



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



ANA PAULA VIEIRA DA SILVA

**ANÁLISES CINÉTICAS E MOLECULARES DAS LEVEDURAS DOMINANTES DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM UMA DESTILARIA DE ALAGOAS:
UM ESTUDO DE FINAL DE SAFRA**

Maceió
2025

ANA PAULA VIEIRA DA SILVA

**ANÁLISES CINÉTICAS E MOLECULARES DAS LEVEDURAS DOMINANTES NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM UMA DESTILARIA DE ALAGOAS: UM
ESTUDO DE FINAL DE SAFRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida.

Coorientador: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior.

Maceió
2025

**Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 661

S586a	<p>Silva, Ana Paula Vieira da.</p> <p>Análises cinéticas e moleculares das leveduras dominantes na fermentação alcoólica em uma destilaria de Alagoas : um estudo de final de safra / Ana Paula Vieira da Silva. – 2025.</p> <p>80 f. : il.</p> <p>Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida. Coorientador: Gildemberg Amorim Leal Júnior. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia. Maceió, 2025.</p> <p>Bibliografia: f. 71-80.</p> <p>1. Otimização do processo. 2. Cinética de crescimento. 3. Dinâmica populacional. 4. Caracterização molecular. 5. Seleção de leveduras. I. Título.</p>
	CDU: 663.12

Ana Paula Vieira da Silva

**ANÁLISES CINÉTICAS E MOLECULARES DAS LEVEDURAS
DOMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM UMA
DESTILARIA DE ALAGOAS: UM ESTUDO DE FINAL DE SAFRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 27 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA
Data: 27/02/2025 19:05:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (Orientador - PPGEQ/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR
Data: 28/02/2025 09:10:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior (Coorientador - CECA/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM
Data: 28/02/2025 08:47:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim (PPGEQ/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br ROSANA REIS DE LIMA ARAUJO
Data: 27/02/2025 20:08:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. Rosana Reis de Lima Araújo (IFPE)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo livre arbítrio, e pela oportunidade da vida em Jesus Cristo, pois O busco e sigo em cada ação e pensamento, pela saúde e força incondicional, e pela companhia, amor, misericórdia e perseverança que me fazem percorrer cada passo desta longa jornada com confiança e fé.

Aos meus pais, Maria José e Paulo (in memoriam) pelo amor incondicional e ensinamentos.

Ao meu esposo Márcio pelo companheirismo e amor.

Aos meus filhos Márcio Henrique e João Vitor, por serem a razão para eu continuar acreditando.

Ao meu irmão Alexandre pelo exemplo de superação.

Às minhas irmãs Alessandra, Aline e Adriana pela infância maravilhosa.

Ao meu sogro Elizeu e à minha sogra Telma, por serem tão prestativos, serei grata.

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), através do Centro de Tecnologia- CTEC, e ao PPGEQ pela oportunidade de cursar o Mestrado, e ao Campus de Ciências Agrárias (CECA) pela oportunidade de desenvolver a pesquisa de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À professora Dra. Renata M. Rosas pela orientação e aprendizado.

Ao professor Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, pela orientação e aprendizado, sempre buscando incansavelmente compartilhar o conhecimento.

A todos os professores do PPGEQ pelo aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia do CECA, Sheila, Lucas, Gabriela, Rafaela, a todos o meu muito obrigado.

Aos amigos do LTBA, a técnica Elísia, a todos agradeço imensamente.

Ao Professor Gaus Silvestre pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

À grande amiga Jumelice, pelo auxílio diário na coleta e organização das amostras coletadas.

Ao Engenheiro Químico Edmilso Felismino da usina Santa Clotilde, por ceder gentilmente as amostras estudadas.

Aos Membros da Banca Prof. Dr. Eduardo Lucena e a Prof. Dra Rosana por terem aceitado o convite e contribuírem de maneira significativa como examinadores deste trabalho.

Aos amigos, que de alguma maneira, contribuíram para minha chegada até aqui. Às pessoas que são inspiração por acreditar que para melhorar o mundo, devemos ser melhores em tudo. Amigos e amigas, gratidão a todos!!!

**“Porque sou eu que conheço os
planos que tenho para vocês, diz
o Senhor, planos de fazê-los
prosperar e não de lhes causar
dano, planos de dar-lhes
esperança e um futuro”**

(Jeremias 29:11)

RESUMO

As leveduras dominantes em destilarias apresentam alta adaptabilidade e resistência ao etanol e contaminantes, sendo amplamente utilizadas em processos fermentativos. No entanto, sua permanência ao longo da safra é questionada. Este estudo investigou as leveduras predominantes durante os últimos dez dias da safra 2023/2024 na usina Santa Clotilde (Rio Largo, Alagoas). Foram coletadas amostras de duas dornas diárias, no início (1-2h) e no final da fermentação (8h), analisando-se Brix, pH e viabilidade celular. O isolamento de colônias em meio WLN revelou 40 estirpes, das quais 35 foram recuperadas após reativação. O plaqueamento em meio Nagai identificou 10 colônias deficientes respiratórias e 12 isolados mistos, incluindo a linhagem de referência CAT-1, que apresentou características normais. A extração de DNA das 35 colônias predominantes e da levedura inicial da safra possibilitou a análise genética por PCR, utilizando os primers NL1 e NL4 para amplificação da região D1/D2 do gene 26S. Paralelamente, foi avaliada a permanência ou substituição da cepa personalizada introduzida no início da safra, além de variações moleculares e metabólicas, utilizando os oligonucleotídeos Delta 12, Delta 21, YLL021WR, YLL021WF e (GTG)₅. A capacidade fermentativa foi testada por meio do método de tubos múltiplos com mostos de melaço (MM15), caldo de cana (MCC12) e sacarose (YPSac10), comparando-se com a cepa referência CAT-1 e a levedura de injeção C1. Seis morfotipos apresentaram desempenho superior, sendo selecionados para a avaliação cinética. Destes, quatro isolados apresentaram rendimento superior à cepa referência CAT-1 e à cepa C1 introduzida no início da safra. A avaliação cinética determinou a taxa específica de crescimento celular por absorbância. Os resultados das análises moleculares indicaram variações detectáveis entre os isolados predominantes. As análises com os oligonucleotídeos Delta 12 e Delta 21 revelaram padrões distintos entre os isolados e a cepa de referência. O marcador (GTG)₅ apontou polimorfismos significativos, enquanto YLL021WR e YLL021WF confirmaram diferenças entre os perfis genéticos das cepas analisadas. A amplificação da região D1/D2 com NL1/NL4 demonstrou a diversidade genética presente ao longo do final da safra. Os resultados indicaram a substituição parcial da cepa inicial por variantes ambientais, evidenciando o impacto das condições estressantes do final da safra na dinâmica populacional das leveduras. A identificação de estirpes com maior desempenho fermentativo sugere a possibilidade de otimizar a produção de etanol, promovendo maior eficiência e sustentabilidade no processo.

Palavras-chave: Otimização do Processo. Cinética de Crescimento. Dinâmica Populacional. Caracterização Molecular. Seleção de leveduras.

ABSTRACT

The dominant yeasts in distilleries are highly adaptable and resistant to ethanol and contaminants, and are widely used in fermentation processes. However, their permanence throughout the harvest is questioned. This study investigated the predominant yeasts during the last ten days of the 2023/2024 harvest at the Santa Clotilde mill (Rio Largo, Alagoas). Samples were taken from two vats a day, at the beginning (1-2h) and end of fermentation (8h), and Brix, pH and cell viability were analyzed. Isolation of colonies in WLN medium revealed 40 strains, of which 35 were recovered after reactivation. Plating on Nagai medium identified 10 respiratory deficient colonies and 12 mixed isolates, including the reference strain CAT-1, which showed normal characteristics. DNA extraction from the 35 predominant colonies and the initial yeast from the harvest enabled genetic analysis by PCR, using primers NL1 and NL4 to amplify the D1/D2 region of the 26S gene. At the same time, the permanence or replacement of the customized strain introduced at the beginning of the harvest was assessed, as well as molecular and metabolic variations, using the oligonucleotides Delta 12, Delta 21, YLL021WR, YLL021WF and (GTG)₅. Fermentation capacity was tested using the multiple tube method with molasses must (MM15), sugarcane juice (MCC12) and sucrose (YPSac10), compared to the reference strain CAT-1 and the injection yeast C1. Six morphotypes showed superior performance and were selected for kinetic evaluation. Of these, four isolates showed higher yields than the CAT-1 reference strain and the C1 strain introduced at the start of the harvest. The kinetic evaluation determined the specific cell growth rate by absorbance. The results of the molecular analyses indicated detectable variations between the predominant isolates. Analyses with the Delta 12 and Delta 21 oligonucleotides revealed distinct patterns between the isolates and the reference strain. The (GTG)₅ marker indicated significant polymorphisms, while YLL021WR and YLL021WF confirmed differences between the genetic profiles of the strains analyzed. Amplification of the D1/D2 region with NL1/NL4 demonstrated the genetic diversity present at the end of the harvest. The results indicated that the initial strain was partially replaced by environmental variants, showing the impact of the stressful conditions at the end of the harvest on the population dynamics of the yeasts. The identification of strains with greater fermentation performance suggests the possibility of optimizing ethanol production, promoting greater efficiency and sustainability in the process.

Keywords: Process optimization. Growth kinetics. Population Dynamics. Molecular characterization. Yeast selection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de Fermentação Alcoólica: etapas e fatores.....	22
Figura 2 - Ciclo da eficiência fermentativa.....	26
Figura 3 – Fatores que influenciam a produção de etanol.....	28
Figura 4 – Sequência dos experimentos: da amostragem às análises genéticas.....	32
Figura 5 – Caracterização e porcentagem das estirpes isoladas.....	41
Figura 6 – Resultados de viabilidade e brotamento para as contagens realizadas com as amostras coletadas.....	44
Figura 7 – Visualização das colônias formadas em meio Nagai.....	49
Figura 8 – Extração de DNA dos 36 morfotipos selecionados em gel de agarose 0,8%.....	58
Figura 9 - Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras predominantes com o primer (GTG) ₅ . Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.	59
Figura 10 - Perfis de amplificação inter-delta das cepas de leveduras predominantes com os primers Delta 12 e Delta 21. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.....	63
Figura 11 - Amplificação das cepas de leveduras predominantes com os primers YLL021WR e YLL021WF. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.....	64
Figura 12 - Amplificação das cepas de leveduras predominantes com os primers NL1 e NL4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagens dos isolados discriminadas nas amostras coletadas.....	46
Tabela 2 - Avaliação qualitativa dos isolados em meio Nagai.....	48
Tabela 3 - Capacidade Fermentativa (CF) dos morfotipos predominantes em diferentes meios.....	52
Tabela 4 - Fingerprint gerado pela visualização dos padrões de banda do primer (GTG) ₅ em gel de eletroforese.....	54
Tabela 5 – Fingerprint gerado pela visualização dos padrões de banda pelos primers Delta 12 e Delta 21 em gel de agarose 1,5%.....	56
Tabela 6 – Morfotipos com os seus respectivos valores de: $\mu_{\text{máx.}}$, coeficiente de correlação (R^2), taxa de duplicação, morfologia e porcentagem de predominância.....	60
Tabela 7 - Fingerprint gerado pela visualização dos padrões de banda pelos primers Delta 12 e Delta 21 em gel de agarose 1,5%.....	61
Tabela 8 - Morfotipos com os seus respectivos valores de: $\mu_{\text{máx.}}$, coeficiente de correlação (R^2), taxa de duplicação, morfologia e porcentagem de predominância.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Açúcares Redutores totais.
CAT-1	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proveniente da Usina de Catanduva (São Paulo), utilizada industrialmente.
CTAB	Reagente (cetiltrimetilamonio brometo) com a função de detergente utilizado para liberação dos componentes celulares no tampão de extração de DNA.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (agente quelante).
G	Unidade padrão de Força centrífuga relativa (do inglês RCF - Força exercida durante a centrifugação) ou força gravitacional (Força G).
(GTG) ₅	Oligonucleotídeo utilizado como iniciador numa reação de PCR, amplificando a região ISSR.
ISSR	Sequências Simples entre Repetições de DNA.
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA.
WLN	Meio de cultura diferencial Wallerstein Laboratory Nutrient ágar.
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVO GERAL.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Processo industrial de fermentação alcoólica.....	22
3.2 Matérias-primas utilizadas no processo fermentativo.....	23
3.3 Processos industriais de condução da fermentação alcoólica.....	24
3.4 Influência do pH no processo fermentativo.....	24
3.5 O papel das leveduras na fermentação alcoólica: reprodução, metabolismo e aplicações.....	25
3.6 Eficiência fermentativa e a produção de etanol.....	25
3.7 Leveduras e sua importância no processo etanólico.....	27
3.8 Floculação e o processo de fermentação alcoólica.....	28
3.9 Contaminação bacteriana e sua relevância no processo fermentativo industrial....	29
3.10 Reutilização do fermento e suas implicações no processo.....	29
3.11 Leveduras com alto potencial fermentativo.....	30
3.12 Adaptação e Evolução de Linhagens de Leveduras Industriais.....	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Amostragem e obtenção de linhagens de leveduras industriais e análise da diversidade macro morfológica.....	32
4.2 Obtenção dos morfotipos oriundos da diversidade e estudos morfofisiológicos.....	33
4.3 Contagem, isolamento e purificação das colônias.....	33
4.3.1 Morfologia da diversidade populacional de leveduras.....	33
4.3.2 Manutenção das linhagens.....	34
4.4 Identificação de colônias mutantes respiratórias.....	34
4.5 Determinação do Brix e pH.....	34
4.6 Teste de capacidade fermentativa.....	35
4.7 Extração de DNA.....	36
4.7.1 Amplificação dos fragmentos de DNA por meio de microssatélites (GTG)₅.....	37
4.7.2 Amplificação dos fragmentos de DNA por primers inter-delta.....	37
4.7.3 Amplificação dos fragmentos de DNA por YLL021WF e YLL021WR.....	38
4.7.4 Amplificação dos fragmentos de DNA por NL1 e NL4	38
4.8 Cinética de crescimento celular.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Amostragem e obtenção dos morfotipos oriundos da diversidade e estudos morfofisiológicos.....	41
5.2 Análise microbiológica das amostras coletadas.....	43
5.3 Identificação de colônias mutantes respiratórias.....	47
5.4 Teste de capacidade fermentativa.....	51
5.5 Extração de DNA.....	57
5.5.1 Amplificação dos fragmentos de DNA por meio de microssatélites (GTG)₅.....	59

5.5.2 Amplificação dos fragmentos de DNA pelos primers Delta 12 e Delta 21.....	61
5.5.3 Amplificação dos fragmentos de DNA por YLL021WR e YLL021WF.....	62
5.5.4 Amplificação dos fragmentos de DNA pelos primers NL1 e NL4.....	65
5.6 Cinética de crescimento dos isolados predominantes.....	67
6 CONCLUSÃO.....	69
7 TRABALHOS FUTUROS.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2023/2024 registrou 713,2 milhões de toneladas, com uma produção de 35,61 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2024), consolidando o Brasil como um dos líderes globais na produção de biocombustíveis. O país responde por aproximadamente 30% do volume total de etanol produzido mundialmente, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, que representam cerca de 50% da produção global. Apesar de dominarem o mercado, Brasil e Estados Unidos possuem sistemas produtivos distintos. Nos Estados Unidos, a principal matéria-prima é o milho, enquanto no Brasil, o etanol é majoritariamente derivado da cana-de-açúcar, conferindo diferenças significativas na eficiência energética e na sustentabilidade do processo produtivo, sendo a cana-de-açúcar mais vantajosa (Goldemberg, 2007; Sanderson, 2006).

Além disso, o etanol brasileiro apresenta vantagens ambientais, gerando quase três vezes menos emissões de gases de efeito estufa ao longo de seu ciclo de vida completo, em grande parte devido ao uso de fontes de energia renováveis no processo produtivo, como biomassa de eucalipto, bagaço e palha de cana (Macedo; Seabra; Silva, 2008). Estudos mais recentes indicam que os avanços tecnológicos e a otimização dos processos industriais têm reduzido ainda mais o impacto ambiental do etanol de cana, reforçando seu papel como alternativa sustentável aos combustíveis fósseis (Moreira; Schmidt; Freitas, 2023).

O programa RENOVABIO, instituído pela Lei nº 13.576/2017, estabelece uma política voltada à redução das emissões de carbono no setor de combustíveis por meio da definição de metas anuais nacionais. Seu principal mecanismo é a valorização da redução de carbono por meio da comercialização de Créditos de Descarbonização (CBIOs). Com essa abordagem, busca-se incentivar tanto a produção quanto o uso de biocombustíveis na matriz energética de transportes do Brasil, promovendo uma transição para um modelo mais sustentável (ANP, 2024).

A produção de etanol de milho no Brasil teve início na safra 2012/2013, com o advento de uma planta industrial operando no modelo flex, e estrutura para a produção de etanol usando cana e milho na mesma unidade industrial (Neves, 2021), e tem se estabelecido no decorrer dos anos, registrando na safra 2023/2024, um crescimento de 33,1% em relação à safra anterior (CONAB, 2024).

