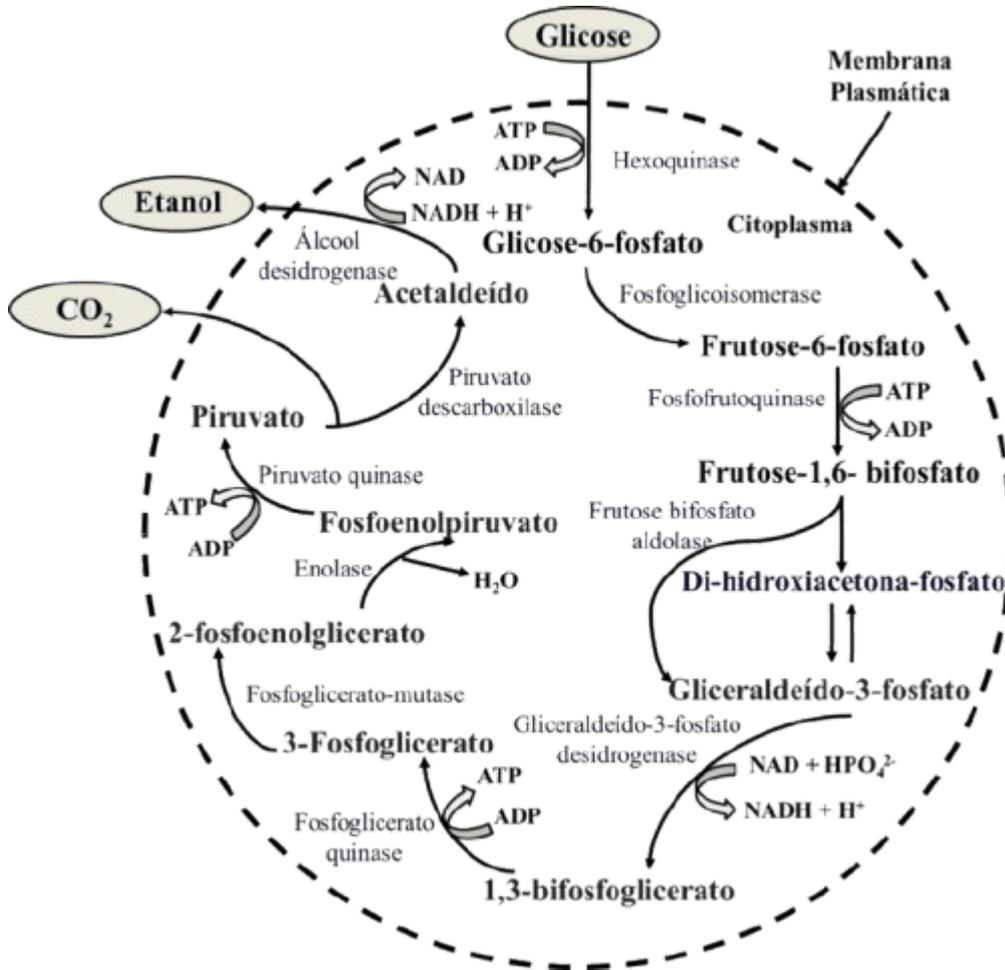
2.1 Fermentação Alcoólica

A fermentação ao longo da história da humanidade detém papel crucial, pois mesmo sem compreender as técnicas, civilizações antigas já utilizavam desse processo para a conservação de alimentos e a produção de bebidas. Além de garantir a preservação, a fermentação trouxe novas fontes de sabor e nutrição, ajudando a população a sobreviver em tempos de escassez. Com o passar dos anos, estudos sobre a fermentação culminaram na descoberta de microrganismos responsáveis por esse processo e tal conhecimento se tornou base no ambiente industrial voltado para a produção de bebidas alcoólicas e de produtos lácteos (DUARTE, 2014).

A fermentação alcoólica é um processo que ocorre de forma anaeróbica, pela ação de leveduras, no qual os açúcares disponíveis no meio são convertidos em álcool etílico e gás carbônico (GÓES-FAVONI, 2018). O metabolismo de carboidratos em células de levedura gera ATP, que é uma forma de energia a ser consumida durante a biossíntese celular (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A sacarose, dissacarídeo proveniente da cana-de-açúcar, é convertida nos monossacarídeos glicose e frutose, que entram na via glicolítica e são convertidos em piruvato. Posteriormente, o piruvato é descarboxilado, formando acetaldeído e liberando

gás carbônico. O acetaldeído formado é reduzido a etanol, reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase (GUIDINI, 2013; BAI *et al.*, 2008), como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Via metabólica da fermentação alcoólica em leveduras.



Fonte: BAI *et al.*, 2008 (Adaptado).

Nessa via metabólica também são produzidos alguns subprodutos, sendo o glicerol o principal deles. Algumas condições favorecem essa produção, como maior pH do mosto, elevada pressão osmótica e um menor fluxo de piruvato, o que diminui o rendimento da produção de etanol. Para a fermentação do bioetanol, um dos parâmetros mais importantes é o rendimento do processo, que é dependente do desempenho fermentativo das leveduras e de suas capacidades de resistir ou se adaptar aos estresses que são inerentes desse processo produtivo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é altamente empregada em processos de fermentação alcoólica (industriais e artesanais), pois várias estirpes

dessa espécie apresentam características desejáveis à produção de bioetanol como: alta eficiência na conversão de açúcares em etanol, resistência ao etanol e a variações de temperatura e pH. Além disso, produzem pequenas quantidades de subprodutos, como o glicerol, se comparadas com outras espécies (BAI *et al.*, 2008).

2.2 Bioetanol: combustível do presente e do futuro

O álcool etílico, antigamente consumido apenas como bebida, começou a ser usado como combustível a partir do século XX. No Brasil, a indústria do álcool surgiu da produção de açúcar, já que o etanol podia ser extraído do caldo residual da fabricação de açúcar, embora de forma rudimentar. Com a crise econômica mundial, em 1929, e a supersafra de cana-de-açúcar, em 1930, a produção de etanol com o excesso de matéria-prima da safra foi uma medida para tentar regular a economia sucroalcooleira. Cerca de 47 anos mais tarde, diante da primeira crise mundial do petróleo, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) a fim de regulamentar o uso do etanol anidro misturado à gasolina e, assim, cerca de 60% da gasolina foi substituída por este combustível (FPA, 2023).

Com o aumento crescente da demanda por petróleo no mundo, bem como do seu preço no mercado de combustíveis, a estratégia de diversificação da oferta energética representada por energias alternativas, como o etanol, tornou-se uma direção das políticas energéticas de vários países (XIE *et al.*, 2024). Os maiores produtores desse biocombustível são, em ordem decrescente, os Estados Unidos, o Brasil e a China, sendo que, do total de bioetanol produzido no mundo, cerca de 66% é utilizado como combustível, enquanto 14% é consumido pela indústria de alimentos e 11% pela indústria química (XIE *et al.*, 2024; WU *et al.*, 2021; LEME & SEABRA, 2017; CHIU *et al.* 2009).

O bioetanol é a fonte de energia renovável mais utilizada no mundo, desempenhando um papel crucial na segurança alimentar, na mitigação da crise energética e na preservação do meio ambiente (XIE *et al.*, 2024). O uso de fontes de energia renovável e de baixo teor de carbono é uma estratégia chave para reduzir a emissão de gases de efeito estufa (GEE) e, assim, combater o

aquecimento global. O etanol produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar, por apresentar um balanço energético e de emissão de carbono favorável, é uma alternativa comercial viável e com grande potencial de expansão em vários países, incluindo novas aplicações. Considerando seu ciclo de vida, o etanol de cana-de-açúcar pode reduzir em cerca de 90% as emissões de GEE se comparado com a gasolina, no Brasil (MEIRA FILHO & MACEDO, 2010).

Atualmente, existem 435 usinas de bioetanol no Brasil, sendo 44 delas localizadas no estado de Minas Gerais (NOVA CANA, 2024). A expansão do setor tem promovido efeitos positivos na geração de empregos e renda. Na safra 2022/2023, foram moídas cerca de 657,4 milhões de toneladas de cana-de-açúcar que geraram, aproximadamente, 34 bilhões de litros de álcool e 30 milhões de toneladas de açúcar (FPA, 2023; BARROS, 2022). Em termos financeiros, a cadeia sucroenergética gera mais de 700 mil vagas de emprego formal e é responsável por um PIB de aproximadamente 2% do PIB nacional (FPA, 2023).

Portanto, pode-se dizer que a produção de etanol é vital para a matriz energética brasileira, além de ser essencial na composição da cadeia agroindustrial e economia do país, colocando o Brasil à frente na busca por alternativas energéticas limpas e sustentáveis.

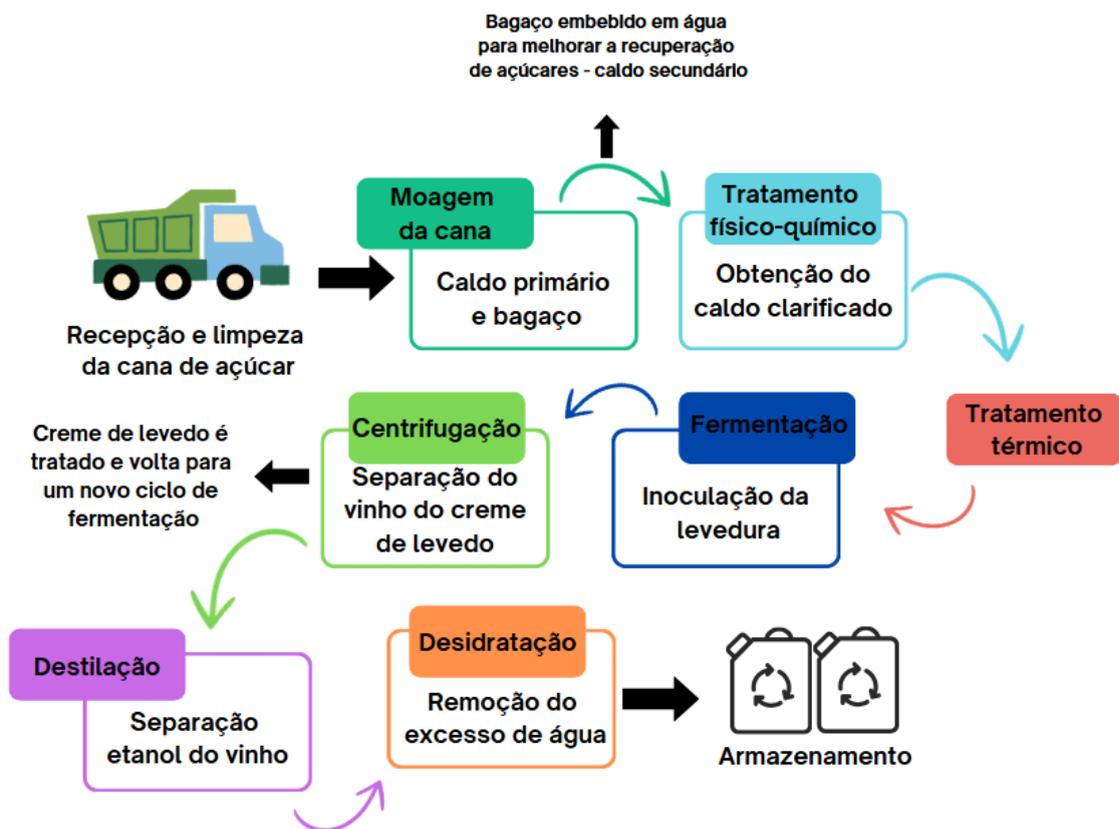
2.3 Processamento do etanol a partir da cana-de-açúcar

Apesar de cada usina de bioetanol possuir suas próprias características no que diz respeito às práticas industriais que visam a obtenção desse biocombustível, pode-se dizer que a sequência de etapas envolvidas na conversão da cana-de-açúcar em bioetanol propriamente dito é, de forma geral, bastante similar, conforme apresentado na Figura 2.

Após a colheita da cana, o processamento é iniciado com a chegada desta matéria-prima na usina, sendo inicialmente submetida à uma etapa de limpeza, que pode ser a seco e/ou por meio da utilização de água, cujo objetivo é a retirada de maiores sujidades como poeira, areia, terra, excesso de folhas e demais impurezas superficiais (DIAS *et al.*, 2011).

Posteriormente, a cana-de-açúcar limpa é moída por rolos trituradores para que os açúcares sejam extraídos e, dessa forma, são obtidos o caldo primário e bagaço de cana (DIAS *et al.*, 2011). Este último, além de ser aproveitado para geração de energia na usina, é embebido em água para melhorar a recuperação de açúcares durante sua passagem pelos últimos ternos da moenda. Assim é obtido o caldo secundário, que geralmente é destinado diretamente para a produção de etanol, enquanto o caldo primário, a depender da usina, é prioritariamente utilizado na produção de açúcar por ser de melhor qualidade (NUNES & FINZER, 2019; NOVACANA, 2024).

Figura 2: Fluxograma de processamento do bioetanol de cana-de-açúcar.



Fonte: DIAS *et al.*, 2011 (Adaptado).

O caldo primário e secundário seguem para o tratamento físico-químico, que consiste na utilização combinada de hidrociclones, telas e compostos químicos (ácido fosfórico e cal) para a remoção de areia, fibras e outras partículas dispersas no caldo. Após essa etapa, obtém-se o caldo clarificado que,

inicialmente contém cerca de 15% em peso de sólidos. Para que o produto da fermentação apresente um teor de etanol adequado que permita reduzir o consumo de energia durante as etapas de purificação, o caldo clarificado deve ser concentrado e, para isso, ele é submetido a um tratamento térmico, por meio de fervura, e em seguida, resfriado a 28°C para dar início a etapa de fermentação (DIAS *et al.*, 2011).

Além de aumentar a concentração de sacarose no caldo clarificado, o tratamento térmico também visa eliminar a carga microbiana proveniente das etapas anteriores e, conseqüentemente, garantir um bom rendimento do processo fermentativo (DIAS *et al.*, 2011). Como outras matérias-primas, a cana de açúcar possui uma carga microbiológica, que pode ser aumentada durante o processo devido à presença de biofilmes que se formam nas moendas e tubulações e à falta de higiene durante a manipulação. Diante dessa situação, o tratamento térmico torna-se crucial para a redução dessa microbiota presente no caldo. Um tratamento térmico eficiente do caldo clarificado está relacionado ao aumento da eficiência da fermentação, o que, conseqüentemente, resulta em um aumento na produção de etanol por quantidade de cana (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Uma vez esterilizado, o mosto é levado às dornas (tanques), onde é misturado com um fermento rico em leveduras. Estes microrganismos consomem os açúcares presentes no caldo e produzem etanol, gás carbônico e alguns subprodutos, como glicerol e ácidos orgânicos, ao longo de várias horas de fermentação. Ao final da etapa, o vinho obtido, composto por leveduras, açúcar residual e cerca de 10% de etanol é então submetido à centrifugação, para separação das leveduras e da fração líquida. As leveduras são tratadas com ácido sulfúrico para eliminar possíveis contaminações por bactérias e são, novamente, empregadas em novo ciclo fermentativo. Já a fração líquida livre de leveduras é destinada para a destilação (DIAS *et al.*, 2011).

O processo de separação do etanol e do vinho fermentado ocorre em colunas de destilação, nas quais o líquido é aquecido até evaporar. O vapor formado por etanol e água é condensado e coletado como fração líquida denominada etanol hidratado, utilizado como combustível, com um teor alcoólico de aproximadamente 96% (v/v). A partir do etanol hidratado obtém-se o álcool

anidro, cujo teor alcoólico é igual a 99,5% (v/v). O etanol anidro é frequentemente misturado à gasolina como combustível e pode ser obtido por meio da remoção de água (desidratação) promovida pela utilização de diferentes técnicas, como por exemplo separação extrativa e sistema de destilação de duplo-efeito. (DIAS *et al.*, 2011).

2.4 Desafios da produção de bioetanol e a busca pela levedura ideal

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* se destaca como o microrganismo mais utilizado na fermentação industrial de etanol, devido à sua alta produtividade, alta tolerância a compostos inibidores e facilidade para ser geneticamente modificada (VERMA & KUMAR, 2023). Com aplicações em processos biotecnológicos tradicionais, como panificação e produção de bebidas alcoólicas, essa levedura tem sido extensivamente estudada. Seu genoma sequenciado abre caminho para aplicações em engenharia genética, prometendo avanços na produção de biocombustíveis e na busca por alternativas aos combustíveis fósseis.

Apesar da produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar já ter sido implementada e melhorada ao longo de décadas no Brasil, esse processo ainda não está totalmente elucidado e apresenta desafios. O fato das leveduras serem reutilizadas em vários ciclos de fermentação industrial, por um lado representa uma vantagem, já que permite a utilização de uma alta densidade de células e um baixo tempo de fermentação. Em contrapartida, essa prática faz com que estas células sejam constantemente submetidas a diversas condições estressantes do processo, como altas concentrações de etanol e açúcares, baixo pH, contato com compostos inibidores provenientes do melaço e com metabólitos produzidos por bactérias, deficiência de minerais, dentre outros (AMORIM *et al.*, 2011; BASSO *et al.*, 2008). Assim, um dos desafios da produção de bioetanol é justamente compreender melhor como essa exposição afeta as leveduras empregadas no processo e os reflexos desse efeito na produção do biocombustível.

Nesse sentido, vários estudos têm sido voltados para melhorar a eficiência da produção de bioetanol por meio do isolamento e seleção de leveduras melhor adaptadas às condições do processo fermentativo brasileiro. As cepas industriais

PE-2 e CAT-1, amplamente empregadas nas usinas por anos, já foram responsáveis por cerca de 60% da produção total de etanol no país. Porém, devido às variedades de cana-de-açúcar desenvolvidas, aumento da utilização do melaço de cana, distinção de práticas industriais, mutações genéticas e outras modificações que aconteceram no processo com o passar dos anos, as usinas têm buscado utilizar novas cepas selvagens de *S. cerevisiae* isoladas a partir de amostras da própria unidade produtora. Assim, o isolamento e seleção de estirpes de leveduras mais bem adaptadas ao processo e que apresentem melhor desempenho fermentativo ainda representa um grande desafio (REGO-COSTA *et al.*, 2023; DE SOUZA *et al.*, 2018).

Desde 2005, as usinas de bioetanol têm reportado que a levedura original, inicialmente utilizada na fermentação, acaba sendo substituída por outras cepas em um curto período de tempo. Tal alteração na dinâmica da população microbiana presente na dorna de fermentação ainda é pouco compreendida, por vezes não prejudica o rendimento da produção de bioetanol, provavelmente porque a cepa dominante apresenta características desejáveis ao processo. Outras vezes, essa substituição acarreta enormes prejuízos, pois as leveduras dominantes apresentam características indesejáveis como altos níveis de floculação associados com diminuição significativa da produtividade (DE SOUZA *et al.*, 2018; AMORIM *et al.*, 2017; DA SILVA-FILHO *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstraram, por meio de análise de cariotipagem e métodos associados à reação em cadeia de polimerase (PCR), que há predominância de outras *Saccharomyces* e de leveduras de outros gêneros durante a fermentação em algumas usinas, enquanto em outras plantas as cepas dominantes eram descendentes da levedura inicialmente utilizada no processo (REGO-COSTA *et al.*, 2023; DE SOUZA *et al.*, 2018; ANDRIETTA *et al.*, 2011, ANDRIETTA *et al.*, 2007). Logo, mesmo as técnicas moleculares sendo mais populares hoje em dia, ainda há um longo caminho a ser percorrido para que a dinâmica microbiana que ocorre nas dornas de fermentação de etanol seja completamente compreendida. É essencial identificar, rastrear e determinar a origem das cepas dominantes durante o processo fermentativo para que, de fato, a produção de bioetanol seja otimizada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e selecionar estirpes de leveduras com fenótipos desejáveis à produção de bioetanol a partir de amostras coletadas durante etapas do processo produtivo que ocorrem antes e após o tratamento térmico aplicado em usina produtora desse biocombustível.

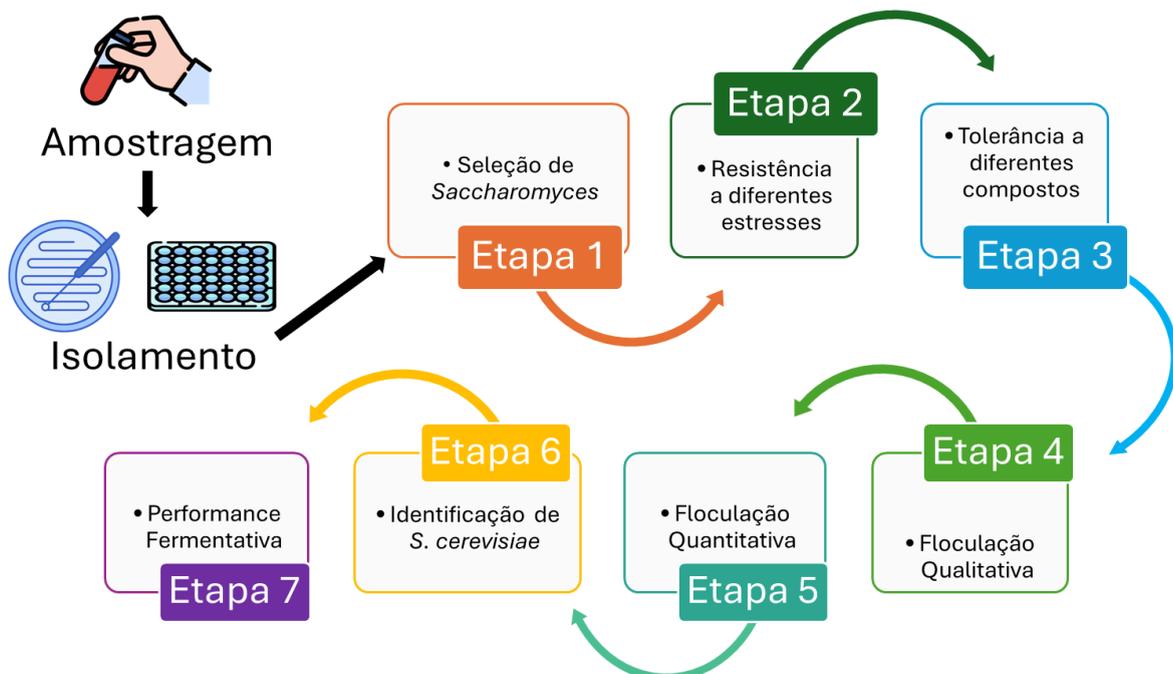
3.2 Objetivo Específicos

- Obter colônias isoladas de leveduras a partir de amostras coletadas em uma usina de bioetanol;
- Selecionar colônias que pertençam ao gênero *Saccharomyces*;
- Avaliar e selecionar as colônias mais resistentes a diversos estresses inerentes ao processo produtivo de bioetanol;
- Avaliar e selecionar as colônias mais tolerantes ao ácido aconítico, ao melaço e ao íon alumínio;
- Avaliar quantitativamente e qualitativamente o comportamento floculante dos isolados e selecionar aqueles menos floculantes;
- Identificar dentre os isolados pré-selecionados aqueles que são *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar o desempenho fermentativo das cepas selecionadas.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho teve como local de realização o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), com foco principal na seleção de leveduras com fenótipos desejáveis à produção de bioetanol por meio de um rigoroso protocolo de triagem. Essa triagem consistiu em uma série de experimentos que permitiram avaliar colônias de leveduras isoladas quanto às suas capacidades de crescimento e comportamentos em condições inerentes ao processo produtivo de bioetanol. Os experimentos foram conduzidos de forma consecutiva conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Fluxograma experimental para isolamento e seleção de estirpes de leveduras com fenótipos desejáveis para a produção de bioetanol.