Apesar do crescimento da produção do etanol de milho, a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar destaca-se pela sua eficiência, pois retém 93% da energia original encontrada

no açúcar (Amorim et al., 2011). Essa alta retenção de energia, combinada com a absorção do CO₂ pelas culturas de cana-de-açúcar através da fotossíntese, faz do bioetanol um combustível líquido limpo e de excelente qualidade. Embora o papel da levedura seja determinante na produção de etanol, o etanol não é produzido para benefício próprio, mas sim como um subproduto do processo de produção de energia individual (Watanabe, 2023).

Em suma, a produção de etanol em larga escala através da fermentação alcoólica é significativa pelo seu potencial para contribuir para mitigar as alterações climáticas e reduzir a dependência do petróleo (Carmona-Gutierrez et al., 2012). Nesse contexto, a biotecnologia industrial representa a maior de todas as biotecnologias globais, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o principal microrganismo industrial do mundo (Walker G.; Walker R., 2018). A investigação e o desenvolvimento em curso neste domínio, incluindo a seleção de novas estírces de leveduras e a engenharia genética, visam otimizar o processo, aumentando a eficiência e sustentabilidade da produção de bioetanol (Amorim et al., 2011; Zazulya et al., 2020).

Assim, a otimização das condições de fermentação e o aprimoramento dos processos de pré-tratamento da biomassa constituem áreas de pesquisa determinantes para o aperfeiçoamento da produção de bioetanol. A incorporação de tecnologias avançadas, como a biologia sintética e a engenharia metabólica, apresenta oportunidades promissoras para incrementar o rendimento e a qualidade do etanol produzido. Tais inovações não apenas impulsionam a indústria do bioetanol, mas também contribuem significativamente para o progresso da biotecnologia industrial e para o desenvolvimento de soluções sustentáveis frente aos desafios energéticos globais.

A aplicação de cepas de leveduras adaptadas ao processo sucroalcooleiro tem sido fundamental para melhorar a eficiência da produção de bioetanol, especialmente no Brasil e nos Estados Unidos, que juntos são responsáveis por cerca de 85% da produção global (Jacobus et al., 2021). No Brasil, cepas de leveduras industriais como PE-2 e CAT-1, isoladas do próprio processo fermentativo, foram responsáveis por quase 60% da produção total de etanol no país (Souza, 2017). Essas cepas apresentam características genéticas e fisiológicas que as tornam bem adaptadas às condições estressantes do processo, como alta concentração de etanol, estresse osmótico e reciclagem celular prolongada (Antonangelo et al., 2013).

Estudos recentes têm identificado genes e traços importantes para a persistência e dominância dessas cepas no processo não asséptico brasileiro (Jacobus et al., 2021). Apesar da importância da invertase na fermentação da sacarose, apenas duas das cepas industriais analisadas apresentaram amplificação dos genes que codificam essa enzima (Kretzer, 2023).

Desta forma, a seleção e caracterização de cepas de leveduras adaptadas ao processo sucroalcooleiro continua sendo um desafio importante para a indústria de bioetanol (Souza, 2017). A alta diversidade genética observada entre as cepas nativas de *S. cerevisiae* oferece novas perspectivas para o uso de cepas autóctones com características industriais desejáveis como culturas iniciadoras em usinas de bioetanol (Antonangelo et al., 2013; Grellet et al., 2022).

Portanto, a caracterização cinética e molecular das leveduras dominantes, especialmente nos períodos finais da safra, é utilizada para garantir a continuidade da produção em níveis ótimos. Estudos recentes destacam a importância da seleção de cepas adaptadas às condições específicas de cada destilaria, considerando fatores como temperatura, pH e presença de contaminantes, para otimizar a produtividade e a qualidade do etanol produzido (Dantas; Giacomini, 2023).

A compreensão detalhada das características morfológicas, cinéticas e moleculares das leveduras predominantes no final da safra é indispensável para a otimização do processo fermentativo em destilarias. Alterações na composição das populações de leveduras podem afetar diretamente a eficiência e a qualidade da produção de etanol.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo identificar e avaliar as estirpes predominantes na fermentação alcoólica, seu impacto na qualidade do processo fermentativo e produção de etanol, durante o final da safra em uma destilaria de Alagoas, visando otimizar a eficiência e sustentabilidade da produção, através da avaliação e quantificação morfológica das colônias de levedura predominantes isoladas de uma fermentação alcoólica, avaliação de mutantes respiratórios, capacidade fermentativa, cinética de crescimento celular, além da avaliação da presença de polimorfismo genético nas colônias predominantes.

2 OBJETIVOS GERAIS

Identificar e avaliar as leveduras predominantes na fermentação alcoólica, seu impacto na qualidade do processo fermentativo e produção de etanol, durante o final da safra em uma destilaria de Alagoas, visando otimizar a eficiência e sustentabilidade da produção.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar, quantificar morfológicamente, e isolar as colônias dominantes de cada amostra coletada.

Avaliar os isolados quanto à mutação respiratória.

Avaliar a capacidade fermentativa dos isolados.

Avaliar a presença de polimorfismo genético nos isolados predominantes.

Realizar a cinética de crescimento celular.

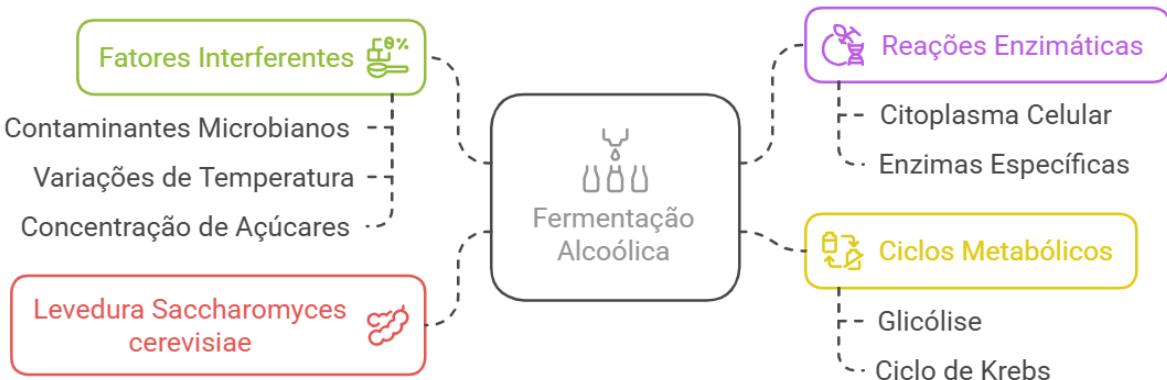
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Processo industrial de fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é tida como a ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. Biologicamente, é um processo em que a energia formada por reações de oxidação parcial pode ser direcionada para a multiplicação de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose para produção de álcool e gás carbônico (Lima; Marcondes, 2002). O processo de produção de álcool combustível no Brasil utiliza a sacarose na forma de caldo de cana ou melaço diluído como substrato para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, resultando em alta produção de etanol.

A conversão do açúcar em etanol e CO₂ envolve 12 reações em sequência ordenada, onde há uma enzima específica para cada reação, sendo possível sofrer a ação de variados fatores, e dessa maneira, podem afetar o desempenho do processo (Amorim; Basso; Alves, 1996; Papin, 2024). Tal aparato enzimático encontra-se confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que ocorre a fermentação alcoólica (Lima; Basso; Amorim, 2001). A Figura 1 faz uma síntese das etapas e fatores que envolvem a fermentação alcoólica.

Figura 1 - Processo de Fermentação Alcoólica: etapas e fatores.



Fonte: A Autora, 2025.

O processo de biotransformação, onde as leveduras quebram os açúcares solúveis em moléculas menores, apresenta dois ciclos, e um deles é a glicólise, que age rompendo a molécula de glicose até ácido pirúvico, por meio de uma sequência de reações catalisadas por enzimas e situadas na parede celular e interior da célula (Salvato, 2010). Na ausência de

oxigênio, há uma tendência para a laboração das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, fornecendo etanol e água partindo do ácido pirúvico, enquanto na presença de oxigênio ocorre um deslocamento reacional, onde parte do ácido pirúvico é transposto para o Ciclo de Krebs, e haverá oxidação a dióxido de carbono e água (Tosetto, 2008).

Possíveis interferências no processo fermentativo incluem a presença de contaminantes microbianos, variações na concentração de açúcares, temperatura inadequada, pH desregulado e baixa qualidade da levedura utilizada (Souza; Almeida; Santos, 2023). Esses fatores podem diminuir a eficiência do processo e reduzir o rendimento do etanol. Dentre os fatores citados, o substrato utilizado constitui fator chave no sucesso ou declínio da fermentação alcoólica, pois o agente fermentativo produzirá o etanol a partir da absorção e utilização do mesmo. Diante disso, é fundamental o controle rigoroso e acompanhamento das condições do processo fermentativo para maximizar a produção de etanol e reduzir as interferências negativas.

3.2 Matérias-primas utilizadas no processo fermentativo

Os substratos utilizados na fermentação são carboidratos que tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio e a trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura de maneira externa (Lima; Basso; Amorim, 2001). De acordo com Macedo (1993), as matérias-primas que podem ser utilizadas para produção de etanol se classificam em 3 grandes grupos: açucaradas (direta ou indiretamente fermentescíveis), amiláceas e celulósicas (indiretamente fermentescíveis).

Atualmente, destaca-se o uso de biomassa lignocelulósica como matéria-prima promissora para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que utiliza resíduos agrícolas, florestais e industriais, contribuindo para a sustentabilidade do processo (Silva; Pereira; Costa, 2022). Além disso, o milho e a beterraba também têm ganhado espaço no cenário industrial, especialmente em regiões onde a cana-de-açúcar não é viável (Martins; Oliveira, 2023).

Assim, a seleção da matéria-prima não apenas influencia o rendimento da fermentação, mas também determina as estratégias industriais adotadas para otimizar a conversão dos substratos em etanol, assim como os processos industriais de condução da fermentação alcoólica, e as metodologias empregadas para maximizar a eficiência e a produtividade do etanol.

3.3 Processos industriais de condução da fermentação alcoólica

Os processos fermentativos podem ser classificados em três categorias principais: batelada, batelada alimentada e contínuo (Faria; Lopes; Mendes, 2024). No processo em batelada, todo o substrato é adicionado no início, e a fermentação ocorre sem adição adicional, sendo ideal para produções menores e maior controle do processo (Almeida; Souza, 2022). Já o processo em batelada alimentada permite a adição gradual de substrato, o que possibilita maior controle da taxa de fermentação e reduz a inibição por substrato (Silva; Pereira, 2022). O processo contínuo, por sua vez, oferece alta produtividade ao manter a adição constante de substrato e a retirada contínua do etanol produzido (Costa; Martins, 2023).

Para maximizar a eficiência e a produtividade do etanol, metodologias como o controle rigoroso de temperatura, pH, aeração e a utilização de leveduras geneticamente modificadas têm sido amplamente adotadas (Moura; Carvalho; Gomes, 2024). Além disso, a utilização de sistemas de reciclagem de leveduras e a otimização do tempo de residência do mosto fermentativo contribuem para maior estabilidade do processo (Santos; Lima, 2023). Dessa forma, a escolha do processo fermentativo adequado e a aplicação das melhores metodologias garantem maior eficiência na produção de etanol, assim como variáveis como o pH tem influência no processo fermentativo, impactando o metabolismo das leveduras e o rendimento do processo.

3.4 Influência do pH no processo fermentativo

De acordo com Batista (2005), devido a um número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, vários fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais, orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem, concentração da levedura, contaminação bacteriana) prejudicam o rendimento da fermentação, então ocorre uma redução na eficiência da conversão de açúcar em etanol. Enquanto o pH do meio deve ser mantido entre 4 e 5 para favorecer a produção de etanol, um meio com pH menor que 4 pode favorecer a produção de álcoois superiores e um meio com pH maior que 5 favorece a produção de furfural e ácido acético. Além disso, o estabelecimento do pH abaixo de 5 afeta diretamente o rendimento da fermentação alcoólica ao prevenir a contaminação bacteriana (Veloso, 2019).

Estudos recentes indicam que a regulação do pH não apenas influencia a atividade enzimática das leveduras, mas também afeta a viabilidade celular e a eficiência do processo fermentativo (Silva; Rodrigues; Mendonça, 2023). A manutenção adequada do pH evita a

formação de metabólitos indesejáveis e melhora a conversão de açúcares em etanol, resultando em uma fermentação mais eficiente (Costa; Freitas, 2024), pois os agentes fermentativos utilizados no processo, são afetados por valores de pH diferente de sua faixa de atuação (4,5 a 5,5) a depender da espécie de leveduras, suas características, e características do processo para a produção eficiente de etanol.

3.5 O papel das leveduras na fermentação alcoólica: reprodução, metabolismo e aplicações

Leveduras são fungos unicelulares que, na maioria das vezes, se reproduzem vegetativamente por brotamento. Uma célula de levedura é capaz de gerar de 15 a 25 brotos ao longo da vida. Quanto ao envelhecimento celular de leveduras, a literatura cita a idade replicativa e idade cronológica (Reverter-Branchat, 2004). O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses essenciais à manutenção da vida, crescimento e multiplicação (Lima; Basso; Amorim, 2001).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada devido à sua alta tolerância ao etanol e eficiência na conversão de açúcares em etanol (Silva; Mendonça; Freitas, 2023). Recentemente, o uso de leveduras geneticamente modificadas tem sido explorado para aumentar a produtividade e a robustez do processo fermentativo (Costa; Souza, 2024).

Dessa forma, a escolha do agente fermentativo adequado impacta diretamente a eficiência do processo e a produção de etanol. No próximo tópico, será discutida a eficiência fermentativa e como diferentes fatores influenciam a produtividade do etanol.

3.6 Eficiência fermentativa e a produção de etanol

De modo geral, quedas na eficiência fermentativa sucedem de uma alteração na estequiometria do processo, em que os produtos secundários são produzidos em maior quantidade (sobretudo glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa (Lima; Basso; Amorim, 2001). Com a redução na produção de etanol, as reações secundárias reduzem o rendimento teórico da fermentação, conhecido como rendimento Pasteur, que cai para um máximo de 95% sobre 0,511 g/g de ART. Naturalmente, quando há deficiência de nutrientes, as leveduras entram em

processo de meiose para formar esporos haplóides, os quais germinam quando as condições se tornam favoráveis (Batista, 2005).

A eficiência fermentativa está diretamente relacionada à capacidade das leveduras de manterem um metabolismo equilibrado, mesmo sob condições de estresse, como variações de pH, temperatura e alta concentração de etanol (Silva; Mendonça; Freitas, 2023). Estratégias como a suplementação nutricional adequada e o uso de leveduras adaptadas têm mostrado potencial na maximização do rendimento fermentativo (Costa; Souza, 2024). Na Figura 2, é possível visualizar a eficiência fermentativa e seus desdobramentos no processo.

As características fisiológicas das leveduras, como a capacidade de tolerar altos níveis de etanol e a eficiência na assimilação de diferentes açúcares, impactam diretamente a produtividade do processo (Martins; Oliveira, 2023). Leveduras com maior resistência ao estresse oxidativo, por exemplo, apresentam menor produção de subprodutos indesejáveis e maior eficiência na conversão de açúcares em etanol (Santos; Lima, 2024).

Figura 2 - Ciclo da Eficiência Fermentativa.



Fonte: A Autora, 2025.

3.7 Leveduras e sua importância no processo etanólico

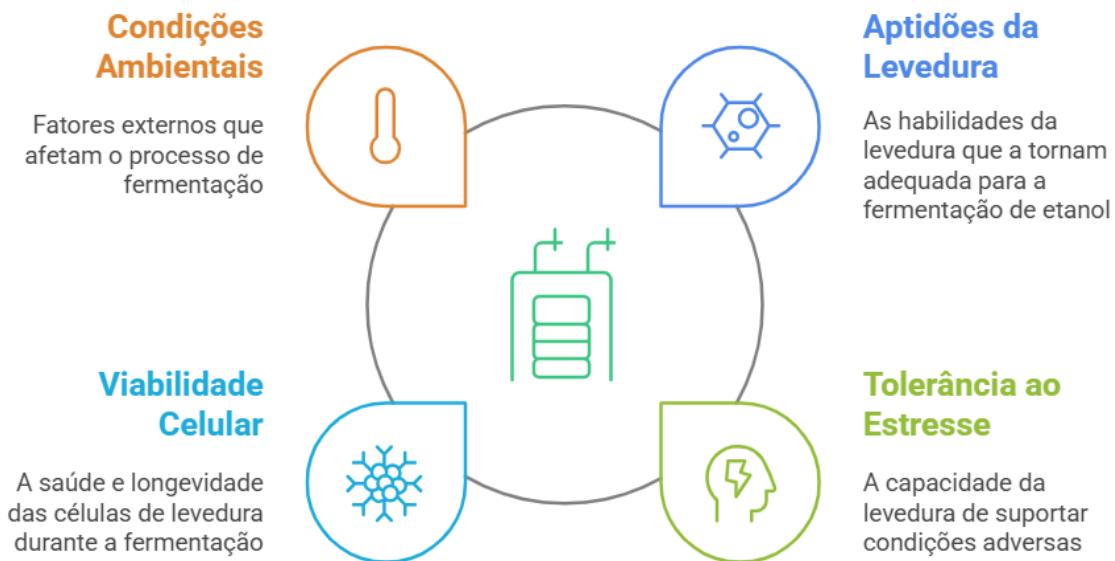
Uma gama de aptidões justifica o uso de leveduras na produção de etanol, como a alta capacidade fermentativa aliada à tolerância a elevadas concentrações de etanol e os inibidores produzidos durante o processo, tolerância às altas temperaturas, osmolaridade e baixas medidas de pH (Andrietta et al.; 2006; Mussatto et al., 2010).