Fonte: Própria autora.

4.1 Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas em sacos amostrais esterilizados, transportadas em isopor com gelo até o Laboratório de Biologia Celular e Molecular, onde foram mantidas sob refrigeração (4 °C) até a conclusão dos experimentos aqui descritos.

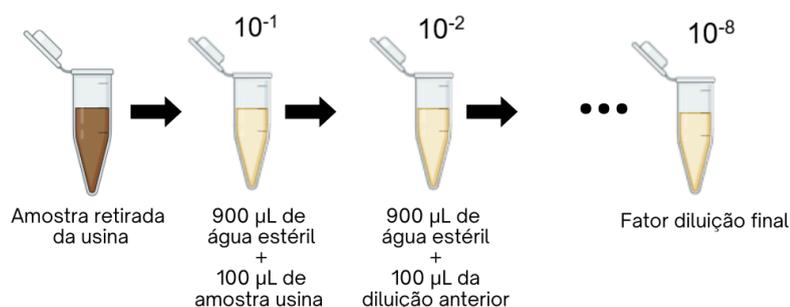
As coletas foram realizadas em diferentes etapas do processo de produção do bioetanol realizado em uma usina brasileira localizada no estado de Goiás, sendo o caldo secundário a única amostra coletada antes do tratamento térmico, enquanto o caldo filtrado, caldo clarificado, mel, mosto, creme de levedo e fermento tratado foram as amostras coletadas em etapas do processo produtivo que ocorreram após o tratamento térmico.

Essa diversificação de pontos de coleta permitiu não apenas avaliar a eficiência do tratamento térmico como método de esterilização da matéria-prima, mas também uma maior compreensão sobre a origem das leveduras e a dinâmica entre elas ao longo do processo.

4.2 Isolamento das colônias e montagem das placas-mãe

O isolamento das colônias foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Vicente e colaboradores (2006), com modificações. Inicialmente, as amostras foram submetidas à diluição seriada (Figura 4) com água esterilizada e 200 μL das diluições 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} de cada amostra foram inoculados em placas de Petri previamente esterilizadas contendo meio Ágar YP (Yeast Extract and Peptone), composto por 2% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedura e 1,5% (p/v) de ágar, suplementado com sacarose e cloranfenicol, cujas concentrações finais foram iguais a 8% (p/v) e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave, com exceção do antibiótico, para evitar degradação do mesmo pela alta temperatura. As placas contendo os meios de cultura inoculados foram incubadas em estufa à 30 $^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

Figura 4: Diluição seriada das amostras para obtenção das colônias de leveduras isoladas.



Fonte: Própria autora.

Após observar, em cada caso, qual diluição resultou no crescimento de colônias isoladas (Figura 5), o procedimento anteriormente descrito foi repetido apenas com a diluição mais adequada a fim de se obter cerca de 500 colônias isoladas por amostra.

Figura 5: Influência da diluição da amostra na obtenção de colônias devidamente isoladas, estando representadas, da esquerda para a direita, as diluições 10^{-6} e 10^{-1} de uma determinada amostra.



Fonte: Própria autora.

Em seguida, para construção das placas-mãe, as colônias de leveduras isoladas foram transferidas, com o auxílio de palitos esterilizados, das placas de Petri para microplacas de 96 poços contendo 200 μ L por poço de meio YP, composto por 2% (p/v) de peptona e 1% (p/v) extrato de levedura, suplementado com sacarose 8% (p/v) e cloranfenicol 100 μ g/mL. Cada colônia isolada foi colocada, separadamente, em um poço e identificadas de acordo com o número da placa e da posição do poço, considerando colunas (1 a 12) e linhas (A a H). As placas-mãe recém confeccionadas foram incubadas a 30 °C por 48 horas e, posteriormente, armazenadas sob refrigeração (4°C) até a finalização dos experimentos.

4.3 Seleção de leveduras do gênero *Saccharomyces*

Para selecionar apenas leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, as colônias isoladas foram cultivadas em meios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio que não são metabolizadas por leveduras desse grupo. Para avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono, foram preparados meios YP, suplementados com manitol 2% (p/v) ou lactose 2% (p/v).

Já para o teste de fonte alternativa de nitrogênio, foi utilizado 0,17% (p/v) de YNB (yeast nitrogen base), sem aminoácidos e sulfato de amônio, suplementado com 1% (p/v) de glicose e 0,14% (p/v) de lisina, e o pH corrigido para 5,5 (BARCELOS, 2021; VICENTE *et al.*, 2006; VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 1993).

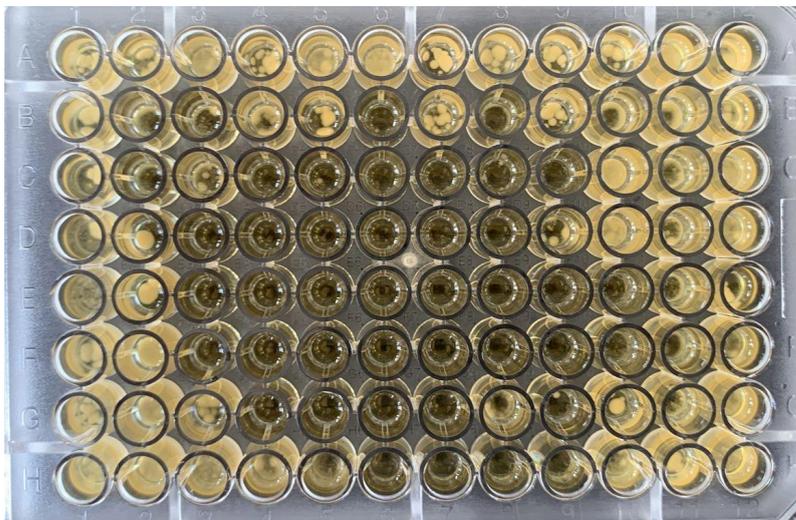
As microplacas de 96 poços foram esterilizadas com álcool 70% (v/v) e luz ultravioleta (3 ciclos de 90 segundos), identificadas e preenchidas com 200 µL de cada meio preparado e esterilizado em autoclave. Assim, com o auxílio de um replicador, realizou-se a transferência das colônias contidas nas placas-mãe para as placas-teste, que foram incubadas em estufas a 30°C por 48 horas. Após esse período, o crescimento ou não dos isolados foi observado a olho nu e foram selecionadas para a etapa seguinte apenas as colônias que não apresentaram crescimento em nenhuma das condições testadas (BARCELOS, 2021).

4.4 Resistência a diferentes tipos de estresse

Nessa etapa, a resistência dos isolados aos estresses osmótico, térmico, ácido e alcoólico, inerentes ao processo produtivo de bioetanol, foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Barcelos (2021), com modificações.

Para os testes relacionados ao estresse osmótico, os isolados foram transferidos para placas-teste contendo YP suplementado com 33% (p/v) de glicose e YP suplementado com 20% (p/v) de sacarose e incubados em estufa a 30°C por 48 horas. Para submeter os isolados avaliados ao estresse térmico, as células foram cultivadas em YP suplementado com 8% (p/v) de sacarose e incubados a 37°C por 48 horas. Já em relação ao ensaio de estresse ácido, os isolados foram transferidos para placas-teste contendo YP suplementado com 8% (p/v) de sacarose, pH 2,5 e incubados a 30°C por 48 horas. Para os ensaios de resistência ao estresse alcoólico, as células foram cultivadas em YP suplementado com 8% (p/v) de sacarose e etanol nas concentrações de 10%, 15% e 17% (v/v), incubadas a 30°C por 48 horas. O crescimento ou não dos isolados foi observado a olho nu, conforme exemplificado na Figura 6, e foram selecionados para a etapa seguinte apenas aqueles que apresentaram crescimento em todas ou na maior parte das condições testadas.

Figura 6: Placa-teste de estresse alcoólico, após incubação, na qual se observa o crescimento ou ausência de crescimento dos isolados avaliados.



Fonte: Própria autoria.

4.5 Tolerância a diferentes compostos e substâncias

Após a pré-seleção das colônias resistentes aos estresses inerentes à produção de bioetanol, foi realizada a avaliação da tolerância dessas leveduras a diferentes concentrações de ácido aconítico, melão e íons de alumínio.

Nos ensaios relacionados à tolerância ao ácido aconítico, os isolados foram transferidos para placas-teste contendo meio YNB 0,17% (p/v), suplementado com 2% (p/v) de sacarose e ácido aconítico nas concentrações finais de 10 mM e 20 mM., Após incubação a 30°C por 48 horas, os poços foram analisados a olho nu e foram consideradas resistentes as estirpes que apresentaram crescimento (BARCELOS, 2021).

Para avaliação da tolerância ao melão, os isolados foram transferidos para placas-teste contendo meio YP suplementado com melão nas concentrações finais de 15 e 30 °Brix. Após incubação a 30°C por 48 horas, os poços foram analisados a olho nu e foram consideradas resistentes as estirpes que apresentaram crescimento (BARCELOS, 2021).

Já nos ensaios realizados com o objetivo de avaliar a tolerância à presença de íons de alumínio, inicialmente os isolados pré-selecionados foram diluídos com em outras placas de 96 poços contendo água esterilizada. Logo, para cada

amostra, foram obtidas microplacas com os isolados nas diluições 10^{-1} a 10^{-4} . Com o auxílio de um replicador de 96 pinos, os isolados avaliados foram transferidos das microplacas nas diluições 10^{-2} e 10^{-4} para placas de Petri contendo meio Ágar YP suplementado com 8% (p/v) de sacarose e íons alumínio nas concentrações finais de 16,3 mM e 18,5 mM. Após incubação a 30°C por 48 horas, placas de Petri foram analisadas a olho nu e foram consideradas resistentes às estirpes que apresentaram crescimento conforme protocolo proposto por (PETROPAVLOVSKIY *et al.*, 2020; MEZADRI, 2018).

4.6 Floculação qualitativa

Para avaliar o comportamento floculante a olho nu e ao longo do tempo, 3 μL de cada célula selecionada nas etapas anteriores foram inoculados em tubos de ensaio com tampa de rosca, previamente autoclavados, contendo 3 mL de meio YP suplementado com 4% (p/v) de sacarose. Após 48h de incubação sob agitação de 200 rpm a 30°C , os tubos foram agitados por 30 segundos em vórtex e, em seguida, acomodados em repouso em suportes adequados conforme ilustrado na Figura 7. A formação de flocos e velocidade de sedimentação dos mesmos apresentadas por cada isolado foram avaliadas a cada 5 minutos durante 30 minutos.

Figura 7: Análise qualitativa da floculação apresentada por leveduras em meio YPSac 4%, sendo da esquerda para a direita: meio de cultura sem levedura (branco), Etanol Red, LCBM761 e levedura avaliada.



.Fonte: Própria autoria.

Ao final da avaliação, a floculação apresentada por cada isolado foi classificada como: muito baixa (+), baixa (++) , média (+++) , alta (++++) e muita

alta (+++++). Para fins de comparação, as cepas de *S. cerevisiae* LBCM761 e Etanol Red foram utilizadas como controle positivo de floculação muito alta e muito baixa, respectivamente. O controle negativo foi o meio YPSac 8% não inoculado com levedura. Foram submetidos à próxima etapa de seleção os isolados que apresentaram floculação mais baixa possível em cada amostra.

4.7 Floculação quantitativa

Para avaliação quantitativa da floculação, foi utilizado o Teste de Helm's de acordo com metodologia descrita por Alvarez e colaboradores (2014). Para tanto, 3 μ L de cultura celular de cada isolado selecionado na etapa anterior foram adicionados a tubos cônicos de 15 mL contendo 3 mL de meio YP suplementado com 8% (p/v) de sacarose. Posteriormente, os tubos foram incubados em shaker com agitação de 200 rpm a 30°C por 48 horas. O mesmo procedimento também foi realizado com os controles de floculação muito alta e muito baixa, as cepas LBCM761 e PE-2, respectivamente.

Após incubação, uma pequena alíquota de cada cultura celular foi observada no microscópio óptico e, uma vez constatada a ausência de bactérias, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de água destilada esterilizada e, em seguida, foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Essa etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes para remoção completa do meio de cultura. Após a terceira lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de EDTA 0,5 M pH 7,0. Uma alíquota de cada suspensão de células foi utilizada para determinação da densidade óptica (D.O.). A partir desse dado, foi calculado o volume de suspensão celular necessário para se obter cerca de 20 mL de cada isolado a uma D.O. entre 0,35 a 0,40.

Uma vez padronizada a D.O., nove alíquotas de 1 mL de cada amostra foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, sendo três tratadas como controle e seis como experimentais. Todos os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células precipitadas das alíquotas controle foram ressuspensas em EDTA 0,5 M pH 7,0 e deixadas em repouso. Já

as células precipitadas das alíquotas experimentais foram ressuspendidas em solução de sulfato de cálcio 0,5 g/L com o auxílio de um vórtex. Em seguida, foram submetidas à centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os respectivos sobrenadantes foram descartados, e as células ressuspendidas em tampão de suspensão composto por sulfato de cálcio (0,5 g/L), acetato de sódio (6,8 g/L), ácido acético glacial (4,5 g/L), etanol (4% v/v) em pH 4,5.

Uma vez finalizados o preparo e tratamento das alíquotas controles e experimentais, os nove microtubos foram agitados em vórtex simultaneamente por 30 segundos e colocados em repouso por 15 minutos. Após esse intervalo, 100 µL do conteúdo de cada tubo foram coletados e diluídos 10 vezes com água esterilizada para leitura da D.O. em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores de absorbância foram aplicados à fórmula abaixo para determinação do percentual de floculação.

$$\% \text{ Floculação} = \frac{\text{Valor da D.O Controle} - \text{Valor da D.O Experimental}}{\text{Valor da D. O Controle}} \times 100$$

Foram selecionados para a etapa seguinte os isolados com menores percentuais de floculação em cada amostra analisada.

4.8 Identificação de espécie

Antes de submeter os isolados pré-selecionados ao ensaio de desempenho fermentativo, última etapa do protocolo de seleção de leveduras para produção de bioetanol, as células foram crescidas individualmente em placas de Petri contendo meio ágar YPSac 8% (p/v), a 30 °C por 3 dias. Após esse período, as colônias de cada isolado foram utilizadas na realização de dois testes moleculares a fim de identificá-los como *S. cerevisiae* ou não.

4.8.1 PCR - ITS

A primeira etapa da identificação molecular dos isolados pré-selecionados foi feita através da amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer), que corresponde à região intergênica 5.8S do DNA ribossomal de leveduras, de

acordo com metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2008), com modificações. Para isso, foram utilizados os primers ITS1 (5' GTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCGCTTATTGATATGC 3').

Inicialmente, uma pequena porção de cada colônia-alvo foi solubilizada em 5 µL de água ultrapura contidos em microtubos de 0,2 mL e aquecida em microondas por 5 minutos para o rompimento das membranas celulares. O mesmo procedimento foi feito com parte da colônia da cepa de *S. cerevisiae* BY4741, utilizada como controle positivo. Em seguida, foram adicionados 20 µL de mistura reacional composta por 2,5 µL de tampão 10X; 14,3 µL água ultrapura; 1,0 µL de dNTP 10 mM; 1,0 µL de cada primer e 0,2 µL de enzima Taq DNA polimerase. As etapas da PCR foram configuradas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Programação da PCR para amplificação da região ITS em leveduras.

	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Etapa 1	95 °C	4 minutos	01
Etapa 2	95 °C	1 minuto	
Etapa 3	55 °C	1 minuto	39
Etapa 4	72 °C	2 minutos	
Etapa 5	72 °C	10 minutos	01

Para avaliação do fragmento amplificado, 5 µL do produtos da PCR-ITS foram aplicados em gel de agarose 1% (p/v) juntamente com 5 µL de loading buffer 6X suplementado com corante de DNA Gel Red 10.000X (3 uL/mL). A eletroforese em gel de agarose foi performada em tampão TAE 1X a 120 V por cerca de 40 min, utilizando-se como padrão o marcador de DNA de 1 Kb. A visualização das bandas foi feita sob luz UV e as cepas pré-identificadas como *S. cerevisiae* foram aquelas que apresentaram banda na altura de 880 pb, semelhante à apresentada pelo do controle positivo BY4741.

4.8.2 Digestão Enzimática

Em sequência, as cepas que apresentaram as bandas esperadas na PCR-ITS seguiram para a confirmação de sua identidade através de digestão

enzimática utilizando-se, para isso, a enzima de restrição Hae III. Assim, 11 µL de cada produto da PCR-ITS anteriormente obtido foram adicionados a microtubos de 1,5 mL contendo 9 µL de mistura reacional composta por 2,0 µL de tampão recomendado pelo fabricante da enzima utilizada; 6,3 µL de água ultrapura e 0,7 µL de enzima de restrição supracitada.

Após homogeneização, os tubos foram incubados a 37 °C de um dia para o outro. No dia seguinte, às amostras digeridas foram adicionados 5 µL de loading buffer 6X suplementado com corante de DNA Gel Red 10.000X (3 µL/mL) e os 25 µL resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) em tampão TAE 1X, a 120V por cerca de 40 minutos, utilizando-se como padrão o marcador de DNA de 100 pb. A visualização das bandas foi feita sob luz UV e as cepas identificadas como *S. cerevisiae* foram aquelas que apresentaram o mesmo perfil de bandas apresentado pelo controle positivo BY4741 (OLIVEIRA et al., 2008).

4.9 Desempenho fermentativo

Antes de iniciar o experimento de fermentação propriamente dito, as cepas de leveduras pré-selecionadas, assim como a cepa industrial PE-2 utilizada como controle positivo, foram multiplicadas. Assim, na preparação dos pré-inóculos, cerca de 2 a 3 colônias de cada célula foram crescidas em tubos cônicos de 15 mL contendo 3 mL de meio YP suplementado com 4% (p/v) de sacarose. Os tubos foram incubados sob agitação de 200 rpm, a 30 °C por cerca de 24 horas. Em seguida, os 3 mL de cultura celular foram vertidos tubos cônicos de 50 mL contendo 20 mL do mesmo meio anteriormente utilizado. Os novos tubos foram incubados por mais 24 horas nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, os 23 mL de cultura celular foram vertidos em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio YP suplementado com 8% (p/v) de sacarose. Os frascos foram incubados por mais 24 horas nas mesmas condições anteriores.

Uma vez preparados os pré-inóculos, a D.O. foi mensurada a 600 nm utilizando-se um espectrofotômetro. Cálculos foram realizados para realização do experimento em triplicata e também determinar o volume de cada cultura celular a ser utilizado por tubo de fermentação considerando uma D.O inicial igual a 5. Tal

procedimento garantiu que a mesma quantidade de células fosse utilizada em todos os ensaios.

O ensaio de desempenho fermentativo foi então realizado de acordo com metodologia descrita por VAUGHAN-MARTINI & MARTINI (1988), com modificações. Para isso, o volume de cada cultura celular calculado foi transferido para tubos cônicos de 50 mL, que foram na sequência submetidos à centrifugação por 5 minutos a 3.000 rpm. Após descarte dos sobrenadantes, foi adicionado meio YP suplementado com 15% (p/v) de sacarose, em uma quantidade suficiente para completar 50 mL. Após a devida homogeneização, o conteúdo dos tubos cônicos foi transferido para tubos de fermentação com agitadores magnéticos, esterilizados em autoclave, e *airlocks* previamente esterilizados com etanol 70% (v/v), conforme ilustrado na Figura 8. Uma vez completos, os sistemas de fermentação foram pesados (peso zero) e incubados a 30 °C, com agitação de 120 rpm. A partir desse momento, as pesagens foram feitas de hora em hora durante as primeiras 8 horas de fermentação, bem como nas 3 últimas horas.

Figura 8: Sistema de fermentação completo, utilizado na última etapa da seleção de leveduras.



Fonte: Própria autoria

A produção estimada de etanol foi calculada, através da média das triplicatas, com base na perda de peso durante as 24 horas de fermentação, de

acordo com a fórmula abaixo e a produção de espuma foi mensurada por meio de medição manual com auxílio de uma régua.

$$P_{\text{etanol}} (g/L) = \text{Perda de peso} (g) \cdot [(MM_{\text{etanol}} : MM_{\text{CO}_2}) : \text{Volume final} (L)]$$

Para análise estatística dos resultados de produção estimada de etanol após as 24 h de fermentação, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de significância igual a 5% ($\alpha = 0,05$) utilizando-se o software GraphPad Prisma 6.01. As análises foram realizadas em triplicata e o desvio padrão foi calculado para todos os ensaios.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na produção de álcool combustível, é essencial que os microrganismos envolvidos no processo apresentem determinadas características como, por exemplo, capacidade de permanecer nas dornas de fermentação durante todo o processo e de tolerar variações de temperatura, pH, pressão osmótica, e outros. (DIAS *et al.*, 2011). Com isso, esforços têm sido voltados para a obtenção de cepas de leveduras com fenótipos desejáveis à produção de bioetanol e maior compreensão sobre a prevalência das mesmas, ao longo da safra, dentro das dornas de fermentação das unidades produtoras.