A viabilidade celular de leveduras refere-se à capacidade que as células possuem de sobreviver, crescer e manter suas funções metabólicas sob determinadas condições ambientais e de cultivo. É um parâmetro essencial para diversas aplicações biotecnológicas, como fermentação alcoólica para produção de bioetanol. Na prática, se houver 100 kg de massa de leveduras atuando numa fermentação, e sua viabilidade é 90%, significa dizer que 90 kg de massa celular atua de forma ativa na fermentação, enquanto os 10 kg restantes não apresentam atividade, e acabam se auto degradando num processo conhecido como autólise. A viabilidade das leveduras pode ser influenciada por fatores como temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH do meio e a presença de fatores de tensão ambientais. Métodos como o ensaio de exclusão por azul de metileno e a citometria de fluxo são frequentemente utilizados para avaliar a viabilidade celular de leveduras. Estudos demonstram que o ambiente de cultivo e a composição do meio podem afetar significativamente a sobrevivência e a funcionalidade dessas células leveduriformes (Kaleka et al., 2021).

A viabilidade pode ser considerada um ponto importante no controle da fermentação alcoólica e quanto maior esse número melhor desempenho do processo. No entanto, manter a viabilidade com valores excelentes torna-se improvável, pois o ambiente das fornadas de fermentação não é constante, por isso deve ser feito um controle cuidadoso nas unidades produtoras (Steckelberg, 2001).

Embora *S. cerevisiae* seja mais tolerante ao etanol do que outras leveduras, a viabilidade celular é comprometida, afetando de maneira negativa desempenho fermentativo e, por consequência, diminuindo o rendimento do etanólico (Sahana et al., 2024). Na Figura 3, observou-se a discriminação dos fatores que envolvem o ambiente, bem como as condições sofridas pelas leveduras e sua influência direta na produção de etanol.

Figura 3 - Fatores que Influenciam a Produção de Etanol.



Fonte: A Autora, 2025.

A microflora dos processos fermentativos industriais pode constituir uma boa fonte de microrganismos com características relevantes do ponto de vista industrial, especialmente leveduras tolerantes ao stress (Basso et al., 2008), pois é sabido que durante o processo de propagação da biomassa as células estão frequentemente sujeitas a inúmeros estímulos estressantes (Mussatto et al., 2010) tais como: estresse osmótico, oxidativo e térmico; exposição a altas concentrações de etanol e/ou falta de nutrientes e ressecamento. Estas condições adversas podem afetar drasticamente a dinâmica da população, o processo fermentativo industrial e consequentemente a produção de etanol (Hohmann, 2002).

Dessa forma, a escolha adequada das leveduras e o controle das condições do processo são essenciais para manter a viabilidade celular e garantir alta produtividade no processo etanólico. No próximo tópico, será abordada a floculação no processo de fermentação alcoólica, analisando como essa característica das leveduras pode influenciar a eficiência do processo.

3.8 Floculação no processo de fermentação alcoólica

Um dos problemas que pode ocorrer na fermentação alcoólica por leveduras é a floculação, processo em que as células se agrupam formando conglomerados de peso superior ao da célula individualizada. Ao término da fase tumultuosa da fermentação, ou quando há agitação mecânica no fermentador e há interrupção, esses flocos sedimentam-se rapidamente ou flotam devido à formação das bolhas de gases. Em alguns processos, a floculação é desejada,

como na produção de alguns tipos de cachaça e cerveja, pois facilita a separação do sedimento e reduz a turbidez da bebida sem necessidade de processos adicionais. No entanto, na produção de bioetanol, a formação de flocos compromete a conversão de açúcar em álcool e CO₂, pois reduz a área de contato entre as células e o meio (Souza; Mutton, 2004).

A floculação ocorre devido a diversos fatores, entre eles o contato com gomas sintetizadas por bactérias, a interação com bactérias indutoras da floculação e a contaminação por leveduras flokulantes. No setor de fermentação e destilação, as bactérias lácticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis, destacando-se o gênero Lactobacillus, que apresenta baixa suscetibilidade ao álcool (Ludwig; Oliva-Neto; Angelis, 2001).

3.9 Contaminação bacteriana e sua relevância no processo fermentativo industrial

A fermentação industrial, por ser um processo em larga escala, não é conduzida em condições ideais de assepsia. Assim, a contaminação bacteriana, principalmente por Lactobacillus e Bacillus, está sempre presente e, dependendo da sua concentração, compromete o rendimento fermentativo. Altas temperaturas favorecem a proliferação bacteriana, reduzindo a produção de álcool, aumentando o tempo de fermentação e gerando estresse nas leveduras. Além disso, a contaminação está associada ao aumento da formação de ácido láctico e acético, desviando a conversão dos açúcares fermentescíveis para produtos indesejáveis (Lima; Basso; Amorim, 2001).

A contaminação bacteriana também pode induzir a flocação de leveduras, seja por fatores genéticos (característica intrínseca da levedura ou mutações) ou ambientais (temperatura elevada, variação na condução do processo e microrganismos selvagens). Além de reduzir o rendimento fermentativo, as bactérias podem consumir parte do álcool formado, impactando negativamente a eficiência do processo (Alquati, 1990). Estratégias como o tratamento ácido, embora causem estresse às leveduras, ajudam a manter a contaminação sob controle e garantir uma melhor condução do processo fermentativo (Steckelberg, 2001).

3.10 Reutilização do fermento e suas implicações no processo

A reutilização do inóculo ao longo de toda a safra pode facilitar a introdução contínua de microrganismos contaminantes no sistema, além de expor as leveduras a diferentes tipos de estresse ambiental. Esse ambiente altamente competitivo pode comprometer a permanência de leveduras melhoradas, pois linhagens selvagens ou contaminantes podem se adaptar melhor ao

meio e substituir o inóculo inicial. Quando isso ocorre, há uma redução no rendimento do processo devido às propriedades indesejáveis desses contaminantes (Wheals et al., 1999).

Entretanto, a reutilização do fermento pode conferir às leveduras uma maior resistência a fatores estressantes típicos da fermentação etanólica. Algumas linhagens adaptadas ao ambiente industrial conseguem desenvolver mecanismos de tolerância que garantem sua permanência no processo, ainda que inicialmente tenham sido isoladas do próprio sistema. Assim, a escolha de leveduras com alto potencial fermentativo torna-se fundamental para a eficiência do processo, permitindo um maior controle sobre a qualidade da fermentação e o rendimento final do etanol (Souza; Mutton, 2004). Estudos indicam que linhagens geneticamente melhoradas, com maior resistência ao etanol e menor suscetibilidade a contaminantes, apresentam melhor desempenho industrial, garantindo maior produtividade e estabilidade do processo (Ludwig; Oliva-Neto; Angelis, 2001).

3.11 Leveduras com alto potencial fermentativo

Leveduras selecionadas a partir de processos industriais específicos, mesmo pertencendo à mesma espécie, exibem diferenças genéticas e fisiológicas distintas. Em processos de larga escala, como na produção de pão, cerveja, vinho, bebidas destiladas e etanol combustível, essas leveduras adaptam-se às condições particulares de cada ambiente industrial. Essa adaptação envolve fenômenos como a duplicação de genes ou até mesmo de cromossomos inteiros, resultando em linhagens altamente especializadas (Marullo et al., 2004; Querol et al., 2003; Benitez et al., 1996).

Ao longo dos séculos, cada processo industrial selecionou linhagens adaptadas às suas condições específicas. Pesquisas recentes indicam que a perda de genes específicos pode conferir tolerância a diferentes tipos de estresse em linhagens de leveduras (Kim, 2011; Yang, 2011). Essa alteração genética está diretamente relacionada à resistência a fatores estressantes, frequentemente observada em linhagens industriais (Zheng et al., 2011).

Além disso, estudos demonstram que a adaptação evolutiva contínua dessas leveduras às condições industriais específicas resulta em cepas com desempenho fermentativo otimizado e maior resistência a adversidades ambientais (Costa et al., 2014).

3.12 Adaptação e Evolução de Linhagens de Leveduras Industriais

As linhagens de leveduras industriais estão evoluindo através de uma constante adaptação aos ambientes específicos de cada processo produtivo, resultando em alterações genéticas e fisiológicas que impactam diretamente sua eficiência e resistência. Esses fenômenos evolutivos ocorrem devido à pressão seletiva exercida pelos fatores de estresse presentes durante a fermentação, como altas concentrações de etanol, variações de temperatura, inibidores químicos e limitação de nutrientes (Yang; Tavazoie, 2020).

Entre os mecanismos adaptativos, destaca-se a duplicação de genes, que pode aumentar a produção de enzimas-chave para a fermentação e melhorar a tolerância a condições adversas. Essas adaptações genéticas incluem rearranjos cromossômicos e plasticidade genômica, permitindo maior diversidade funcional e resistência em linhagens industriais (Giannakou; Cotterrell; Delneri, 2020). Mutações em genes específicos também têm sido associadas à resistência a estresses ambientais, como altas concentrações de açúcares ou sais (Ribeiro; Bourbon-Melo; Sá-Correia, 2022).

A seleção natural e artificial ao longo dos séculos resultou em linhagens adaptadas para desempenhos otimizados em processos específicos. A tolerância a estresses como etanol, temperaturas extremas e inibidores químicos é frequentemente associada à evolução de mecanismos regulatórios e metabólicos específicos (Swamy; Zhou, 2019).

O mapeamento genômico e transcriptômico dessas linhagens tem revelado como rearranjos genômicos e alterações na expressão gênica contribuem para sua robustez e eficiência em processos industriais (Lairón-Peris et al., 2021). Essas descobertas são essenciais para o desenvolvimento de biotecnologias que maximizem a produtividade e a sustentabilidade em larga escala.

Esses estudos demonstram a complexidade e a importância da adaptação de leveduras para a melhoria dos processos industriais, destacando o potencial da engenharia evolutiva e da biotecnologia para criar, encontrar, ou modificar linhagens ainda mais robustas e eficientes.

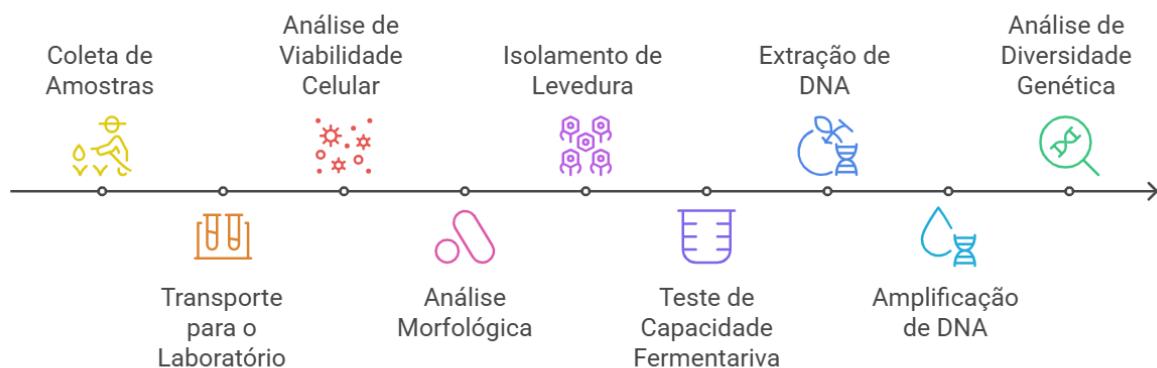
Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo identificar as leveduras predominantes, avaliar a presença de variações moleculares e fisiológicas, além do impacto da dominância das leveduras na qualidade do processo fermentativo e na produção de etanol na fermentação alcoólica durante os últimos dias de safra em uma destilaria de Alagoas, visando otimizar a eficiência e sustentabilidade da referida produção.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostragem e obtenção de linhagens de leveduras industriais e análise da diversidade macro morfológica

Amostras foram coletadas na usina Santa Clotilde situada no município de Rio Largo - Alagoas, no final da safra 2023/2024 sendo colhidas de duas dornas diariamente durante os últimos 10 dias de safra, e obtidas na forma fluidizada denominados, mosto em fermentação ou ainda inicial (uma a duas horas de fermentação), e mosto fermentado final (oito horas de fermentação) totalizando 40 exemplares. O melaço utilizado posteriormente foi cedido pela mesma usina para ser utilizado como substrato da fermentação de bancada, e nos testes fermentativos. Na Figura 4, é possível observar as etapas sequenciais do experimento.

Figura 4 - Sequência dos experimentos: da amostragem às análises genéticas.



Fonte: A Autora, 2025.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microscopia, Genética e Microbiologia situado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, onde imediatamente uma alíquota foi destinada às análises de viabilidade celular através de contagem de células ao microscópio com o uso do corante azul de metileno, e então refrigeradas e posteriormente submetidas à análise de diversidade macro morfológica pelo processo de engenharia evolutiva e demais análises.

4.2 Obtenção dos morfotipos oriundos da diversidade e estudos morfológicos

As células dos isolados de levedura foram cultivadas em meio WL Nutrient Medium ou WLN (Green, 1951) com a finalidade de avaliar as características morfológicas e fisiológicas dos isolados. As amostras coletadas de mostos fermentados foram diluídas serialmente em solução salina 0,85% até 1:10⁸, e uma alíquota de 0,02 mL da diluição foi plaqueada por espalhamento na superfície da placa em triplicata, conforme descrito por Silva (2009). O meio WLN tem a seguinte composição: glicose 5%, extrato de levedura 0,4%, caseína 0,5%, fosfato de potássio 0,005%, cloreto de potássio 0,043%, cloreto de cálcio 0,013%, sulfato de magnésio 0,013%, cloreto férrico 0,00025%, sulfato de manganês 0,00025%, verde de bromocresol 0,0022%, ágar 2%, cloranfenicol 0,0050% e pH 5,5 ajustado com ácido clorídrico 1N.

A diluição foi realizada para obter cultivos em meio sólido com aproximadamente 30 a 100 colônias de leveduras por placa para contagem de população e maiores diluições (3 a 10 colônias) para verificação das colônias dominantes. A incubação foi realizada a 30°C por até sete dias (Oliveira et al., 2004). O meio WLN é utilizado na identificação de leveduras selvagens, bactérias e fungos, devido a presença do corante verde de bromocresol, um indicador de pH que pode ser metabolizado por diferentes microrganismos. Diferentes linhagens metabolizam o corante de maneira distinta, permitindo identificar padrões morfológicos individuais (Jespersen; Jakobsen, 1996).

4.3 Contagem, isolamento e purificação das colônias

4.3.1 Morfologia da diversidade populacional de leveduras

Os morfotipos foram caracterizados morfológicamente quanto à borda, superfície, consistência, tamanho e cor. Após definição dos morfotipos, as frequências foram calculadas pelas porcentagens com relação ao total de colônias daquela placa (triplicata). Foram determinados a morfologia das leveduras presentes nos mostos do início e final da fermentação de cada dorna na usina. Nas placas onde houve o crescimento dos mostos fermentados em meio de cultivo WL Nutrient Medium foi realizado um somatório das colônias apresentadas por diluição. O isolamento das colônias de leveduras foi realizado através de amostragem dos representantes dos morfotipos distintos as colônias dominantes, verificadas por colônias crescidas em plaqueamentos com maiores diluições foram utilizadas para extração de DNA e tipagem genética.

4.3.2 Manutenção das linhagens

As colônias selecionadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio YPD-ágar (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose e 2% ágar bacteriológico) acrescido de cloranfenicol ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) e Canamicina ($50\mu\text{g}/\text{ml}$). As placas (5 para cada estirpe) foram incubadas a 30°C por 36 horas e mantidas a 4°C , sendo utilizadas como inóculo em todos os testes (leveduras de trabalho). Paralelamente, tubos de 3mL com tampa, contendo 1mL de caldo YEPD, foram inoculados com cada isolado selecionado (5 tubos de cada isolado) e incubado a 30°C por 48 horas, após isso deixou-se em geladeira a 4°C por mais 48 horas, sendo descartado o sobrenadante após esse tempo, adicionou-se 0,85mL de caldo YEPD à massa celular decantada, e 0,15mL de glicerol, agitou-se até completa mistura, e acondicionou-se em congelador para conservação por até 5 anos (leveduras estoque).

4.4 Identificação de colônias mutantes respiratórias

A presença da mutação respiratória é observável pela ação do corante eosina amarelada Y, do azul de Tripan, e pela característica morfológica, sendo as colônias deficientes muito menores do que as que não possuem esta deficiência.