Na usina de bioetanol visitada, foram coletadas 7 amostras obtidas em diferentes momentos do processo produtivo, como pode ser observado na Tabela 2. Após a chegada das mesmas ao laboratório, iniciou-se o procedimento da obtenção das colônias de leveduras isoladas e preparação das placas-mãe. Cabe ressaltar que foi estabelecido um limite máximo de cinco placas-mãe iniciais para cada amostra que apresentou crescimento nessa fase preliminar.

Em relação às amostras coletadas e analisadas, aquela denominada como caldo secundário foi a única obtida antes da etapa de tratamento térmico. A partir dela, foram preparadas 5 placas-mãe como esperado, visto que esta amostra representa a condição antes da esterilização e, portanto, contém microrganismos, inclusive leveduras, advindos da água de lavagem, das moendas e da própria cana-de-açúcar.

Tabela 2: Relação de placas-mãe e isolados por amostra coletada na usina de bioetanol.

Amostra	Quantidade de Placas-mãe	N° de Isolados
Caldo Secundário	05	480
Caldo Filtrado	Sem crescimento	0
Caldo Clarificado	Sem Crescimento	0
Mel	01	15
Mosto	02	159
Creme de Levedo	05	480
Fermento Tratado	05	480

As amostras de caldo filtrado e caldo clarificado foram coletadas em etapas que ocorram após o tratamento térmico e antes da adição de fermento, por isso não apresentaram crescimento de leveduras (Tabela 1). Esse resultado indica que o tratamento térmico foi bastante eficaz para eliminar leveduras provenientes das etapas anteriores, indicando que provavelmente esta não é a origem de cepas desconhecidas que podem estar presentes na dorna de fermentação. Além disso, o nome atribuído a tais amostras pela usina parceira ilustra como o processo produtivo pode variar de uma planta para a outra, pois geralmente o caldo filtrado e clarificado são denominados dessa forma quando obtidos antes do tratamento térmico, conforme pode ser observado na Figura 2 (DIAS *et al.*, 2011).

Muitas usinas produzem açúcar e etanol, outras apenas etanol (NOVACANA, 2024). O mel é um subproduto da produção de açúcar, que é utilizado para a produção de etanol devido a sua alta concentração de açúcares fermentáveis. O melaço tem se tornado cada vez mais importante para o processamento de etanol devido a sua alta disponibilidade e baixo custo (DIAS *et al.* (2011). Entretanto, sua alta concentração de açúcares, cria um ambiente de pressão osmótica elevada, o que explica a obtenção de poucas colônias de leveduras nessa amostra, como demonstrado na Tabela 2.

O mosto é obtido após a concentração de sólidos solúveis ser acertada para 15% (p/v). Essa padronização do teor de açúcares é realizada a partir da mistura do caldo clarificado fervido, que geralmente apresenta 65% (p/v) de açúcares, com parte do caldo clarificado não submetido ao tratamento térmico

(DIAS *et. al.*; 2011). Logo, a obtenção de 159 isolados (Tabela 2) a partir do mosto provavelmente se deve à utilização do caldo não submetido ao tratamento térmico para diluir o caldo clarificado fervido.

As amostras identificadas como creme de levedo e fermento tratado, são amostras concentradas de leveduras obtidas após a fermentação. A diferença entre elas é que a primeira é obtida após a centrifugação empregada para separar o vinho dos microrganismos fermentadores, e a segunda é obtida após o tratamento das leveduras com ácido sulfúrico a fim de combater contaminações bacterianas (DIAS *et al.*, 2011). Logo, era esperado que 5 placas-mãe pudessem ser obtidas a partir de cada uma dessas amostras (Tabela 2).

As placas-mãe confeccionadas foram utilizadas como ponto de partida para todos os ensaios realizados durante a execução do protocolo de seleção de leveduras. As leveduras do gênero *Saccharomyces* não metabolizam manitol e lactose como fonte de carbono, nem mesmo a lisina como fonte de nitrogênio (VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 1993; SANNI & LÖNNER, 1993). Dessa forma, a primeira etapa do protocolo avaliou o crescimento dos isolados em fontes alternativas de carbono (manitol e lactose) e nitrogênio (lisina) para selecionar aqueles que são incapazes de crescer em qualquer uma dessas condições.

Tabela 3: Resultados obtidos na primeira fase de testes, referente a capacidade de crescimento em lisina, manitol e lactose .

Amostras	Colônias Isoladas	Condições Testadas			Aprovados (Sobreposição 1)
		Lisina 0,14%	Manitol 2%	Lactose 2%	
Caldo Secundário	480 (100%)	36	0	5	442 (92,1%)
Mel	15 (100%)	10	4	5	4 (26,6%)
Mosto	159 (100%)	0	0	4	155 (97,5%)
Creme de Levedo	480 (100%)	0	0	18	462 (96,2%)
Fermento Tratado	480 (100%)	1	0	0	479 (99,8%)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, mais de 90% dos isolados obtidos das amostras de caldo secundário, mosto, creme de levedo e

fermento tratado foram pré-selecionados para a próxima etapa. Apenas o mel apresentou um alto percentual de isolados, cerca de 73%, que não pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Este resultado indica que, no caso desta usina, até as leveduras presentes nas etapas antes do tratamento térmico são, majoritariamente, do gênero *Saccharomyces*.

A segunda etapa do protocolo visou selecionar os isolados resistentes às condições estressantes inerentes ao processo de produção de bioetanol como estresse osmótico, térmico, ácido e alcoólico, sendo tais características essenciais para prever a adaptabilidade das cepas no ambiente industrial (CHEN, *et al*; 2024).

Para uma boa fermentação alcoólica a faixa ótima de temperatura está entre 26 a 35 °C, entretanto a levedura *S. cerevisiae* pertence ao grupo de microrganismo mesófilos, cuja faixa ótima de crescimento fica entre os 25 e 30 °C. Uma vez que as temperaturas nas dornas podem alcançar 38 °C, pois favorecem a aceleração da fermentação, esta condição de temperatura mais elevada faz com que as leveduras fiquem mais sensíveis, inclusive ao etanol, podendo levar à produção de metabólitos secundários como glicerol, prejudicando assim rendimento do processo (GÓES-FAVONI *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2001).

Por outro lado, Chieppe Junior (2012) afirma que a temperatura ideal da fermentação está entre 33 a 34 °C, e que nessas condições a levedura se multiplica menos, porém aumenta-se o rendimento do processo. Mesmo com a aplicação de um estresse térmico à 37 °C, observou-se uma boa resistência dos isolados, pois a maior parte deles foi resistente ao estresse. De forma contrária, menos de 50% dos isolados provenientes do mel foram resistentes ao estresse térmico aplicado, sendo este então um dos parâmetros responsáveis pela exclusão de vários candidatos desse grupo (Tabela 4).

O estresse osmótico é caracterizado pela diferença de osmolaridade dos meios intracelular e extracelular. No caso da produção de etanol, esse desequilíbrio osmótico é causado pela presença de açúcar derivado da matéria-prima e da introdução do denominado mel durante a preparação do

mosto. Esse estresse pode comprometer a integridade da levedura, levando a desempenhos inferiores. Assim sendo, a seleção de cepas que sejam mais resistentes a altas concentrações de açúcar proporciona o aumento do potencial de aplicações industriais dessas cepas naturalmente tolerantes (CHEN, *et al*; 2024).

Tabela 4: Resultados obtidos na segunda fase de testes, correspondentes à resistência a diferentes estresses.

Amostras	Colônias Avaliadas	Condições Estressantes Avaliadas							Aprovados (Sobreposição 2)
		37 °C	Gli 33%	Sac 20%	pH 2,5	Etanol 10%	Etanol 15%	Etanol 17%	
Caldo Secundário	442 (92,1%)	425	323	280	158	371	272	58	87 (18,1%)
Mel	4 (26,6%)	7	14	15	2	14	5	1	0 (0,0%)
Mosto	155 (97,5%)	153	159	159	159	159	159	143	149 (93,7%)
Creme de Levedo	462 (96,2%)	480	480	480	2	367	86	21	1 (0,2%)
Fermento Tratado	479 (99,8%)	480	480	480	99	479	273	99	22 (4,6%)

Legenda: Gli = glicose, Sac = Sacarose

De acordo com a Tabela 4, o estresse osmótico simulado com 33% (p/v) e 20% (p/v) de glicose e sacarose, respectivamente, afetou de forma mais significativa os isolados do caldo secundário, enquanto nas outras amostras o efeito dessa condição sobre as leveduras avaliadas foi praticamente nulo. Isso indica que uma cepa de levedura proveniente das etapas iniciais do processamento do bioetanol teria sua viabilidade celular altamente prejudicada pelo estresse osmótico a partir do momento que o caldo fosse submetido ao tratamento térmico e tivesse sua concentração de açúcares significativamente aumentada.

O tratamento do fermento com ácido sulfúrico é crucial, uma vez que a contaminação por bactérias pode ser extremamente prejudicial para a

fermentação do mosto e, conseqüentemente, para a produção de bioetanol. A proliferação de bactérias no meio fermentativo pode inibir o crescimento da levedura e torná-la inviável no processo (DORTA *et al.*, 2006). Assim sendo, após atuarem na fermentação, as cepas de leveduras são tratadas com ácido sulfúrico, sendo mantidas em pH 2,5 por um período de 3 horas para eliminar possíveis contaminantes, e posteriormente são reintroduzidas em novos ciclos de fermentação (GÓES-FAVONI *et al.*, 2018).

Essa permanência em meio ácido prejudica a viabilidade dos microrganismos sensíveis a essa condição (STUPIELLO & HORII, 1981 *apud* DORTA *et al.*, 2006) sendo, portanto, a resistência a pH ácido uma característica desejável e necessária à levedura a ser selecionada. Com exceção dos isolados do mosto, o pH ácido impediu o crescimento de mais de 65% das células provenientes das outras amostras. Esses resultados mostram que o pH ácido é uma condição bastante seletiva e reforça a ideia de que, mesmo com a possibilidade de entrada de leveduras desconhecidas no processo fermentativo, a permanência da mesma ao longo da safra é bastante condicionada à resistência ao pH ácido (Tabela 4).

Outra característica essencial que a levedura a ser selecionada deve apresentar é a capacidade de resistir ao álcool produzido ao longo da fermentação. A inibição do crescimento das células pelo etanol está relacionada à sua capacidade de se alojar na parte hidrofóbica da bicamada fosfolipídica da membrana celular, o que desfavorece a interação entre ácidos graxos e proteínas e prejudica a capacidade de captação de glicose da levedura (MONTEIRO, 2016; BANAT *et al.*, 1998; GÓES-FAVONI *et al.*, 2018). Como era de se esperar, quanto maior a concentração de etanol no meio, maior a inibição do crescimento dos isolados. Essa inibição foi mais significativa no caldo secundário e no creme de levedo, pois os isolados dessas amostras já se mostraram menos resistentes mesmo à menor concentração de etanol testada (10%). Cabe ressaltar que, assim como o pH ácido, a maior concentração de etanol testada (17%) também foi um parâmetro bastante seletivo, capaz de eliminar vários isolados da próxima etapa do protocolo de seleção (Tabela 4).