O meio de cultivo descrito por Nagai (1963), tem em sua composição: Glicose 2%, peptona 0,15% extrato de levedura 0,15%; sulfato de potássio 0,15%, sulfato de amônio 0,15%, sulfato de magnésio 0,1% e ágar 1,2%, corantes: eosina amarela Y 0,0008% e azul de Tripan 0,0015% (meio e corantes foram autoclavados separadamente por 30 minutos e misturados após atingir temperatura na faixa dos 55°C), e foi utilizado para identificar se há mutação respiratória hereditária em leveduras, na forma de colônia tipo petite ou variação na coloração das colônias pelos corantes azul de Tripan e eosina amarelada Y.

4.5 Determinação do Brix e pH

A verificação de pH foi realizada nas 40 amostras de mosto em fermentação e mosto fermentado recebidas da usina, sendo executada pela técnica de medição de hidrogênio iônico com eletrodo de vidro sensível ao H_3O^+ em solução, conhecido como pHmetro de bancada. Contando com sensor de temperatura e ajuste interno automático da medida, o fator $-\log [\text{H}^+]$ já é corrigido e apresentado dentro da escala. O teor de sólidos totais dissolvidos (Brix) foi determinado em todas as amostras coletadas através do refratômetro óptico de Brix portátil.

4.6 Teste de capacidade fermentativa

Após crescimento dos isolados em placas de Petri com meio YPD-ÁGAR por 48 horas, uma alçada da massa celular de cada isolado foi diluída em 2 mL da solução salina (NaCl 8,5g. L⁻¹) e a concentração ajustada para 1.10⁸ células. mL⁻¹. Os ensaios fermentativos utilizando a técnica de tubos múltiplos foram realizados em tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos (Van Dijken et al., 1986; Moreira et al., 2015; Viana, 2017).

Os meios de cultura YPSac10 (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2%, sacarose 10%, pH 5,5), MMel15 (mosto de melaço de cana clarificado ajustado para 15 °Brix, pH 4,5) foram autoclavados a 120°C por 20 minutos e adicionados a cada conjunto de tubos e com volume de 7 mL cada tubo. O mosto de melaço clarificado, MCC15 (caldo de cana ajustado para 15 °Brix e pH 4,5) foi preparado adicionando partes iguais de melaço e água, equivalente em massa, misturado até completa homogeneização, e o pH ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico 10M e autoclavado a 121°C, 1 atm por 15 minutos. O mosto de melaço permaneceu em repouso por 48 horas em geladeira, então o sobrenadante foi coletado, e adicionados a cada conjunto de tubos e com volume de 7 mL cada tubo, sendo denominado mosto de melaço clarificado, ou MCC15. Cada tubo foi semeado com 500 uL do inóculo (1.10⁸ células. mL⁻¹) e incubado em estufa B.O.D. a 30 °C por 24 horas, sendo realizados em triplicata.

A avaliação foi executada observando o desprendimento de gás nos tubos, o odor de álcool, a produção de massa celular, pH, Brix e formação de espuma, sendo observado a máxima e mínima performance para cada observação. Todas as avaliações foram agrupadas pela semelhança no desempenho observado. Para odor, listou-se 4 níveis: 1: suave não alcoólico; 2: suave alcoólico; 3: médio alcoólico; 4: alto alcoólico; para o desprendimento de CO₂, variações de baixo a alto: baixo: menor que 1cm; médio: entre 1 a 2cm; alto: maior que 2cm, sendo medida a altura do gás dentro do tubo de Durham. Massa celular no fundo do tubo: 1: pouca massa; 2: massa suficiente; 3: massa suficiente e maior que 2; 4: massa em excesso; para estabelecer as notas de 1 a 4, os tubos fermentados foram agrupados, encontrando-se 4 grupos, os quais seguiram para verificação com relação à massa, sendo 1 considerado insuficiente pelo menor consumo do substrato em todos os tubos semelhantes, a nota 2 foi considerada suficiente ou adequada pois neste experimento apresentou os maiores consumos de substrato (menor Brix), enquanto o nível 3 foi comparável ao 2, com menores valores de Brix, e presença de odor alcoólico. Por fim, a nota 4 foi atribuída aos tubos com a maior quantidade de massa de leveduras, odor pouco alcoólico e maior produção de espuma. As notas 1 e 4 para massa celular no fundo do tubo foram consideradas não ideais, pois apresentaram

prejuízo nas demais avaliações. Para a formação de espuma: - sem formação; + baixa; ++ média; +++alta, onde as categorias foram agrupadas por máxima, média, mínima ou nenhuma formação de espuma. Para todos os meios utilizados, a capacidade fermentativa foi avaliada com 0 (zero) para tubos que não apresentaram fermentação e 1 (um) para tubos que apresentaram atividade fermentativa.

4.7 Extração de DNA

As cepas isoladas foram inoculadas em meio YPD líquido e incubados a 30°C por 16 a 24 horas. Amostras de 1,0mL de cada cultura foi transferida para micro tubos de 2,0mL e centrifugados por três minutos a 5.900G. O método utilizado foi o Doyle & Doyle (1990) com modificações. O DNA foi extraído a partir de 100mg de massa celular que foi adicionado 750µL de tampão com CTAB (contendo 2% de CTAB, 200mM de Tris-HCl pH 8.0, 70mM de EDTA pH 8.0, 2M de NaCl, 2% de PVP, 0,2% de β-mercaptoethanol e 10µL de Proteinase- K (50µg.L⁻¹) e incubado a 65°C por 30 minutos. A solução foi resfriada e adicionada 0,750µL de fenol-clorofórmio (1:1) até formar emulsão e centrifugado a 12000G por 10 minutos.

A desproteinização foi realizada pela segunda vez, adicionado 650µL de fenol-clorofórmio (1:1) até formar emulsão e centrifugado a 12000G por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado, deixado por 30 minutos a - 20°C. a solução foi centrifugada a 12000G por 15 minutos e o líquido foi descartado. O precipitado formado foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 11000G por 15 minutos. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e o DNA solubilizado com 50µL de TE com RNAase. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% submetidos a 7,5 volts/cm por 120 minutos em tampão TAE 1x corados com *SybrGreen*, visualizados em transluminador ultravioleta e fotografados.

O DNA extraído foi acondicionado para posteriores amplificações utilizando primers relevantes para a fermentação etanólica industrial, sendo possível encontrar informações sobre alguns primers utilizados em leveduras no banco de dados “*Saccharomyces* Genome Database.”¹

¹ Banco de Dados do Genoma *Saccharomyces* (SGD) disponível em <<https://www.yeastgenome.org/>> Acesso em 10 de setembro de 2024.

4.7.1 Amplificação dos fragmentos de DNA por meio de microssatélites (GTG)₅

A reação de amplificação de sequências simples entre repetições (ISSR) por PCR com o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅, permite que padrões genéticos sejam caracterizados para as linhagens isoladas (Ramírez-Castrillón et al., 2014). Geralmente é utilizado para auxiliar estudos de diversidade genética em populações de leveduras industriais e identificação de cepas com base em variações genéticas dentro da mesma espécie, sendo útil para o monitoramento de cepas durante processos industriais.

As reações de PCR foram realizadas com volume final de reação de 25 μ l conforme metodologia descrita por Silva-Filho (2005a), contendo tampão de PCR 10X; BSA (soro albumina bovina) 0,25 μ g μ L⁻¹, 100 μ M de cada dNTP (dATP, TTP, dCTP, dGTP), 1,0 pmol. μ L⁻¹ do iniciador (GTG)₅ (Lieckfeldt; Meyer; Börner, 1993), 50,0 ng. μ L⁻¹ de DNA e 5 U. μ L⁻¹ de *Taq* DNA polimerase. A amplificação para (GTG)₅ foi programada em Termociclador Biocycler MJ96/MJ96+ para um ciclo de desnaturação de cinco minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos (Silva-Filho, 2005a). Os fragmentos amplificados foram separados por gel de agarose 1,5% e submetidos a 7,5 volts/cm por 150 minutos em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA·2H₂O, pH 8,5). Os géis foram corados com SybrGreen, e visualizados sob luz UV e fotografados.

4.7.2 Amplificação dos fragmentos de DNA por primers inter-delta

Amostras do DNA extraído dos isolados predominantes e as linhagens referência, foram submetidas a comparação molecular utilizando reação de PCR, com o conjunto de primers DELTA 12 E DELTA 21. O primer DELTA 21 (5'- CATCTAACACCGTATATGA - 3') e o primer DELTA 12 (5'- TCAACAATGGAATCCCAAC - 3') foi desenhado por Legras e Karst (2003).

Os primers descritos são direcionados para sequências repetitivas delta, que estão presentes nos elementos transponíveis das leveduras. Eles são usados para fingerprinting genético, criando perfis moleculares que ajudam a distinguir diferentes cepas de leveduras (Legras, 2003).

As reações de PCR foram realizadas com volume final de reação de 25 μ l, contendo tampão de PCR 10X; 100 μ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,0 pmol. μ L⁻¹ de

cada primer; 50,0 ng. μL^{-1} de DNA e 5 U. μL^{-1} de *Taq* DNA polimerase. A amplificação para o conjunto de primers foi programada em Termociclador Biocycler MJ96/MJ96+ para um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por gel de agarose 1,5% e submetidos a 7,5 volts/cm por 150 minutos em tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA·2H₂O, pH 8,5). Os géis foram corados com SybrGreen, e visualizados sob luz UV e fotografados.

4.7.3 Amplificação dos fragmentos de DNA por YLL021WF e YLL021WR

O conjunto de primers YLL021WF (5'- GAAAATGACGATGCAGACGA - 3') e YLL021WR (5'- AGGACTCGCTTCCCTTACC - 3') foi desenvolvido por Carvalho e colaboradores (2013), que projetaram 9 primers de oligonucleotídeos com um poder discriminatório satisfatório, e buscaram genes contendo polimorfismo de inserção ou deleção maiores que 24bp. O gene de levedura SPA2, identificado pelo conjunto de primers YLL021W, está envolvido na direção e controle da divisão celular, e seu produto gênico se localiza no local do crescimento celular (Snyder, 1989).

A análise de PCR foi realizada para o volume de 10 uL contendo 20 ng de DNA genômico, 0,25 mM de cada DNTP, tampão 10× PCR, 3,5 mM MgCl₂, 0,05 U/L de *Taq* DNA polimerase, 1,5 pmol/L de cada primer. O programa de amplificação foi realizado em Termociclador Biocycler MJ96/MJ96 e consistiu em 5 min de desnaturação a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 94 °C, e o anelamento na temperatura de 55°C por 40 segundos e 45 segundos a 72 °C. Uma extensão final de 5 minutos foi realizada a 72 °C. O produto de PR foi revelado em eletroforese convencional em géis de agarose a 2% e tampão 1xTAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA·2H₂O, pH 8,5). Os géis foram corados com SybrGreen, e visualizados sob luz UV e fotografados.

4.7.4 Amplificação dos fragmentos de DNA por NL1 e NL4

Os primers NL1 e NL4 são comumente usados para amplificar a região do Large sub unit (LSU) do rDNA, que contém a região conservada, além dos espaçadores transcritos internos (ITS) (Kurtzman; Robnett, 1998). A amplificação dessa região é amplamente utilizada na identificação de espécies de leveduras e outros fungos e análise filogenética.

A amplificação parcial da região divergente D1/D2 ao final da subunidade ribossomal maior (nucleotídeos 63-642 em *S. cerevisiae*) do gene 26S foi amplificada por PCR utilizando

os primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGAGGG-3') (Kurtzman; Robnett, 1998), gerando um fragmento de aproximadamente 600bp. A reação de PCR foi feita para um volume final de 50 μ L contendo 20-30 ng de DNA molde, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM e 0,2 mM dNTP's. O programa de termociclagem (Termociclador Biocycler MJ96/MJ96) consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 90°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 6 minutos. Os fragmentos foram checados e quantificados em gel de agarose 1,5% e submetidos a 7,5 volts/cm por 150 minutos em tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA·2H₂O, pH 8,5). Os géis foram corados com *SybrGreen*, e visualizados sob luz UV e fotografados. Após amplificação os fragmentos foram enviados a ACTGene Análises Moleculares para sequenciamento genético e identificação de gênero e espécie.

4.8 Cinética de crescimento celular

A determinação da taxa de multiplicação celular pode ser obtida a partir da construção de uma curva de crescimento celular, relacionando a absorbância ao longo do tempo. Esse procedimento é realizado por meio da medição da densidade óptica, conforme sugerido por Hiss (2001), utilizando espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 600 nm, onde as leituras foram feitas em termos de absorbância (Andrietta, S. R.; Andrietta, M. G.; Rodrigues, 1995). A partir desse método foi possível a observação do comportamento típico de crescimento, caracterizado pelo aumento da concentração celular após a inoculação em um meio de cultura apropriado para o desenvolvimento de leveduras (Gretschmann, 2009; Hiss, 2001). O parâmetro cinético $\mu_{\text{máx}}$ foi determinado com o auxílio do Excel; identificando a fase log da curva de crescimento, foi plotado outro gráfico exponencial, utilizando a Equação 2 abaixo:

$$\ln(x_o/x_i) = \mu_{\text{máx}} t \quad (2)$$

Onde: x_0 = leitura inicial, e x_i = leitura atual.

Foi feito um plaqueamento dos isolados selecionados em placas de Petri, permanecendo por 48 horas em crescimento, e a massa celular foi transferida para 10 mL de YEPD líquido, e após 24 horas transferiu-se os 10mL para 100mL do meio de cultivo.

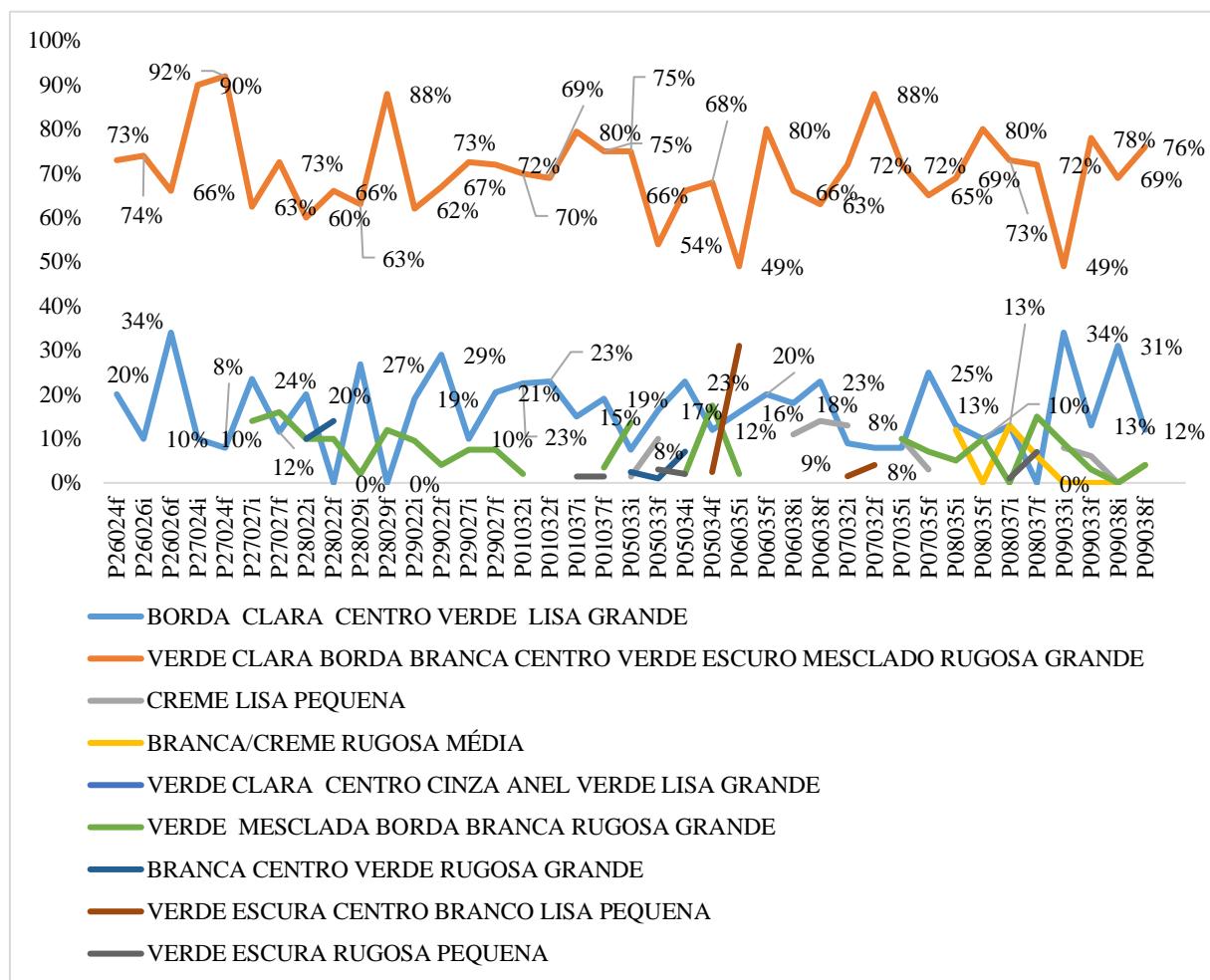
Após a inoculação foi feita uma diluição 1:10 com água destilada e agitada em vórtex para ser realizada a primeira leitura (L_0), em espectrofotômetro a um comprimento de onda 600nm, e a leitura foi visualizada em absorbância. Os erlenmeyers com os meios inoculados foram mantidos em mesa agitadora tipo Shaker com agitação constante a 165 rpm e 30°C por 8 horas, e as leituras realizadas a cada 1 hora, totalizando 9 leituras. Após isso os dados foram plotados em uma curva de regressão linear, e a partir dos dados do coeficiente angular, obtido cálculo da equação linear de primeiro grau encontrou-se a taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostragem e obtenção dos morfotipos oriundos da diversidade e estudos morfofisiológicos

A análise morfológica das 20 amostras do mosto no início da fermentação na dorna (1 hora de fermentação) possibilitou a observação de 1464 indivíduos, e 98 colônias de levedura distintas, sendo os morfotipos de aspecto liso e rugoso, com variações no tamanho e tipo de borda da colônia e com a coloração variando entre branco, creme até o verde escuro. A Figura 5 traz os principais morfotipos caracterizados com suas respectivas identificações, porcentagens e frequência durante o período analisado.

Figura 5 – Caracterização e porcentagem das estirpes isoladas.



Fonte: A Autora, 2024.

Estudos recentes corroboram a diversidade morfológica e funcional das leveduras em processos fermentativos. Um estudo sobre leveduras isoladas de fermentações alcoólicas em diferentes regiões da Índia identificou que *Saccharomyces cerevisiae* representa apenas 13,5% da população, enquanto 86,5% das leveduras pertencem a espécies não *Saccharomyces*, contribuindo para uma ampla diversidade morfológica e metabólica (Tamang; Lama, 2023).

Outro estudo demonstrou que, na fermentação espontânea de vinhos, foram identificadas diversas espécies de leveduras, incluindo *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *Saturnispora diversa* e *Starmerella bacillaris*, reforçando a heterogeneidade das colônias e a presença de diferentes morfotipos (Zabukovec et al., 2020).

Além disso, pesquisas sobre fermentações abertas de agave no México revelaram muitas espécies leveduriformes com colônias de diferentes cores e texturas, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* e *Kluyveromyces marxianus* (Gallegos-Casillas et al., 2023).

Os achados mencionados sustentam que, no início da fermentação, a comunidade de leveduras pode ser altamente diversa, incluindo morfotipos lisos e rugosos, além de variações de coloração. A presença de leveduras não *Saccharomyces* no início do processo fermentativo pode justificar a diversidade de colônias observadas.

Dessa forma, a análise morfológica das leveduras na fase inicial da fermentação reflete a diversidade natural dessas populações, o que está de acordo com estudos recentes sobre a variação de morfotipos e espécies em fermentações espontâneas e industriais.

A análise morfológica das 20 amostras do mosto após 8 horas de fermentação da dorna possibilitou a observação de 2296 indivíduos, e 107 colônias de levedura distintas sendo os morfotipos de aspecto liso e rugoso, com variações no tamanho e tipo de borda da colônia e com a coloração variando entre branco, creme até o verde escuro.

Estudos anteriores corroboram a diversidade morfológica observada em processos fermentativos industriais. Em seus estudos, Viana (2017) caracterizou isolados provenientes de dornas de ambiente industrial de fermentação alcoólica de mosto coletado em dias diferentes, não sendo especificado o tempo de fermentação das dornas coletadas, contudo identificou-se variações morfológicas significativas entre as colônias de leveduras, incluindo diferenças na textura e coloração das colônias.

Além disso, Tonoli (2016) destacou que a adaptação de linhagens de leveduras a condições de fermentação com alto teor alcoólico pode resultar em alterações morfológicas perceptíveis, como mudanças na estrutura celular observadas por microscopia eletrônica de varredura. Essas observações reforçam a importância de monitorar as características

morfológicas das leveduras durante o processo fermentativo, uma vez que variações podem impactar diretamente a eficiência e a qualidade da fermentação alcoólica.

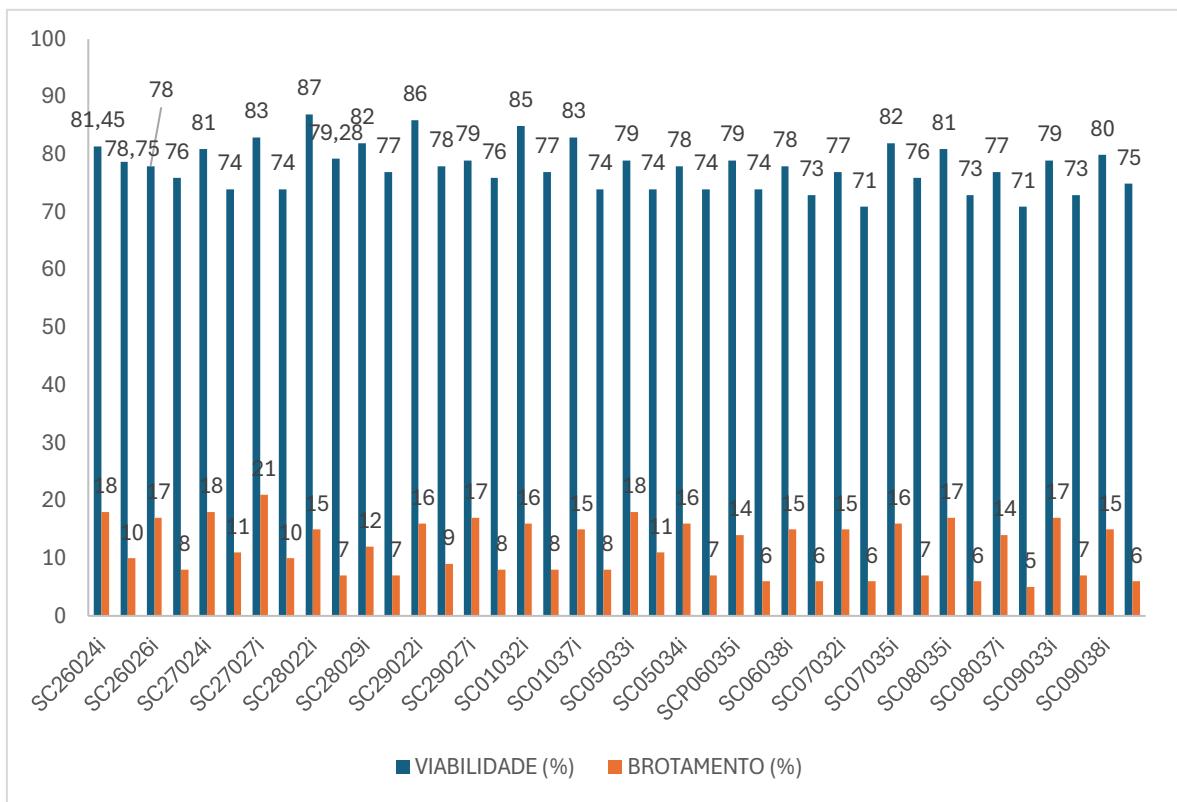
As colônias de leveduras predominantes de cada amostra coletada, foram nomeadas, codificadas, isoladas e purificadas, e seguiram para acondicionamento em tubos com meio YPD-ÁGAR inclinado (slants) e posteriores testes.

5.2 Análise microbiológica das amostras coletadas

Após serem coletadas, as amostras seguiram para o laboratório de Microscopia do CECA, onde foram realizadas análises de contagem de células de leveduras (coradas com azul de metileno 0,01%) ao microscópio óptico utilizando um aumento de 400X, e com o auxílio de uma câmara de Neubauer, as células de levedura foram contabilizadas para a obtenção da viabilidade (%), brotamento (%), e concentração de células (células/mL).

A análise das amostras de mosto durante o processo fermentativo revelou variações significativas na concentração celular, viabilidade e taxa de brotamento das leveduras. O resultado para as concentrações de células variou entre 8×10^7 a 1×10^7 para as amostras de início da fermentação e entre 8×10^8 a 8×10^7 . Os resultados para a viabilidade variaram em 87% a 77% para as amostras de mosto no início da fermentação, entre 79,28% a 71% para as amostras de mosto no final da fermentação. Já a contagem de brotos apontou uma variação de 21% a 12% nas amostras de início de fermentação, enquanto no final da fermentação o brotamento variou entre 11% a 5%. A Figura 6 informa os resultados de viabilidade (%) e brotamento (%) obtidos com as contagens de células de leveduras ao microscópio.

Figura 6 – Resultados de viabilidade e brotamento para as contagens realizadas com as amostras coletadas.



Fonte: A Autora, 2024.

Esses resultados são consistentes com estudos recentes que destacam a importância da manutenção da viabilidade celular para a eficiência fermentativa. Jacob e Campos (2023) observaram que a viabilidade das leveduras tende a declinar durante a safra devido a fatores como contaminação e condições físico-químicas inadequadas, o que pode levar a fermentações lentas ou até mesmo à paralisação do processo.

Além disso, a presença de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* pode influenciar negativamente a viabilidade das leveduras, especialmente em meios mais acidificados (Nobre; Horii; Alcarde, 2007). A redução na taxa de brotamento observada ao longo da fermentação pode estar associada ao acúmulo de etanol e outros subprodutos que exercem estresse sobre as células de *Saccharomyces cerevisiae*, afetando sua capacidade de reprodução (Tonoli, 2017). Portanto, o monitoramento contínuo desses parâmetros é bastante útil para garantir a eficiência e a produtividade do processo fermentativo.

Através dos plaqueamentos por superfície em meio WLN, realizados em triplicata, foi possível quantificar a população de leveduras, e isolar as colônias predominantes correspondentes a cada amostra recebida. Assim, obteve-se a população de leveduras, que foi

quantificada, e as colônias com porcentagem menor que 1% não foram contabilizadas, conforme a Tabela 1.

A incidência de colônias que formam pseudomicélios, também conhecidas como colônias rugosas, devido a textura das colônias em placas, foi evidenciada pela observação dos pseudomicélios (rugosas) ao microscópio, sendo maior o número de colônias rugosas do que as colônias soltas, também conhecidas como colônias lisas, e a maioria das colônias predominantes encontradas nos plaqueamentos apresentam a característica rugosa, variando entre 90% a 49% nas amostras de mosto inicial, e entre 92% a 54% nas amostras de mosto final. Considerando que as amostras foram coletadas nos últimos dez dias de safra, as estirpes rugosas apresentaram estabilidade, predominância e permanência morfológica durante todo o período acompanhado.

Lertwattanasakul e colaboradores (2023), investigaram mutantes da espécie *Kluyveromyces marxianus* com tolerância a múltiplos estresses e observaram que esses mutantes exibiam pseudomicélios e morfologia alterada. Isso sugere que a formação de estruturas rugosas pode ser uma estratégia adaptativa para lidar com estresses ambientais durante a fermentação. Já Jamaluddin e colaboradores (2023), estudaram a modificação genética de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar o desempenho da produção de etanol e notaram que algumas das estirpes modificadas apresentavam crescimento filamentoso e formação de pseudomicélios, possivelmente em resposta ao estresse ambiental do processo. Esses estudos indicam que a formação de pseudomicélios pode ocorrer durante a produção de etanol e pode estar relacionada à adaptação das leveduras às condições ambientais.

Em seus estudos, Viana e colaboradores (2020), analisaram a dominância de estirpes de leveduras indígenas ao longo do processo de fermentação de etanol no Brasil. O estudo demonstrou que essas leveduras podem superar as cepas comerciais e manter sua presença em todas as fases da safra, indicando estabilidade e adaptação ao ambiente industrial. Enquanto Duperray e colaboradores (2024), realizaram um estudo sobre a estabilidade genética e metabólica de leveduras industriais durante fermentações prolongadas, revelando que mesmo cepas modificadas geneticamente podem apresentar flutuações metabólicas e perda de eficiência ao longo do tempo, sugerindo que a estabilidade das leveduras nativas pode ser uma vantagem competitiva. Os estudos sugerem que longos períodos de safra, a interferência de cepas nativas e as condições ambientais adversas podem favorecer a adaptação de cepas de leveduras com características desejáveis à fermentação, favorecendo sua permanência.

Tabela 1 – Porcentagens dos isolados discriminadas nas amostras coletadas.

Fonte: A Autora, 2024.

Onde:

1 - Borda clara centro verde lisa grande; 2 - Verde clara borda branca centro verde escuro mesclado rugosa grande; 3 - Creme lisa pequena; 4 - Branca/creme rugosa média; 5 - Verde clara centro cinza anel verde lisa grande; 6 - Verde mesclada borda branca rugosa grande; 7 - Branca centro verde rugosa grande; 8 -Verde escura centro branco lisa pequena; 9 - Verde escura rugosa pequena; I = amostra inicial (2 horas de fermentação); F= amostra final (8 horas de fermentação).

5.3 Identificação de colônias mutantes respiratórias

Leveduras respiratórias deficientes não metabolizam eficientemente os corantes, apresentando colônias de coloração intensa de azul e roxa, devido à maior retenção do azul de Tripan. Isso ocorre porque a disfunção mitocondrial compromete o metabolismo energético celular, impedindo a metabolização dos corantes e resultando na sua acumulação intracelular (Van Urk et al., 1990).

O azul de Tripan e a Eosina Amarelada são corantes amplamente utilizados junto ao meio de cultura Nagai para avaliar a permeabilidade da membrana celular e a capacidade respiratória mitocondrial das células. Esses corantes interagem diferencialmente com células que possuem mitocôndrias funcionais e aqueles com deficiência respiratória, permitindo a distinção fenotípica entre células normais e mutantes petites (Nagai, 1963; Shibasaki et al., 1967).

Por outro lado, colônias normais, com mitocôndrias funcionais, metabolizam parte dos corantes, levando à formação de colônias com cores claras, esbranquiçadas ou menos rosadas. Esse efeito ocorre devido à menor retenção do azul de Tripan e interações com a Eosina Amarelada Y, que conferem um padrão de coloração característico das células com respiração aeróbica ativa (Pereira, 2018).

Assim, essa diferenciação visual entre leveduras petites e normais é amplamente utilizada em estudos sobre mutações mitocondriais e metabolismo energético em *Saccharomyces* e outras espécies fermentativas. A aplicação desse método permite um rastreamento rápido e eficiente de mutantes, sendo uma ferramenta essencial para a compreensão da dinâmica genética e metabólica que compreende as alterações genéticas em diferentes condições ambientais e industriais (Nagai, 1963; Shibasaki et al., 1967).

A avaliação da presença de deficiência respiratória foi qualitativa e realizada por meio da atribuição de valores de escala contínua e arbitrária, de acordo com a coloração da colônia no meio de cultura, sendo adaptado de Neto; Mendes-Ferreira (2005). Os valores atribuídos a cada amostra estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2– Avaliação qualitativa dos isolados petite em meio Nagai.