Considerando o intuito de chegarmos ao final do protocolo de seleção com, no mínimo, 1 isolado por amostra avaliada e que o número de amostras coletadas após o tratamento térmico foi maior que o número de amostras obtidas antes dessa etapa, o rigor aplicado na pré-seleção ao final da segunda etapa foi diferente para o caldo secundário e demais amostras. Assim sendo, seguiram para a terceira etapa do protocolo os isolados do caldo secundário que foram resistentes ao estresse térmico, osmótico, ácido e alcoólico, incluindo desde aqueles resistentes a menor concentração de etanol (10%), devido esta amostra ser a única antes da esterilização, já as demais amostras foram selecionados até os que se mostraram resistentes à maior concentração de etanol testada (17%). Mesmo com essa estratégia, essa etapa de resistência aos estresses inerentes da produção de bioetanol se mostrou altamente seletiva, pois excluiu todos os candidatos do mel, pré-selecionou apenas 1 isolado do creme de levedo e eliminou mais de 70% dos candidatos do caldo secundário e fermento tratado, sendo o mosto a amostra menos afetada nessa etapa (Tabela 4).

Na etapa seguinte, a tolerância ao ácido aconítico, melaço e íons de alumínio foi avaliada. O ácido aconítico é o ácido orgânico predominante na cana-de-açúcar e a resistência a esse composto é crucial, pois ele pode prejudicar a fermentação. Durante esse processo, a presença do ácido aconítico pode aumentar o tempo médio de fermentação e intensificar a floculação (FERMENTEC, 2012).

Uma maneira de remover o ácido aconítico presente na cana-de-açúcar é através da clarificação do caldo, embora apenas 20% desse ácido seja eliminado nesse processo. Outra opção para reduzir a presença desse ácido orgânico no meio envolve a transformação entre suas duas formas: *cis*-aconítico e *trans*-aconítico, sendo apenas a forma *cis* consumida no ciclo de Krebs. Aproximadamente 50% da forma *trans*-aconítica pode ser isomerizada para a forma *cis* quando ocorre um aumento da temperatura e uma redução do pH (FERMENTEC, 2012). No entanto, mesmo após esses processos, o ácido aconítico ainda permanece no processo de produção de biocombustível, o que torna necessária a resistência à essa substância pela levedura a ser empregada. Conforme resultados apresentados na Tabela 5, todos os isolados avaliados

foram resistentes ao ácido aconítico, nas duas concentrações testadas (10 e 20 mM).

Tabela 5: Resultados obtidos na terceira fase de testes, referente à tolerância a diferentes concentrações de ácido aconítico.

Amostras	Colônias Avaliadas	Ác. Aconítico 10 mM	Ác. Aconítico 20 mM
Caldo Secundário	87	87	87
Mosto	149	149	149
Creme de Levedo	1	1	1
Fermento Tratado	22	22	22

As amostras que foram analisadas no presente trabalho foram obtidas em uma usina onde há geração de melaço, pois além de etanol ela também produz açúcar. O mesmo é utilizado na preparação do meio de fermentação devido à quantidade de açúcares fermentescíveis que estão presentes em sua composição, o que o torna um ótimo substrato (HAWAZ *et al.*, 2023). Entretanto, quando adicionado em quantidades excessivas, podem causar elevação na pressão osmótica do mosto, prejudicando o desempenho das leveduras que são adicionadas em seguida, para posterior fermentação. Por essa razão, os isolados foram avaliados quanto à resistência ao melaço a 15 e 30 °Brix. Assim como o ácido aconítico, o melaço não afetou o crescimento dos isolados nas duas concentrações testadas, exceto pelo fato de dois candidatos, um do caldo secundário e outro do fermento tratado, que não toleraram melaço a 30 °Brix (Tabela 6). Tais resultados estão em concordância com aqueles obtidos na etapa anterior, no que diz respeito à resistência ao estresse osmótico (Tabela 4).

Tabela 6: Resultados obtidos na terceira fase de testes, referente à tolerância a diferentes concentrações de melaço.

Amostras	Colônias Avaliadas	Melaço 15 °Brix	Melaço 30 °Brix
Caldo Secundário	87	87	86
Mosto	149	149	149
Creme de Levedo	1	1	1
Fermento Tratado	22	22	21

O alumínio é o metal mais presente nos solos e certas quantidades de íons Al^{3+} se tornam tóxicas para uma série de organismos vivos, incluindo as leveduras. Com isso, a presença desses íons pode levar à inviabilidade das células, devido ao impacto negativo causado nas taxas de brotamento e no conteúdo de trealose, essenciais para a proteção e sobrevivência celular. Além disso, essa presença de alumínio também pode estar relacionada aos efeitos negativos da fermentação (MARIANO-DA-SILVA, S. *et al.* 2016). Embora a toxicidade do alumínio e a relação de tolerância das leveduras a esses íons não ser completamente elucidada, como na produção de etanol as leveduras são reintroduzidas para novas fermentações, alguns estudos sugerem que o alumínio presente pode ser acumulativo, gerando variações nos níveis dos efeitos tóxicos (ANGELONI, 2009; FARIA, 2010).

Tabela 7: Resultados obtidos na terceira fase de testes, referente à tolerância a diferentes concentrações de íon alumínio.

Amostras	Colônias Avaliadas	Al^{3+} 18,5 mM			Al^{3+} 16,3 mM		
		Diluições			Diluições		
		SD	10^{-2}	10^{-4}	SD	10^{-2}	10^{-4}
Caldo Secundário	87	0	0	0	47	9	0
Mosto	149	3	0	0	20	0	0
Creme de Levedo	1	1	0	0	1	0	0
Fermento Tratado	22	20	0	0	20	0	0

Legenda: SD = sem diluição.

Assim sendo, nesta terceira fase, foram testadas duas condições diferentes, para cada concentração de Al^{3+} (16,3 mM e 18,5 mM) a fim de avaliar a tolerância dos isolados a esse íon. Para tanto, as leveduras foram inoculadas nos meios-teste a partir de culturas celulares sem diluição e diluídas a 10^{-2} e 10^{-4} . Os melhores resultados foram obtidos nas condições sem diluição e em uma concentração de 16,3 mM de Al^{3+} , pois uma concentração mais alta de células inoculadas e uma menor concentração de íons Al^{3+} permitiu o crescimento de mais candidatos em todas as amostras avaliadas. Ou seja, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, o efeito de íons alumínio sob a capacidade

de crescimento das leveduras avaliadas foi bastante negativo, principalmente na concentração mais alta testada (18,5 mM).

Diante dos resultados apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7, seguiram para a próxima etapa de seleção 33 isolados (Sobreposição 3), que se mostraram resistentes a todas as concentrações de ácido aconítico e melaço testadas, bem como à presença de íons de alumínio a 18,5 mM (sem diluição) e/ou 16,3 mM (diluição 10^{-2}).

A floculação é um mecanismo de defesa que protege as células em condições adversas. Durante a produção de bioetanol, as leveduras tendem a se agrupar em resposta aos estresses inerentes ao processo, o que é indesejável visto que a diminuição da superfície de contato das células com o meio de fermentação pode gerar perdas no rendimento. Em decorrência da floculação, as células passam a se sedimentar no fundo das dornas, o que também dificulta a conversão do açúcar em etanol e CO_2 , tornando a fermentação mais lenta (LUDWIG, 2001). Além disso, altas taxas de floculação podem causar entupimento das centrífugas e levar à paralisação temporária da produção e, conseqüentemente acarretar prejuízos para a usina (ALVAREZ *et al.*, 2014).

Dessa maneira, pode-se dizer que é de interesse das usinas de bioetanol empregarem leveduras pouco floculantes. Assim, os 33 isolados pré-selecionados foram submetidos à análise qualitativa da floculação, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos na quarta fase de testes, referentes à floculação qualitativa dos isolados pré-selecionados comparativamente às cepas controle LBCM761 e Etanol Red, com floculação muito alta e muito baixa, respectivamente.

Amostra	Colônias avaliadas	Muito Baixa (+)	Baixa (++)	Média (+++)	Alta (++++)	Muito Alta (+++++)
Caldo Secundário	9	2	4	2	1	0
Mosto	3	0	3	0	0	0
Creme de Levedo	1	0	0	0	1	0
Fermento Tratado	20	0	0	6	11	3

Para a classificação das cepas em uma escala de floculação muito baixa a muito alta, foram utilizadas como controles positivo e negativo as cepas laboratorial LBCM761 e industrial Etanol Red, respectivamente. Após observação e avaliação a cada 5 minutos, ao longo de um intervalo de 30 minutos, 16 isolados foram aprovados para a próxima etapa, dos quais 06 com floculação baixa ou muito baixa provenientes do caldo secundário; 03 com floculação baixa oriundos do mosto; 01 com floculação alta do creme de levedo; e outros 06 com floculação média do fermento tratado (Tabela 8). Cabe ressaltar que a seleção de isolados com floculação média ou alta nessa etapa foi feita no intuito de manter pelo menos um representante por amostra.

Uma vez que a qualidade da água utilizada no processo pode influenciar no comportamento das leveduras, os 16 isolados pré-selecionados na etapa anterior foram submetidos à análise quantitativa da floculação por meio de um ensaio que induz a floculação através da presença de íons de cálcio no meio. Os íons de cálcio ativam as floculinas presentes apenas na parede celular das células floculantes, fazendo com que elas interajam com os carboidratos presentes na parede celular das células vizinhas (GOOSSENS & WILLAERT, 2010; SOARES, 2011). Os percentuais de floculação observados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados obtidos na quinta fase de testes, referente à quantificação da floculação dos isolados pré-selecionados comparativamente às cepas controle LBCM761 e Etanol Red.

Amostra	Identificação	% Floculação
Caldo Secundário	C4-1	0,0%
	A7-1	3,7%
	H1-1	4,7%
	G1-1	6,9%
	G2-1	12,5%
	A11-1	16,4%
Mosto	H1 - 3	23,9%
	C9 - 3	24,5%
	H1-2	44,7%
Creme de Levedo	D6 - 3	4,8%

Fermento Tratado	H6 - 3	50,0%
	B7 - 3	50,7%
	A9 - 3	53,3%
	F6-3	56,4%
	G6-3	62,8%
	H8-3	67,3%
Controle Positivo	LBCM761	98,9%
Controle Negativo	Etanol Red	19,3%

A classificação dos isolados, de acordo com o percentual de floculação foi feita da seguinte forma: 0% a 30% considerado floculação baixa, 31% a 60% floculação média e 61% a 100% floculação alta. Com isso, seguiram para a etapa de identificação de espécie os isolados que apresentaram percentual de floculação inferior ou igual a 4,7% do caldo secundário, inferior ou igual a 24,5% do mosto, igual a 4,8% do creme de levedo, e menor ou igual a 53,3% do fermento tratado (Tabela 9).

A fim de identificar os isolados pré-selecionados como *S. cerevisiae*, o material genético dos mesmos foi submetido a uma PCR-ITS e, em seguida, à digestão enzimática com enzima de restrição. Na análise por PCR-ITS, o fragmento amplificado, ITS-5.8S, pertence a uma região intergênica que permite a identificação e diferenciação de microrganismos de interesse, sendo a banda de 880 pb associada à espécie *S. cerevisiae*.

Entretanto, as cepas podem apresentar variabilidade genética ou semelhanças significativas nos padrões de restrição entre diferentes espécies. Portanto, é necessário combinar diferentes abordagens para garantir uma identificação precisa (ARAÚJO *et al.*, 2018). Como pode ser observado nas Figuras 9 e 10, todas as leveduras candidatas apresentaram perfil de bandas idêntico ao controle positivo, cepa BY4741, em ambas as análises moleculares, o que confirma a identificação de todos os isolados pré-selecionados como *S. cerevisiae*.