Isolado	Coloração observada	Valor atribuído
C1	Lilás acinzentado	1
C2	Centro lilás, borda roxo intenso	3
03	Roxo intenso	2
04	Lilás acinzentado com poucos setores	1
05	Lilás acinzentado	1
06	Lilás	1
07	Lilás acinzentado	1
08	Lilás acinzentado	1
09	Centro lilás, borda fúcsia intenso e roxo intenso	3
10	Roxo intenso, rosa, setores azul-claros	3
11	Lilás acinzentado e roxo intenso	3
12	Lilás acinzentado	1
13	Roxo intenso, borda azul clara	2
14	Azul arroxeadoo intenso borda azul-clara	3
15	Lilás, borda azul-claro	1
17	Rosa, setores lilás	1
18	Lilás azul-arroxeadoo	2
19	Lilás azul-arroxeadoo	2
20	Lilás rosado	1
21	Roxo intenso	2
22	Rosa, setores lilás e roxo	3
23	Rosa pálido borda lilás, algumas arroxeadas	1
24	Lilás e roxo	3
25	Roxo intenso e rosa	3
26	Rosa acinzentado borda lilás	1
27	Azul arroxeadoo intenso	2
28	Roxo e fúcsia	3
29	Azul arroxeadoo intenso	2
30	Roxo intenso	2
31	Rosado com setores lilás e rosa	1
32	Rosa, lilás, linha azul na borda	1
33	Rosa, lilás, poucos setores roxos	3
34	Roxo intenso	2
35	Rosa borda lilás	1
36	Lilás, setores roxos e rosas	3
37	Lilás	1
38	Roxo intenso	2

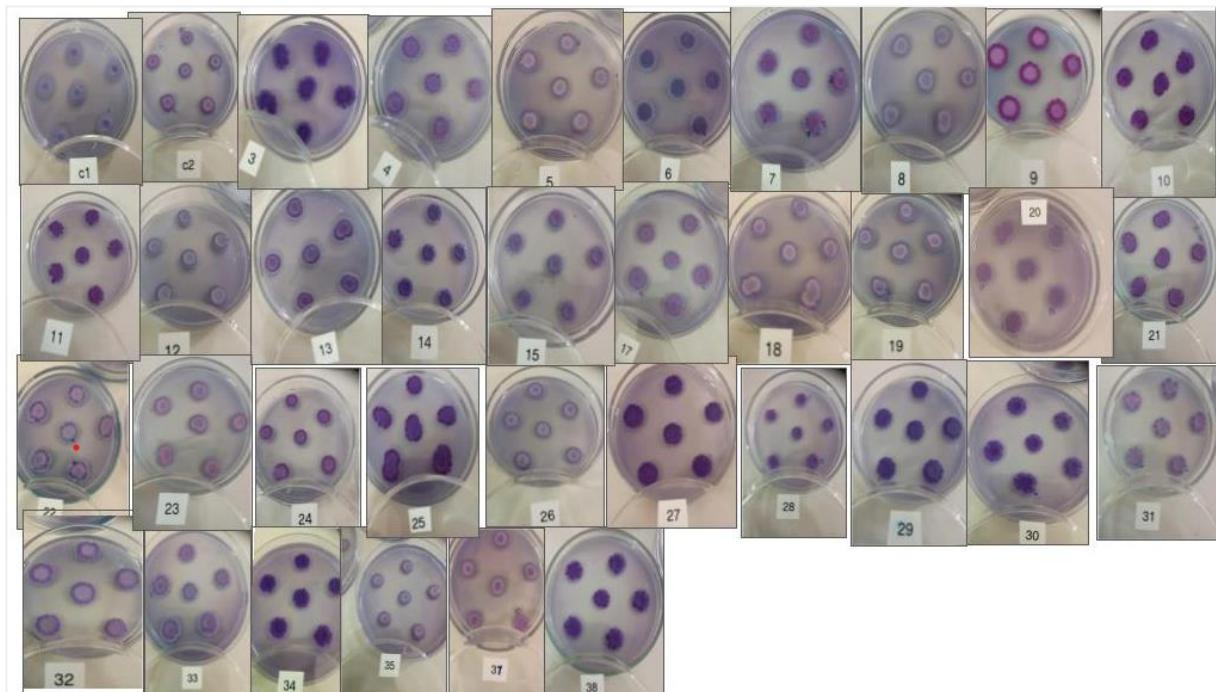
Fonte: A Autora, 2025.

Os resultados do ensaio em placas com meio Nagai, utilizando os corantes azul de Tripan e eosina amarelada Y, revelam informações importantes sobre a funcionalidade mitocondrial das leveduras analisadas. Este método é reconhecido por sua eficácia na diferenciação de leveduras com metabolismo respiratório normal daquelas com deficiência

mitocondrial, conhecidas como mutantes petites. A distinção baseia-se na coloração diferencial das colônias, permitindo uma triagem fenotípica rápida e precisa (Van Dyck, Langer, 1999).

Na prática, há distinção na absorção dos corantes, pois o azul de Tripan e a eosina amarelada Y são corantes que interagem com a permeabilidade da membrana celular e a capacidade respiratória mitocondrial das células. As colônias petite não metabolizam eficientemente os corantes e apresentam colônias de coloração intensa, variando de azul a roxo, devido à maior retenção do corante Azul de Tripan. Já os isolados considerados normais possuem mitocôndrias funcionais, por isso a maior parte dos corantes são metabolizadas, resultando em colônias esbranquiçadas ou ligeiramente rosadas devido à menor absorção do Azul de Tripan e interações com a Eosina Amarelada, que tem afinidade com estruturas celulares intactas e pode ser parcialmente metabolizada por leveduras respiratórias, reduzindo sua intensidade de coloração. Na Figura 7, pode-se observar as nuances e variações de cor por isolado.

Figura 7 – Visualização das Colônias formadas em meio Nagai.



Fonte: A Autora, 2025.

Das 37 estirpes de levedura analisadas, 15 não apresentaram deficiência respiratória, sugerindo a presença de mitocôndrias funcionais e a capacidade de realizar respiração aeróbica de maneira eficiente, tendo o controle C1 (fermento industrial CAT-1) apresentado células normais, enquanto C2 (fermento injetado no início da safra) apresentou células normais e

deficientes. Esse resultado indicou que essas células mantêm a capacidade de gerar ATP via fosforilação oxidativa, um mecanismo fundamental para a otimização do crescimento e da produtividade celular em ambientes aeróbicos (Barrientos, 2003). Estudos anteriores apontaram que cepas industriais robustas tendem a preservar a funcionalidade mitocondrial por mais tempo, garantindo maior estabilidade metabólica e eficiência fermentativa ao longo dos ciclos produtivos (Duan et al., 2014). Tais resultados são relevantes para a indústria de biotecnologia e fermentação, onde a estabilidade metabólica impacta diretamente a produtividade e a qualidade de seus produtos.

Por outro lado, 10 estirpes foram classificadas como petites, o que significa que apresentaram mutações ou deleções no DNA mitocondrial, resultando em uma incapacidade parcial ou total de realizar respiração aeróbica. Essas leveduras dependem exclusivamente da fermentação para obtenção de energia, o que pode impactar seu desempenho em processos fermentativos contínuos. Estudos indicam que mutações mitocondriais podem surgir devido a estresses ambientais, como oscilações de temperatura, variações na disponibilidade de oxigênio e exposição a compostos tóxicos durante a fermentação (Querol; Bond, 2017).

A presença dessas mutantes pode indicar um ambiente seletivo que favoreceu seu aparecimento ao longo do processo industrial. Os dados encontrados com a realização do teste para identificar colônias mutantes sugerem uma grande variabilidade genômica dentro da população de leveduras, fenômeno associado a recombinações mitocondriais, instabilidade genética ou até mesmo à presença de fenótipos respiratórios mistos. Yong, Lee e Kang (2020) apontam que essa heterogeneidade genética pode conferir flexibilidade metabólica às leveduras, permitindo que se adaptem melhor às mudanças nas condições ambientais ao longo do processo fermentativo.

A presença da linhagem controle C1 (CAT-1) e da levedura injetada no início da safra C2 fornece parâmetros de comparação, permitindo avaliar como as populações de leveduras evoluem ao longo do processo. A detecção de uma proporção considerável de mutantes petites e de colônias mistas sugere que a fermentação industrial pode induzir mudanças genéticas significativas nas populações de leveduras, impactando a eficiência do processo e a estabilidade das cepas utilizadas. A compreensão desses fenômenos pode contribuir para estratégias de melhoramento genético e seleção de leveduras mais resistentes, garantindo maior controle sobre a fermentação e melhorando o rendimento do processo (Duan et al., 2019).

5.4 Teste de capacidade fermentativa

As fermentações com tubos de Durham foram realizadas utilizando os meios YSac10, MMel15 e MCC15, em triplicata, e após 24h em estufa a 30 °C e sem agitação.

MMel15 (Mosto de melaço clarificado - Brix 15 e pH 4,5): Todos os isolados demonstraram boa capacidade fermentativa (CF) em avaliação após 24 horas de fermentação. O isolado C1 (CAT-1) apresentou pH de 4,06 e Brix de 8, enquanto o isolado C2 registrou pH de 3,77 e Brix de 7 após 24 horas de fermentação. Ambos exibiram forte odor alcoólico e produção média de biomassa e espuma, de acordo com as categorias agrupadas na realização do teste. O isolado 3 teve pH de 3,99 e Brix de 8, com odor alcoólico médio e produção média de biomassa com baixa formação de espuma. A Tabela 3 traz os resultados obtidos com o teste para o mosto de melaço clarificado.

O isolado 4 mostrou pH de 4,00 e Brix de 8, com odor alcoólico intenso e alta produção de biomassa. Isolados como 6, 17, 21 e 25 apresentaram odores suaves ou ausência de odor alcoólico, enquanto os morfotipos 5, 6, 23, 24, 26, 30 e 36 produziram biomassa em quantidades não ideais, sendo observado pouca massa (1) ou massa celular em excesso (4), de acordo com a classificação obtida na formação dos grupos de 1 a 4. Os isolados 12 e 13 destacaram-se com pH de 4,0 e Brix de 6 e 7, respectivamente, odor alcoólico moderado, produção média de gás, espuma e biomassa, sugerindo equilíbrio fermentativo.

Morfotipos 28 e 31 apresentaram pH de 4 e Brix de 7, com odor alcoólico moderado, alta a média produção de biomassa e baixa formação de espuma. Isolados 33 e 38 tiveram pH próximo de 4,0 e Brix de 8 e 7, respectivamente, com odor alcoólico de moderado a intenso, produção de gás e espuma de média a baixa, e produção média de biomassa.

Tabela 3 - Capacidade Fermentativa (CF) dos morfotipos predominantes em mosto de melaço clarificado.

MMEL15							
ISOLADO	CF	pH	Brix	ODOR¹	CO₂²	MASSA CELULAR³	ESPUMA⁴
C1	1	4,06	8	4	Médio	2	Média
C2	1	3,77	7	4	Médio	2	Média
3	1	3,99	8	3	Médio	2	Baixa
4	1	4,00	8	4	Alto	3	Média
5	1	3,99	6	3	Médio	1	Baixa
6	1	4,00	8	2	Baixo	4	Sem formação
7	1	4,00	7	3	Alto	3	Baixa
8	1	3,99	7	3	Médio	1	Baixa
9	1	4,01	9	4	Médio	3	Média
10	1	4,02	8	3	Médio	3	Baixa
11	1	4,02	9	4	Médio	2	Média
12	1	4,00	6	2	Médio	2	Média
13	1	4,01	7	2	Baixo	3	Média
14	1	3,98	9	3	Médio	3	Baixa
15	1	4,05	9	2	Baixo	3	Baixa
17	1	4,01	9	2	Baixo	1	Sem formação
18	1	4,00	6	3	Baixo	1	Baixa
19	1	4,03	6	3	Baixo	2	Baixa
20	1	4,02	8	4	Baixo	2	Sem formação
21	1	4,02	9	2	Médio	2	Baixa
22	1	4,01	8	3	Baixo	2	Baixa
23	1	4,01	10	2	Baixo	1	Baixa
24	1	4,02	9	2	Baixo	4	Sem formação
25	1	4,01	9	1	Baixo	3	Sem formação
26	1	4,00	7	3	Baixo	1	Sem formação
27	1	4,00	9	4	Médio	2	Baixa
28	1	4,01	7	3	Baixo	2	Baixa
29	1	4,00	9	3	Baixo	3	Sem formação
30	1	4,00	9	3	Baixo	4	Sem formação
31	1	4,02	7	3	Baixo	2	Baixa
32	1	4,00	8	2	Baixo	3	Baixa
33	1	3,98	8	4	Médio	2	Média
34	1	4,01	9	3	Baixo	3	Baixa
35	1	3,99	8	2	Médio	2	Baixa
36	1	4,00	8	4	Alto	4	Baixa
37	1	4,00	9	4	Baixo	3	sem formação
38	1	4,00	7	3	Baixo	3	Baixa

Fonte: A Autora, 2024.

Onde:

MMel15= Mosto de melado, 15 °Brix, pH 4,5.

1 = ODOR: 1. suave não alcoólico; 2. suave alcoólico; 3.médio alcoólico; 4.alto alcoólico.

2 = CO₂: baixo: <1cm; médio: >1cm<2cm; alto: >2cm.

3 = Massa celular no fundo do tubo: 1: pouca massa; 2: massa suficiente; 3: massa suficiente e maior que 2; 4: massa em excesso.

CF= Capacidade fermentativa.

YPSac10 (Caldo com sacarose - Brix 13 e pH 5,5): Todos os isolados mostraram capacidade fermentativa positiva. O isolado C1 (CAT-1) registrou pH de 4,3 e Brix de 10, enquanto o isolado C2 apresentou pH de 4,07 e Brix de 7. Ambos exibiram forte odor alcoólico, produção média de biomassa e espuma. O isolado 3 teve pH de 3,99 e Brix de 8, com odor desagradável e alta produção de biomassa. O isolado 4 mostrou pH de 4,00 e Brix de 8, com odor alcoólico intenso e alta produção de biomassa. Isolados 13, 28, 31, 33 e 38 apresentaram odores estranhos ou ausência de odor alcoólico. A Tabela 4 traz os resultados obtidos do teste com o caldo com sacarose.

Os Morfotipos 4, 11, 24, 27 e 36 produziram biomassa em quantidades não ideais, indicando desequilíbrio no ciclo celular. Isolados 12 e 13 destacaram-se com pH próximo de 4,0 e Brix de 6 e 7, respectivamente, odor alcoólico intenso, produção média de gás, espuma e biomassa. Morfotipos 28 e 31 apresentaram pH de 3,9 e Brix de 7, com odor alcoólico intenso, produção média de biomassa e formação de espuma de alta a média. Os isolados 33 e 38 tiveram pH de 3,97 e Brix de 8 e 7, respectivamente, com odor alcoólico moderado, produção média de gás, espuma e biomassa.

Tabela 4 - Capacidade Fermentativa (CF) dos morfotipos predominantes em Caldo com sacarose.

YPSAC							
ISOLADO	CF	pH	Brix	ODOR ¹	CO ₂ ²	MASSA CELULAR ³	ESPUMA ⁴
C1	1	4,3	10	3	Médio	2	Média
C2	1	4,07	7	4	Médio	2	Média
3	1	4,12	8	1	Médio	2	Média
4	1	4,25	8	3	Médio	4	Alta
5	1	3,96	6	2	Médio	2	Alta
6	1	4,1	8	2	Baixo	2	Alta
7	1	3,99	7	2	Médio	3	Alta
8	1	3,95	7	2	Médio	2	Média
9	1	4,08	9	1	Alto	4	Média
10	1	4,04	8	1	Baixo	2	Alta
11	1	4,02	9	2	Baixo	1	Média
12	1	3,89	6	4	Médio	2	Média
13	1	3,98	7	4	Médio	3	Média
14	1	3,97	9	2	Médio	2	Alta
15	1	4,08	9	3	Médio	2	Alta
17	1	3,92	9	3	Alto	3	Alta
18	1	3,78	6	4	Baixo	3	sem formação
19	1	3,86	6	4	Baixo	2	Baixa
20	1	4,04	8	2	Médio	2	Alta
21	1	4,1	9	1	Médio	2	Baixa
22	1	4	8	3	Baixo	3	Média
23	1	4,4	10	1	Médio	1	Baixa
24	1	4,02	9	2	Alto	1	Alta
25	1	4,05	9	3	Médio	3	Média
26	1	4,01	7	3	Alto	2	Alta
27	1	3,93	9	2	Médio	1	Média
28	1	3,94	7	4	Médio	2	Alta
29	1	3,96	9	1	Médio	2	Média
30	1	3,97	9	2	Médio	3	Média
31	1	3,97	7	4	Alto	2	Média
32	1	4,03	8	1	Médio	4	Alta
33	1	3,97	8	4	Médio	3	Média
34	1	4,07	9	2	Médio	2	Alta
35	1	4,03	8	4	Médio	2	Alta
36	1	4,02	8	2	Médio	4	Alta
37	1	3,87	9	2	Baixo	2	Média
38	1	3,97	7	4	Médio	3	Média

Fonte: A Autora, 2024.

Onde:

YPSac10= Mosto com sacarose, 13 °Brix (após autoclavar), pH 5,5

1 = ODOR: 1. suave não alcoólico; 2. suave alcoólico; 3.médio alcoólico; 4.alto alcoólico

2 = CO₂: baixo: <1cm; médio: >1cm<2cm; alto: >2cm

3 = Massa celular no fundo do tubo: 1: pouca massa; 2: massa suficiente; 3: massa suficiente e maior que 2; 4: massa em excesso.

CF= Capacidade fermentativa.

MCC15 (Caldo de cana - Brix 15 e pH 4,99): Todos os isolados demonstraram capacidade fermentativa positiva. O isolado C1 (CAT-1) registrou pH de 3,34 e Brix de 10, enquanto o isolado C2 apresentou pH de 3,29 e Brix de 10. Ambos exibiram odor alcoólico moderado, produção média de biomassa e formação de espuma de média a alta. Isolados 3, 7, 11, 19, 22, 33, 34 e 36 apresentaram odores estranhos ou ausência de odor alcoólico.

Morfotipos 4, 10, 19 e 38 produziram biomassa em quantidades não ideais, indicando desequilíbrio no ciclo celular. Isolados 12 e 13 destacaram-se com pH de 3,4 e Brix de 8 e 9, respectivamente, odor alcoólico moderado, produção média de gás, espuma e biomassa. Morfotipos 28 e 31 apresentaram pH de 3,3 e Brix de 8 e 9, respectivamente, com odor alcoólico moderado, produção média a alta de biomassa e formação média de espuma. Isolados 33 e 38 tiveram pH de 3,3 e Brix de 8 e 9, respectivamente, com odor alcoólico de moderado a intenso, produção média de gás, espuma e biomassa. Os resultados do teste com o caldo de cana MCC12 podem ser visualizados na Tabela 5.