Figura 9: Identificação de espécie por PCR - ITS, seguida de eletroforese com gel de agarose 1%, sendo Ladder 1 Kb (1); Controle positivo cepa BY4741 (2); Branco (3); H1-3 (4); C9-3 (5); H1-1 (6); C4-1 (7); D6-3 (8); B7-3 (9); H6-3 (10); A9-3 (11) e A7-1(12).

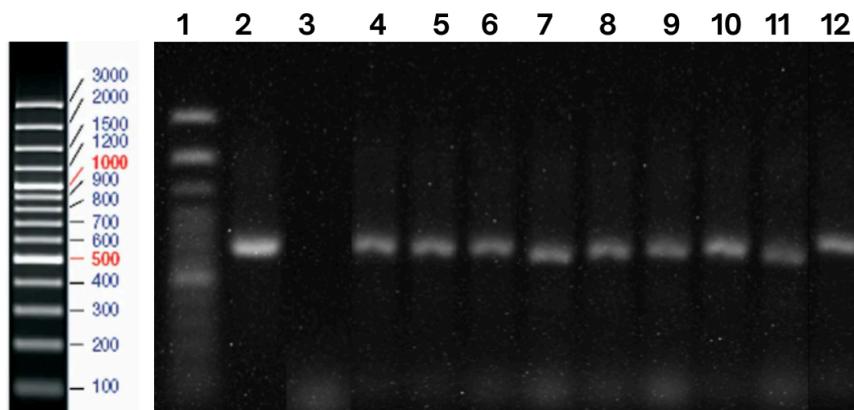
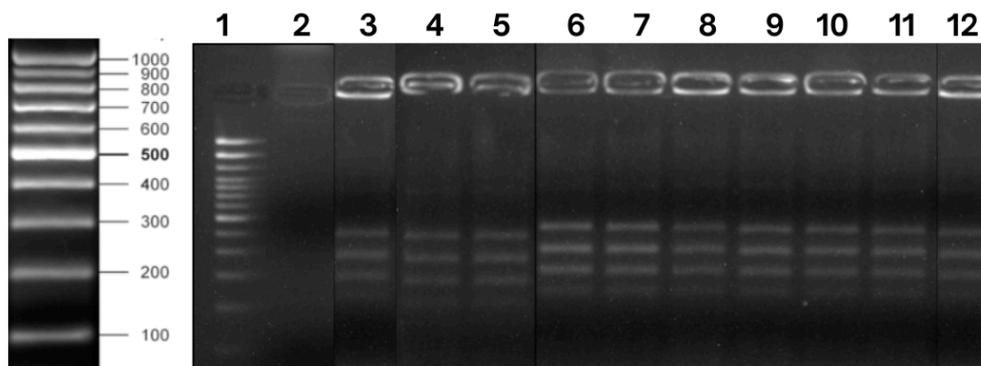


Figura 10: Identificação de espécie por digestão com enzima de restrição Hae III, seguida de eletroforese com gel de agarose 3%, sendo Ladder 100 Pb (1); Branco (2); controle positivo cepa BY4741 (3); H1-3 (4); C9-3 (5); H1-1 (6); C4-1 (7); D6-3 (8); B7-3 (9); H6-3 (10); A9-3 (11) e A7-1(12).

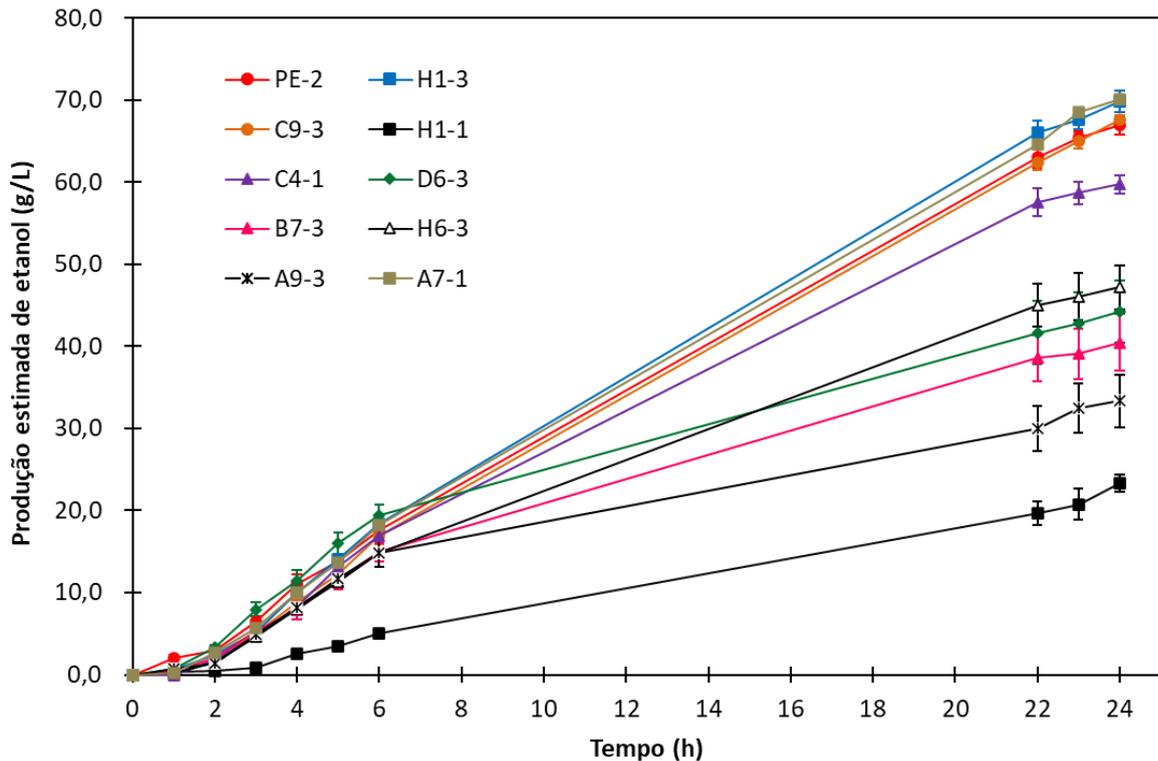


Por fim, as 09 cepas foram submetidas ao ensaio de desempenho fermentativo, no qual foram avaliadas a produção estimada de etanol e de espuma. Os resultados de produção estimada de etanol ao longo de 24 horas de fermentação estão ilustrados na Figura 11.

Considerando que 1 mol de sacarose dá origem à 2 mol de glicose e 2 mol de dióxido de carbono, a produção de etanol ao longo do tempo foi estimada com base na perda de peso, pois os dois produtos dessa reação são formados na mesma proporção e o CO₂ vai sendo perdido à medida que vai sendo gerado. Como pode ser observado na Figura 11, o desempenho fermentativo de 5 cepas pré-selecionadas foi notoriamente inferior ao do controle positivo PE-2 a partir de 8 horas de fermentação, sendo elas: H1-1, A9-3, B7-3, D6-3 e H6-3. As outras 4

cepas (A7-1, C4-1, H1-3 e C9-3), além de não produzirem nenhuma espuma, apresentaram desempenho fermentativo estatisticamente igual ao do controle positivo utilizado. Os valores totais de bioetanol, em g/L, e espuma, em cm, gerados ao final da fermentação estão expressos na Tabela 10.

Figura 11: Produção estimada de etanol ao longo de 24 horas pelas cepas pré-selecionadas e cepa industrial PE-2, utilizada como controle.



Como já mencionado anteriormente, é essencial que a cepa empregada na produção de bioetanol tenha um bom desempenho fermentativo, ou seja, realize a maior conversão de açúcares possível em etanol e CO₂. Considerando que a cepa PE-2 é amplamente empregada na indústria sucroenergética e que a alta taxa de floculação das leveduras é frequentemente associada ao baixo rendimento da produção de bioetanol, foram selecionadas as cepas A7-1, C4-1, H1-3 e C9-3. Além de apresentarem desempenho fermentativo, as duas primeiras, provenientes do caldo secundário, se mostraram muito pouco floculantes (taxas de floculação iguais a 3,7% e 0,0% respectivamente) e as duas últimas, provenientes do mosto, apresentaram taxas de floculação um pouco mais altas (23,9% e 24,5%, respectivamente), mas ainda assim podem ser

consideradas pouco floculantes e bons alvos para aplicação nas usinas de bioetanol (Tabelas 9 e 10).

Tabela 10: Resultados obtidos na sétima fase de testes, referentes à produção estimada de etanol e espuma ao final de 24 horas de fermentação. Os valores de produção de etanol seguidos de uma mesma letra não foram estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Amostra	Identificação	Etanol estimado (g/L)	Espuma (cm)
Controle	Pe-2	66,91 ± 1,11 ^a	0,33
Caldo Secundário	A7 - 1	70,12 ± 0,73 ^a	0
	H1-1	23,31 ± 1,03 ^b	0,5
	C4 - 1	59,73 ± 1,15 ^a	0
Mosto	H1 - 3	69,84 ± 1,27 ^a	0
	C9 - 3	67,61 ± 0,53 ^a	0
Creme de Levedo	D6 - 3	44,19 ± 3,77 ^c	1,7
Fermento Tratado	H6 - 3	47,18 ± 2,63 ^c	0
	B7 - 3	40,46 ± 3,45 ^c	2,5
	A9 - 3	33,35 ± 3,21 ^b	0,97

Por outro lado, todas as cepas candidatas do creme de levedo e fermento tratado apresentaram produção de etanol estatisticamente inferior à do controle PE-2, com alguma produção de espuma na maioria dos casos. Provavelmente, o desempenho fermentativo dessas cepas foi afetado negativamente ao longo da safra, devido ao reciclo de células por meio da lavagem ácida empregada nas usinas. Logo, as quatro cepas selecionadas (A7-1, C4-1, H1-3 e C9-3) são potencialmente capazes de otimizar a produção de etanol e, conseqüentemente, de contribuir para que este biocombustível se torne mais competitivo frente aos combustíveis fósseis.

6. CONCLUSÃO

As cepas de *S. cerevisiae* selecionadas ao final do presente trabalho apresentam características que podem resultar em um melhor rendimento na

produção de etanol, sendo elas: resistência a estresse osmótico, térmico, ácido e alcoólico; tolerância a diferentes compostos que podem estar presentes como ácido aconítico, melão e íons de alumínio; baixa floculação, alta produção de álcool e nenhuma geração de espuma.

Apesar da aplicação do tratamento térmico nas usinas de bioetanol ser indispensável para a redução de contaminações indesejadas, seja por bactérias ou por leveduras, o protocolo de triagem utilizado no presente trabalho se mostrou efetivo para a obtenção de cepas com fenótipos desejáveis para a produção de bioetanol. Além disso, as cepas de *S. cerevisiae* que chegaram na última etapa do protocolo de seleção podem funcionar como elementos-chave para a melhor compreensão da dinâmica microbológica envolvida no processo.