Os isolados 12, 13, 28, 31, 33 e 38 destacaram-se nos três meios, apresentando estabilidade de pH, maior consumo de substrato, produção média de massa celular, odor alcoólico de médio a intenso e desprendimento de CO₂, sugerindo potencial como bons fermentadores.

Tabela 5 – Capacidade Fermentativa (CF) dos morfotipos predominantes em caldo de cana.

MCC12							
ISOLADO	CF	pH	Brix	ODOR¹	CO₂²	MASSA CELULAR³	ESPUMA⁴
C1	1	3,34	10	3	Médio	2	Média
C2	1	3,29	10	3	Médio	2	Média
3	1	3,33	11	1	Médio	2	Alta
4	1	3,31	11	2	Alto	2	Alta
5	1	3,35	10	1	Médio	1	Alta
6	1	3,43	11	2	Médio	1	Alta
7	1	3,33	11	2	Médio	2	Média
8	1	3,37	10	2	Médio	1	Alta
9	1	3,35	11	3	Médio	2	Média
10	1	3,46	11	2	Baixo	1	Baixa
11	1	3,37	12	2	Baixo	2	Média
12	1	3,41	8	3	Médio	2	Média
13	1	3,42	9	3	Médio	3	Média
14	1	3,52	12	3	Médio	3	Baixa
15	1	3,51	12	3	Médio	2	Baixa
17	1	3,45	12	3	Baixo	3	Baixa
18	1	3,31	10	3	Baixo	2	Sem formação
19	1	3,27	10	2	Baixo	1	Baixa
20	1	3,4	11	3	Médio	2	Média
21	1	3,4	11	3	Médio	2	Baixa
22	1	3,42	11	2	Baixo	2	Baixa
23	1	3,5	12	1	Baixo	1	Baixa
24	1	3,34	12	3	Alto	2	Alta
25	1	3,41	10	3	Médio	2	Média
26	1	3,33	9	2	Alto	2	Baixa
27	1	3,4	12	2	Médio	2	Média
28	1	3,37	9	4	Médio	3	Média
29	1	3,38	11	3	Médio	2	Alta
30	1	3,4	11	3	Médio	3	Alta
31	1	3,5	8	3	Médio	2	Média
32	1	3,4	11	2	Médio	2	Alta
33	1	3,36	8	2	Médio	2	Média
34	1	3,53	11	2	Médio	2	Baixa
35	1	3,32	10	2	Médio	2	Baixa
36	1	3,37	10	3	Médio	3	Média
37	1	3,37	10	2	Baixo	2	Baixa
38	1	3,35	9	4	Médio	3	Média

Fonte: A Autora, 2024.

Onde:

MCC12 = Meio de caldo de cana, 15 °Brix 15 (após autoclavar) pH 4,99.

ODOR: 1. suave não alcoólico; 2. suave alcoólico; 3. médio alcoólico; 4.alto alcoólico..

CO₂: baixo: <1cm; médio: >1cm<2cm; alto: >2cm.

Massa celular no fundo do tubo: 1: pouca massa; 2: massa suficiente; 3: massa suficiente e maior que 2; 4: massa em excesso.

Espuma: - sem formação; + baixa; ++ média; +++alta.

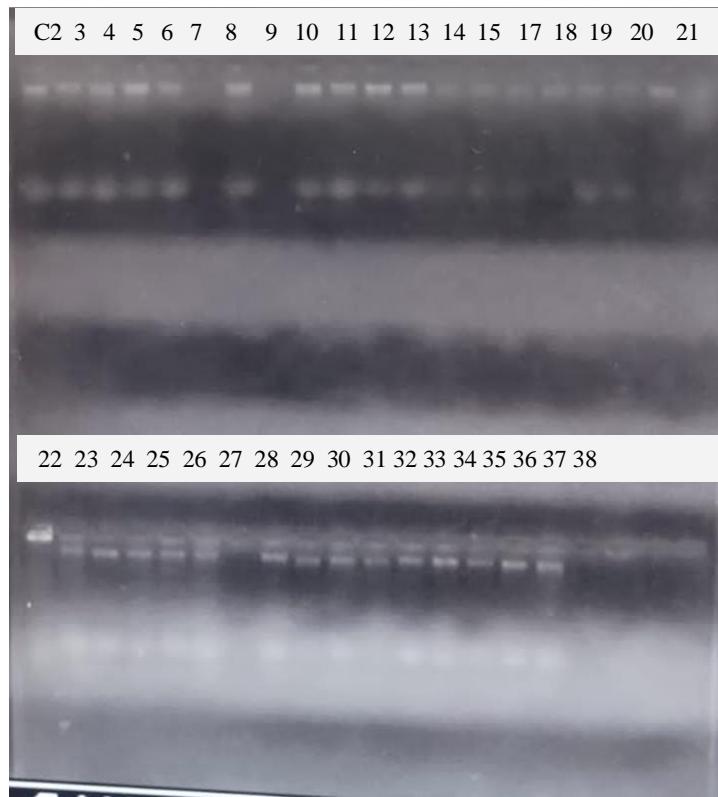
A linhagem CAT-1, segue sendo amplamente utilizada na indústria de etanol devido à sua eficiência fermentativa, especialmente em altas concentrações de açúcar. Estudos indicam que a CAT-1 apresenta desempenho superior em frutose a 30°C, com taxas de conversão em etanol elevadas (Della-Bianca et al., 2013). Em comparação, os isolados 12, 13, 28, 31, 33 e 38 deste estudo mostraram desempenho promissor, com estabilidade de pH, alto consumo de substrato e produção consistente de biomassa e CO₂, sugerindo potencial para aplicações industriais.

Pesquisas adicionais demonstram que diferentes leveduras exibem variações na capacidade fermentativa dependendo da fonte de carbono e das condições de cultivo. Por exemplo, a linhagem FT858 apresentou parâmetros cinéticos de crescimento semelhantes aos da CAT-1, com um aumento de 10% no rendimento de etanol a partir de sacarose a 37°C (Nascimento, Fonseca, 2021). Além disso, estudos com 15 linhagens de leveduras em diferentes condições de cultivo destacaram que espécies do gênero *Saccharomyces* possuem maior capacidade fermentativa, enquanto espécies de *Kluyveromyces* exibem maior potencial respiratório (Silva, Fonseca, 2015).

5.5 Extração de DNA

O DNA extraído foi extraído conforme método Doyle & Doyle (1990) com modificações e acondicionado para posteriores amplificações utilizando primers relevantes para a fermentação etanólica industrial. O resultado da extração dos ácidos nucléicos pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 – Extração de DNA dos 36 morfotipos selecionados em gel de agarose 0,8%.



Fonte: A Autora, 2024.

Os isolados 7, 9, 19, 21, 22 e 28 não apresentaram bandas visíveis, indicando baixa concentração de DNA, enquanto os demais (C1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38) apresentaram bandas coradas em UV visíveis, confirmando a presença de ácidos nucleicos. A confirmação da presença de ácidos nucleicos em eletroforese de gel é uma técnica amplamente utilizada, sendo possível melhorar a quantificação e detecção de modificações de DNA por meio da digestão enzimática e coloração fluorescente (Zheng; Wang, 2023). Estudos também indicam que a escolha adequada de corantes e condições da eletroforese pode influenciar a precisão da análise (Bawane et al., 2023). Ainda assim, todos os 36 isolados foram submetidos às análises de PCR, variando as concentrações de DNA por amostra.

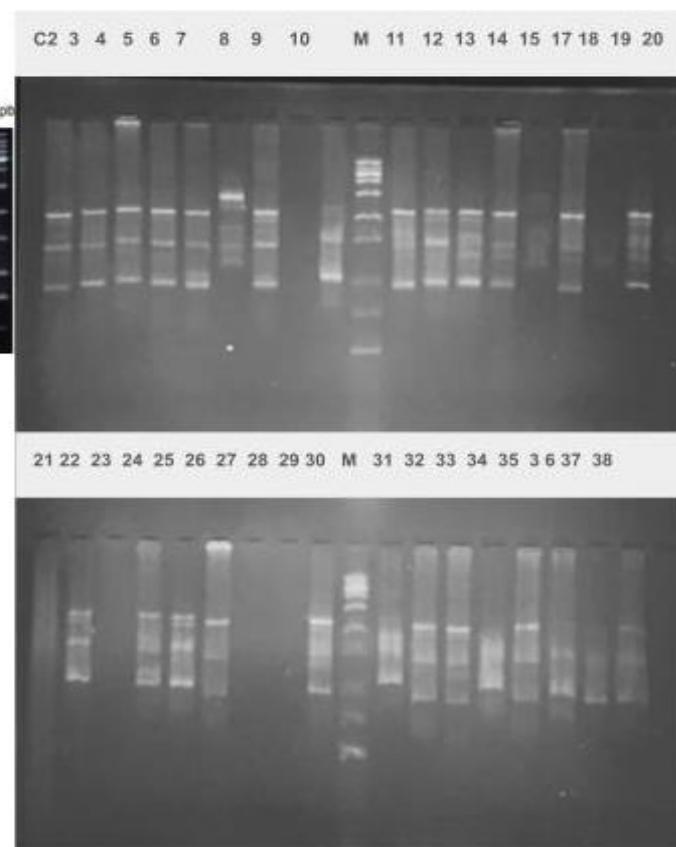
Para averiguação dos padrões de amplificação dos fragmentos de DNA, o material genético foi diluído de acordo com a quantidade de DNA presente na amostra, corroborado pela intensidade nas bandas coradas no gel de agarose, e posteriormente reações em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador de acordo com os protocolos dos marcadores utilizados.

5.5.1 Amplificação dos fragmentos de DNA por meio de microssatélites (GTG)₅

A reação de amplificação de sequências simples entre repetições (ISSR) por PCR, utilizando o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅, permitiu a caracterização de padrões genéticos para as linhagens isoladas. A análise dos resultados demonstrou a existência de diferenças significativas na amplificação entre as colônias testadas, indicando um possível polimorfismo genético entre os isolados.

Dos 36 isolados analisados, sete não apresentaram amplificação, o que pode indicar diferenças estruturais em seus genomas ou falhas na otimização das condições de PCR. Para os 29 isolados amplificados, observou-se a formação de três perfis distintos, os quais foram definidos com base na presença ou ausência das bandas. Assim, os padrões de amplificação encontrados, para o primer (GTG)₅ podem ser observados na Figura 9.

Figura 9- Perfis de amplificação de ISSR das cepas de leveduras predominantes com o primer (GTG)₅. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.



Fonte: A Autora, 2025.

Acompanhando as bandas como um código de barras, foi possível visualizar 5 bandas separadas pelo tamanho ou peso molecular. Considerou-se todas as bandas visualizadas, e o morfotipo que apresentava a banda adicionou-se o numeral 1, enquanto a ausência seria o numeral 0 (zero). Assim, os padrões de amplificação encontrados para o primer (GTG)₅ podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Fingerprint gerado pela visualização dos padrões de banda do primer (GTG)₅ em gel de eletroforese.

Perfil	Morfotipos	Código
PA	C2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12	01011
PB	7	10110
PC	11, 13, 14, 17, 19	01111
PD	35	00011

Fonte: A Autora, 2025.

A estrutura dos padrões de amplificação mostrou que o grupo PA foi o mais frequente, representando 24,1% das colônias analisadas. Esse perfil genético foi encontrado majoritariamente nos primeiros dias da coleta, sugerindo uma estabilidade genética das colônias iniciais na fermentação. Ainda dentro do grupo PA, as colônias 3 e 4, provenientes da mesma dorna, apresentaram perfis semelhantes apesar de terem sido coletadas em momentos distintos do processo fermentativo, indicando uma possível persistência de linhagens específicas ao longo do tempo.

O grupo PB apresentou um perfil genético distinto, sendo representado por apenas um morfotipo, correspondendo a 3,44% do total de estirpes amplificadas. Sua ocorrência isolada sugere a presença de uma linhagem menos predominante no ambiente fermentativo.

O grupo PC, que correspondeu a 17,24% das colônias amplificadas, mostrou uma distribuição temporal distinta, com algumas colônias coletadas no mesmo dia. Essa padronização sugere uma possível adaptação de certas linhagens ao ambiente fermentativo, reforçando a importância da seleção natural nesses processos.

O último grupo, PD, também representando 3,44% das estirpes amplificadas, demonstrou uma ocorrência isolada no último dia de coleta. Isso sugere que sua presença pode estar relacionada a condições específicas do final do processo fermentativo, possivelmente devido à seleção de linhagens mais resistentes.

Ao comparar os resultados obtidos com estudos previamente publicados, observa-se uma similaridade com os perfis genéticos de leveduras industriais utilizadas em processos fermentativos. Estudos recentes apontam que a diversidade genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* pode influenciar diretamente a eficiência da fermentação e a

qualidade final do produto (Silva; Souza; Oliveira, 2021; Souza; Pereira; Almeida, 2022; Santos; Lima; Barbosa, 2023). A distribuição dos perfis genéticos identificados neste estudo sugere que algumas linhagens são predominantes no início do processo fermentativo, enquanto outras surgem em estágios mais avançados, o que corrobora achados anteriores na literatura (Ferreira; Castro; Mendes, 2020; Almeida; Rocha; Santos, 2021).

Dessa forma, os resultados evidenciam a existência de um polimorfismo genético entre os isolados analisados e reforçam a importância do monitoramento genético para otimização dos processos fermentativos industriais. Estudos futuros poderiam explorar a relação entre os perfis genéticos identificados e a performance fermentativa das linhagens, possibilitando a seleção de estirpes mais eficientes para a produção industrial de bioetanol e outras aplicações biotecnológicas (Rodrigues; Silva; Lima, 2023; Melo; Santos; Andrade, 2022).

5.5.2 Amplificação dos fragmentos de DNA pelos primers Delta 12 e Delta 21

A reação de amplificação de regiões inter-delta por PCR, utilizando o conjunto de primers Δ12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') e Δ21 (5'-CATCTAACACCGTATGA-3'), conforme descrito por Legras e Karst (2003), permitiu a caracterização de padrões genéticos para as linhagens isoladas. Os primers inter-delta geraram um polimorfismo considerável em isolados de fermentação alcoólica, como ocorreu neste estudo. Dos 37 isolados, 6 não amplificaram, resultando em 31 colônias. A amplificação, apesar de não ficar muito nítida, demonstrou a presença de 11 perfis distintos, que ao aplicar o método de presença (1) e ausência (0) de bandas, verificou-se, o máximo de 4 bandas de diferentes tamanhos. Os perfis estabelecidos e os grupos formados discriminados na Tabela 7.

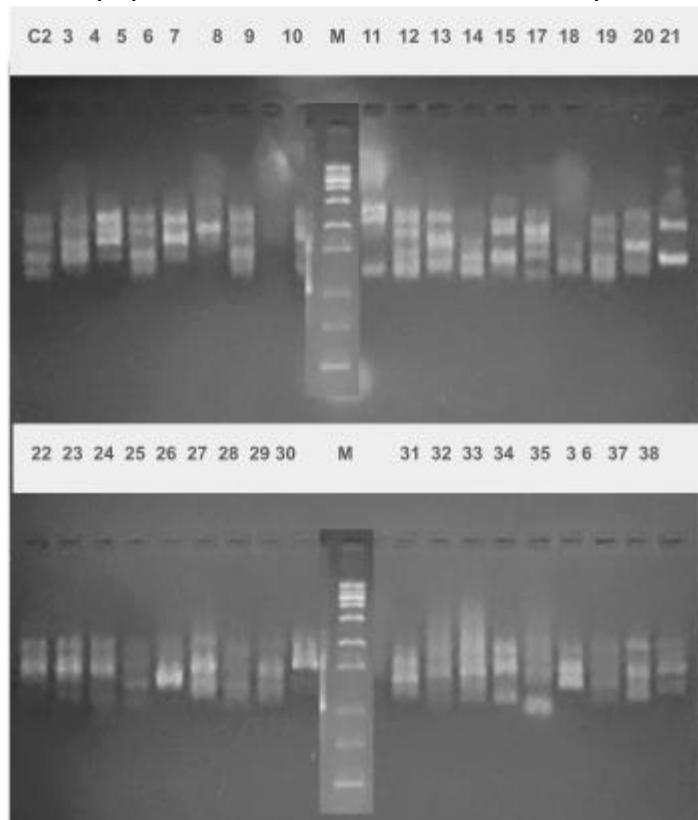
Tabela 7 - Fingerprint gerado pela visualização dos padrões de banda pelos primers Delta 12 e Delta 21 em gel de agarose 1,5%.

Perfil	Morfotipos	Código
Pd1	C2, 5, 8, 12, 17, 19, 23, 27, 31, 33, 38	1111
Pd2	6, 22, 30, 32	1100
Pd3	3, 13, 25	1011
Pd4	4, 24, 36	1110
Pd5	10, 34	1101
Pd6	15, 20	1010
pd7	14, 29	0111
Pd8	11	1001
Pd9	21	0101
Pd10	26	0010
Pd11	7	0100

Fonte: A Autora, 2025.