7. PERSPECTIVAS

Por meio do presente trabalho, buscou-se contribuir para uma melhor compreensão e aprofundamento da dinâmica microbiana presente nas dornas de fermentação de bioetanol. A partir do sequenciamento e análise do genoma das cepas finalistas de cada amostra coletada, será possível avaliar a identidade de cada uma e determinar se elas são a mesma cepa, se sofreram mutação ao longo da safra, ou ainda se são cepas invasoras totalmente diferentes da cepa inicialmente utilizada no processo. Considerando a hipótese de serem cepas diferentes uma das outras e em relação ao fermento inicial, o estudo auxiliará na investigação sobre a origem das mesmas e em qual momento elas entraram no processo produtivo de bioetanol.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, F. *et al.* Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 97-104, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024>. Acesso em: 03 jun. 2024.

AMORIM H. V. *et al.* Evolution of Yeast Selection for Fuel Ethanol: breaking paradigms. *In*: DE AZEVEDO, J.; QUECINE, M. (eds) **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham., 2017, p. 391-401. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_17. Acesso em: 02 set. 2024.

AMORIM H. V. *et al.* Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91(5), p.1267–1275, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>. Acesso em: 19 jul. 2024.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, R. S; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – What Has Brazil Learned About Yeasts Inhabiting the Ethanol Production Processes from Sugar Cane? *In*: BERNARDES, M. A. S. (ed) **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. InTech, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/16572>. Acesso em: 02 set. 2024.

ANDRIETTA, M. G. S. *et al.* Bioethanol-Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20073053472>. Acesso em: 02 set. 2024.

ANGELONI, L. H. P. **Bioacúmulo de alumínio e seus efeitos tóxicos na mistura química em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2009.tde-14122009-152802>. Acesso em: 19 jul. 2024.

ANTUNES, F. A. F. *et al.* Biofuel Production from Sugarcane in Brazil. *In*: KHAN, M., KHAN, I. (eds) **Sugarcane Biofuels: Status, Potential, and Prospects of the Sweet Crop to Fuel the World**. Springer, Cham., 2019. cap 5, p. 99-121. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-18597-8_5. Acesso em: 19 jul. 2024.

ARAÚJO, Thalita Macedo *et al.* Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1749-1766, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1063-3>. Acesso em: 02 set. 2024.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>. Acesso em: 02 set. 2024.

BANAT, I. M. *et al.* Review: etanol production at elevated temperatures and alcohol concentration: Part I – Yeast in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, n.6, p.809-821, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1008802704374>. Acesso em: 13 jul.2024.

BARCELOS, A. C. A. **Produção de etanol com uso de leveduras selecionadas em usinas associadas à SIAMIG**. 2021. 52 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021. Disponível em: <http://www.monografias.ufop.br/handle/35400000/3788>. Acesso em: 9 jul. 2024.

BARROS, S. **Brazil: Biofuels Annual**. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, 2022. 42 p. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Biofuels%20Annual_Sao%20Paulo%20ATO_Brazil_BR2022-0047. Acesso em: 19 jul. 2024.

BASSO, L. C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 1155–1163, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>. Acesso em: 02 set. 2024.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-09112009-144530/pt-br.php>. Acesso em: 19 jul. 2024.

CHEN, A. *et al.* Osmotic Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: Implications for Food and Bioethanol Industries. **Food Bioscience**, v. 60, 104451, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104451>. Acesso em: 13 jul.2024.

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Tecnologia e fabricação do álcool**. 2012. 74 f. Caderno elaborado em parceria entre o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás/IFG-Inhumas e a Universidade Federal de Santa Maria para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil – Rede e-Tec Brasil, 2012. Disponível em: https://redeetec.mec.gov.br/images/stories/pdf/eixo_prd_industr/tec_acucar_alcool/161012_tec_fabric_alc.pdf. Acesso em: 22 ago.2024.

CHIU, Y.; WALSETH, B.; SUH, S. Water Embodied in Bioethanol in the United States. **Environmental Science Technology**, v. 43 (8), p. 2688-2692, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es8031067>. Acesso em: 02 set. 2024.

DE FIGUEIREDO, C. M. *et al.* High Foam Phenotypic Diversity and Variability in Flocculant Gene Observed for Various Yeast Cell Surfaces Present as Industrial

Contaminants. **Fermentation**, v. 7 (3):127, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation7030127>. Acesso em: 19 jul. 2024.

DA SILVA-FILHO, E. A. *et al.* Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J. Ind. Microbial. Biotechnol.**, v. 32, n. 10, p. 481-486, 2005. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s10295-005-0027-6>. Acesso em: 02 set. 2024.

DE SOUZA, J. P. *et al.* Improvement of Brazilian bioethanol production – Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process. **Fungal Biology**, v. 122 (6), p. 583-591, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.006>. Acesso em: 18 set. 2024.

DIAS, M. O. S. *et al.* Improving bioethanol production from sugarcane: evaluation of distillation, thermal integration and cogeneration systems. **Energy**, v. 36 (6), p. 3691-3703, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.09.024>. Acesso em: 18 jul. 2024.

DORTA, C. *et al.* Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.177-182, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9016-1>. Acesso em 30 set 2024.

DUARTE, F. T. B. A fermentação alcoólica como estratégia no ensino de transformação química no nível médio em uma perspectiva interdisciplinar. 2014. 192 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ensino de Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Instituto de Física, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2014. Disponível em: http://www.realp.unb.br/jspui/bitstream/10482/17042/4/2014_FlaviaTocciBoeingDuarte.pdf. Acesso em: 26 ago. 2024.

FARIA, F. P. Alumínio: ação tóxica sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o efeito protetor do ácido cítrico e magnésio. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2010. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/217/o/Francys_Pimenta_de_Faria-ALUM_NI_O_A_O_T_XICA_SOBRE_A_LEVEDURAS.pdf. Acesso em: 17 ago 2024.

FERMENTEC. Ácido aconítico. Fermentec News, 2012. Disponível em: <https://fermentecnews.com.br/2012/07/17/acido-aconitico/>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FPA - Frente Parlamentar da Agropecuária. Panorama Setor Sucroenergético, Resumos Executivos, Assuntos Temáticos, 2023. Disponível em: <https://fpagropecuaria.org.br/2023/02/24/panorama-setor-sucroenergetico/#:~:text=O%20setor%20sucroenerg%C3%A9tico%20compreende%20o,em%20a%C3%A7%C3%BAcar%20em%20escala%20global>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GÓES-FAVONI, S. P. *et al.* Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, Companhia Brasileira de Produção Científica, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.004.0023>. Acesso em: 09 set. 2024.

GOOSSENS, K.; WILLAERT, R. Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Lett**, 32, n. 11, p. 1571-1585, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0352-3>. Acesso em: 02 jul 2024.

GUIDINI, C. Z. Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes. 2013. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15069>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HAWAZ, E. *et al.* Optimization of bioethanol production from sugarcane molasses by the response surface methodology using *Meyerozyma caribbica* isolate MJTm3. **Annals of Microbiology**, v. 73, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01706-3>. Acesso em: 29 set 2024.

LEME, R. M.; SEABRA, J. E. A. Technical-economic assessment of different biogas upgrading routes from vinasse anaerobic digestion in the Brazilian bioethanol industry. **Energy**, v. 119, p. 754-766, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.11.029>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LIMA, UA; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Food Science and Technology**, v. 21, p. 63-66, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000100014>. Acesso em: 22 set 2024.

MARIANO-DA-SILVA, S. *et al.* Magnesium capability to attenuate the toxicity of aluminum on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.9415>. Acesso em: 01 jul. 2024.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian Experience of Sugarcane Ethanol Industry. *In*: TOMES, D.; LAKSHMANAN, P.; SONGSTAD, D. (eds) **Biofuels**, Springer, New York, NY., 2009, v. 45, p. 157-172, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7145-6_9. Acesso em: 18 jul. 2024.

MEIRA FILHO, L. G.; MACEDO, I. C. Contribuição do etanol para a mudança climática. *In*: SOUSA, E. L. L.; MACEDO, I. C. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. Luc Projetos de Comunicação,

São Paulo, 2010. cap 3, p. 76 - 97. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefindmkaj/https://unica.com.br/wp-content/uploads/2020/10/etanol-e-bioeletricidade-a-cana-de-acucar-na-matriz-energetica-brasileira.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MEZADRI, H. **Análise poligênica da tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae* por mapeamento de QTL**. 2018. 74 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018. Disponível em: <https://www.repositorio.ufop.br/items/c5d158ff-740a-4e7a-a55f-63b1f9ee5c9f>. Acesso em: 01 jul. 2024.

MONTEIRO, B. M. D. S. **Produção de etanol combustível: efeito da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.11.2016.tde-03022016-154543>. Acesso em: 13 ago 2024.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-4215\(99\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4215(99)00005-1). Acesso em: 19 jul. 2024.

NOVACANA. **As usinas de açúcar e etanol do Brasil**, 2024. Disponível em: https://www.novacana.com/usinas_brasil. Acesso em: 26 ago. 2024.

NOVACANA. **Como é feito o processamento da cana-de-açúcar nas usinas**, 2024. Disponível em: <https://www.novacana.com/noticias/como-e-feito-processamento-cana-de-acucar>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NUNES, T. S.; FINZER, J. R. D. A importância do tratamento do caldo de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 24816-24823, 2019. Disponível em: <http://doi.org/10.34117/bjdv5n11-162>. Acesso em: 19 jul. 2024.

OLIVEIRA, V. A. *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugarcane juice fermentations and their impact in cachaça production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 693- 701, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.01729-07>. Acesso em: 05 ago. 2024.

OLIVEIRA, V. S. *et al.* **Avaliação do desempenho fermentativo de linhagens industriais de *Saccharomyces Cerevisiae* na produção de etanol em meios à base de melaço e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 25 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 2012. Disponível em: <http://tcc.fps.edu.br:80/jspui/handle/fpsrepo/1388>. Acesso em: 26 ago. 2024.

PETROPAVLOVSKIY, A. A., TAURO, M. G., LAJOIE, P., DUENNWALD, M. L. A Quantitative Imaging-Based Protocol for Yeast Growth and Survival on Agar Plates. **STAR Protocols**, v. 1, n. 3, 100182, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100182>. Acesso em: 19 jun. 2024.

REGO-COSTA, A., *et al.* Yeast population dynamics in Brazilian bioethanol production. **G3**, v. 13 (7). p. 1-12, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad104>. Acesso em: 19 jul. 2024.

SANNI, A. I.; LÖNNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 517-523, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1057>. Acesso em: 05 set 2024.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **J Appl Microbiol**, 110, n. 1, p. 1-18, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>. Acesso em: 08 ago 2024.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 113-119, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80255-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80255-9). Acesso em: 21 jul. 2024.

VERMA, N.; KUMAR, V. Microbial conversion of waste biomass into bioethanol: current challenges and future prospects. **Biomass Conv. Bioref.**, v. 13, p. 6419–6456, 2023. Disponível em: <https://doi-org.ez28.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13399-021-01824-z>. Acesso em: 26 ago. 2024.

VICENTE, M. A. *et al.* Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit. **Int J Food Microbiol**. v. 108 (1). p. 51-59, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.018>. Acesso em: 19 jul. 2024.

XIE, S. *et al.* Bioethanol to jet fuel: Current status, challenges, and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 192, 114240, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.114240>. Acesso em: 26 ago. 2024.

WU, B. *et al.* Current status and future prospective of bio-ethanol industry in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 145, 111079, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111079>. Acesso em: 26 ago. 2024.