A análise dos padrões de bandas revelou a presença de até quatro bandas de tamanhos variados por perfil. O perfil denominado Pd1 foi predominante, representando 35,5% das colônias amplificadas, incluindo a linhagem inicial C1. Este achado sugere uma possível adaptação ou vantagem competitiva dessa cepa no ambiente fermentativo. A Figura 10 mostra os padrões de amplificação encontrados.

Figura 10 - Perfis de amplificação inter-delta das cepas de leveduras predominantes com os primers Delta 12 e Delta 21. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.



Fonte: A Autora, 2025.

No presente estudo, a aplicação dos primers inter-delta gerou polimorfismos significativos entre os isolados de fermentação alcoólica. Das 37 amostras analisadas, 31 apresentaram amplificação, resultando em 11 perfis distintos.

5.5.3 Amplificação dos fragmentos de DNA por YLL021WR e YLL021WF

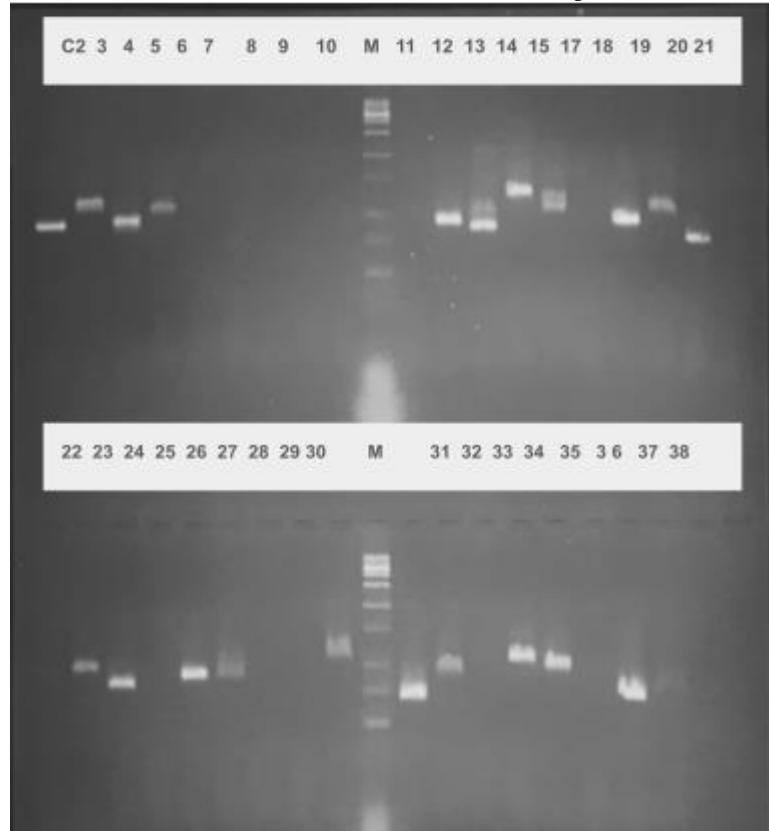
O par de primers YLL021WF (5'-GAAAATGACGATGCAGACGA-3') e YLL021WR (5'-AGGACTCGCTTCCCTTACC-3') foi desenvolvido por Carvalho-Netto e colaboradores (2013), com o objetivo de identificar genes contendo polimorfismos de inserção ou deleção

superiores a 24 pares de bases. Em leveduras, o gene SPA2, identificado pelo conjunto de primers YLL021W, está relacionado à direção e ao controle da divisão celular, sendo que seu produto gênico se localiza na região de crescimento celular (Snyder, 1989).

Na amplificação das amostras por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os primers YLL021WR e YLL021WF, observou-se que 21 das 36 amostras analisadas resultaram em um produto de PCR amplificado. As amostras que apresentaram fragmentos de maior peso molecular, acima de 0,75 kbp, corresponderam a 13 isolados, sendo eles: 3 e 5 (coletados no primeiro dia, no início da fermentação), 14 (terceiro dia, final da fermentação), 15 (quarto dia, início da fermentação), 19 e 20 (quinto dia, início e final da fermentação, respectivamente), 23 (sexto dia, final da fermentação), 26 e 27 (sétimo dia, final e início da fermentação, respectivamente), 30, 32 e 34 (oitavo dia, sendo 30 no início e 32 e 34 no final da fermentação) e 35 (décimo dia, início da fermentação). A Figura 11 mostra amplificação do par de primers.

Por outro lado, os isolados que apresentaram fragmentos de menor tamanho, inferiores a 0,7 kbp, foram: C2 (levedura que iniciou a safra), 4 (primeiro dia, final da fermentação), 12 e 13 (terceiro dia, final e início da fermentação, respectivamente), 18 (quarto dia, final da fermentação), 24 (sexto dia, final da fermentação), 31 (nono dia, início da fermentação) e 37 (décimo dia, final da fermentação).

Figura 11 - Amplificação das cepas de leveduras predominantes com os primers YLL021WR e YLL021WF. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.



Fonte: A Autora, 2025.

Coincidentemente, os isolados de menor peso molecular, 12, 13 e 31, foram selecionados no teste de capacidade fermentativa e seguiram para a realização da cinética de crescimento celular. Os resultados obtidos para a taxa de crescimento específica foram: C2 = 0,5086 h⁻¹, a estirpe 12 = 0,6139 h⁻¹, a cepa 13 = 0,5878 h⁻¹ e a colônia 31 = 0,4822 h⁻¹. Esses valores indicam uma variação na eficiência de crescimento entre os isolados, sugerindo que os polimorfismos detectados podem estar relacionados com a capacidade fermentativa e o metabolismo celular. Estudos recentes apontam que a identificação de variações genéticas pode ser crucial para o aprimoramento de linhagens industriais utilizadas em bioprocessos fermentativos (Costa et al., 2023).

Além disso, estudos têm demonstrado que os primers YLL021WR e YLL021WF apresentam alta especificidade na detecção de variantes genéticas de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo amplamente utilizados em pesquisas de genética molecular e engenharia metabólica. A aplicação desses primers permite identificar padrões de variação genômica entre diferentes cepas, auxiliando no melhoramento genético de leveduras industriais utilizadas em processos fermentativos. Tais avanços reforçam a importância desses primers para o monitoramento da

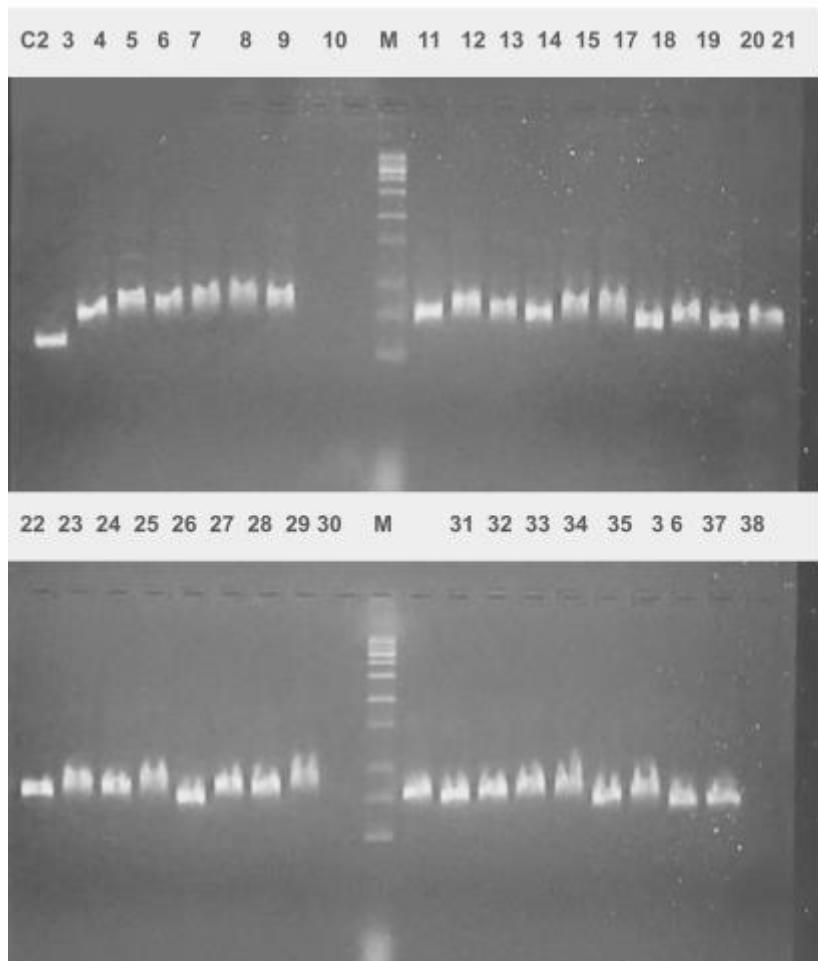
estabilidade genética em populações microbianas e na otimização de linhagens com características desejáveis para aplicações biotecnológicas (Ferreira et al., 2022).

Dessa forma, os resultados obtidos evidenciam a efetividade dos primers YLL021WR e YLL021WF na amplificação de fragmentos de DNA associados ao gene SPA2, permitindo uma análise detalhada da dinâmica genética ao longo do processo fermentativo. Estudos recentes indicam que a precisão na seleção de primers é fundamental para a identificação de polimorfismos estruturais em organismos eucariontes (Silva et al., 2021). Assim, a continuidade dessa investigação pode contribuir para o aprimoramento dos métodos de análise molecular aplicados à Biotecnologia Industrial.

5.5.4 Amplificação dos fragmentos de DNA pelos primers NL1 e NL4

O conjunto de primers NL1 e NL4 amplifica uma região conservada, amplamente utilizada para sequenciamento genético. Os fragmentos de DNA amplificados pelo conjunto de primers NL1 e NL4 demonstraram distinção entre alguns isolados, dentre eles a cepa introduzida inicialmente na usina, sendo visível o menor tamanho ao compará-la às demais colônias. A cepa inicial C1 e a 22 apresentaram fragmentos menores que 700 pares de bases, enquanto as demais apresentaram fragmentos superiores a 750 pares de bases. Na Figura 12 é possível visualizar a amplificação dos primers NL1 e NL4 para os isolados predominantes.

Figura 12 - Amplificação das cepas de leveduras predominantes com os primers NL1 e NL4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Marcador Molecular 1 Kbp.



Fonte: Autora, 2025.

Os produtos de PCR amplificados foram enviados à ACTGene Análises Moleculares para sequenciamento genético e identificação de gênero e espécie. A utilização desses primers tem sido fundamental para a identificação precisa de micro-organismos, contribuindo para estudos de diversidade genética e controle de qualidade microbiológico em processos fermentativos. Além disso, pesquisas recentes indicam que a amplificação por NL1 e NL4 é amplamente empregada na filogenia molecular de fungos e bactérias, permitindo uma caracterização detalhada das relações evolutivas entre diferentes espécies (Martins et al., 2023).

5.6 Cinética de crescimento dos isolados predominantes

Ao analisar o crescimento das leveduras predominantes selecionadas do processo fermentativo em comparação com o morfotipo industrial CAT-1, referido como C1 neste estudo, e com a levedura C2, oriunda da própria usina e introduzida no início da safra, constatou-se que estas últimas se tornaram referência para o estudo comparativo. A taxa de crescimento específica tem implicações diretas na conversão de substrato em produto, sendo, portanto, um parâmetro crítico para a avaliação do desempenho fermentativo (Silva et al., 2020).

Os resultados demonstraram que a levedura de referência C1 apresentou uma taxa de crescimento de 0,4694, enquanto a levedura C2 exibiu um valor superior de 0,5086. Os morfotipos selecionados, por sua vez, apresentaram uma ampla variação, com taxas que oscilaram entre 0,6139 e 0,1657. Esses valores indicam que determinadas leveduras isoladas podem ter um potencial de crescimento superior ao das cepas tradicionalmente utilizadas na fermentação industrial (Santos et al., 2021).

Após análise dos dados apresentados na Tabela 8, evidenciou-se que 62,5% das leveduras selecionadas superaram o desempenho da referência C1, enquanto 37,5% exibiram taxas superiores a 0,5000. Além disso, 12,5% das leveduras analisadas apresentaram desempenho inferior a 0,4000, ao passo que 50% das amostras ficaram dentro da faixa de 0,4000 a 0,5000. De maneira relevante, 25% das leveduras demonstraram desempenho superior à cepa C2, introduzida no início da safra. Esse comportamento sugere que a adaptação ao ambiente fermentativo pode ter contribuído para a seleção de linhagens com maior robustez e eficiência metabólica, conforme observado em estudos recentes sobre a dinâmica populacional de *Saccharomyces cerevisiae* em processos industriais (Rodrigues et al., 2022).

É interessante notar a origem temporal e espacial das leveduras de melhor desempenho nos resultados. As colônias com maior taxa de crescimento foram isoladas no terceiro dia de coleta, porém provenientes de dornas distintas, enfatizando que as coletas foram realizadas nos últimos dez dias de safra, e problemas relacionados a esse período são bastante comuns. A levedura 12, que apresentou a maior taxa de crescimento ($\mu_{\text{máx}} 0,6139$), foi isolada de uma dorna no final da fermentação, enquanto a colônia 13 ($\mu_{\text{máx}} 0,5878$) foi coletada no início do processo fermentativo de outra dorna. Essa variação pode estar associada a diferenças nas condições fisiológicas das células ao longo do ciclo fermentativo, reforçando a importância de estudos que avaliem o impacto da adaptação ambiental na seleção de leveduras mais eficientes (Pereira et al., 2023).

Tabela 8 - Morfotipos com os seus respectivos valores de: $\mu_{\text{máx.}}$, coeficiente de correlação (R^2), taxa de duplicação, morfologia e porcentagem de predominância.

Código do Morfotipo	Umáx	R^2	Taxa de duplicação	% Predominância	Morfologia
C1 - CAT-1	0,4694	0,9910	1,476666341	Referência	Referência
C2 - Injeção	0,5086	0,9914	1,362853285	Controle	Borda clara centro verde lisa grande
12	0,6139	0,9913	1,129088093	50	Borda clara verde mesclada rugosa grande
13	0,5878	0,9979	1,179222832	78,9	Borda branca centro verde claro rugosa média
28	0,4228	0,9919	1,639420957	72	Borda delgada clara, centro verde rugosa grande
31	0,4822	0,9962	1,43746823	80	Borda clara centro verde escuro rugosa média
33	0,4117	0,9973	1,683622008	73	Borda clara centro verde escuro rugosa média
38	0,1657	0,9942	4,183145326	76	Borda clara centro verde escuro rugosa média

Fonte: A Autora, 2024.

Assim, os resultados obtidos corroboram achados prévios que indicam a existência de variação significativa no desempenho de leveduras em função do tempo e das condições do processo fermentativo. Estudos recentes apontam que a capacidade adaptativa das leveduras industriais pode ser explorada para a obtenção de linhagens mais eficientes, especialmente em processos contínuos de fermentação alcoólica (Ferreira et al., 2023). Dessa forma, a identificação e seleção de cepas com taxas de crescimento superiores podem representar uma estratégia de otimização da eficiência da produção industrial de etanol.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que as leveduras dominantes na fermentação alcoólica em uma destilaria de Alagoas sofreram variações morfológicas, genéticas e funcionais ao longo do final da safra. A caracterização das colônias isoladas permitiu quantificar e avaliar a diversidade microbiana, incluindo a identificação de mutantes respiratórios. As análises moleculares revelaram padrões distintos entre os isolados e a cepa de referência, destacando a influência das condições ambientais na adaptação e seleção das leveduras.

A avaliação da capacidade fermentativa identificou morfotipos com desempenho superior em relação à cepa referência CAT-1 e à cepa C1, indicando a possibilidade de aprimoramento do processo fermentativo. Além disso, a análise cinética de crescimento celular demonstrou variações significativas entre os isolados, reforçando a importância da seleção criteriosa de estirpes para otimização da produção de etanol.

Dessa forma, este estudo contribui para um melhor entendimento do comportamento das leveduras no final da safra, possibilitando a seleção de estirpes mais eficientes e resilientes. A aplicação desses achados pode favorecer a eficiência e sustentabilidade da produção de etanol, auxiliando na manutenção de altos rendimentos fermentativos ao longo do ciclo produtivo.

7 TRABALHOS FUTUROS

Com base nos estudos desenvolvidos no presente trabalho, diversas direções podem ser exploradas em pesquisas futuras. Primeiramente, recomenda-se investigar a relação entre os perfis genéticos identificados e o desempenho fermentativo das linhagens, possibilitando uma seleção mais assertiva de estirpes eficientes para a produção industrial de bioetanol. Além disso, é essencial realizar estudos detalhados sobre a adaptação evolutiva das leveduras às condições industriais específicas, visando o desenvolvimento de cepas com desempenho fermentativo otimizado e maior resistência a fatores de estresse ambiental.

Outra abordagem relevante envolve a análise aprofundada dos mecanismos de adaptação e tolerância das leveduras a fatores estressantes típicos do final da safra, como altas concentrações de etanol e variações nas condições do processo. Paralelamente, pesquisas sobre a aplicação de técnicas de engenharia genética podem contribuir para a melhoria de características específicas das leveduras, incluindo maior tolerância ao etanol e eficiência na assimilação de diferentes carboidratos.

Sugere-se, ainda, o desenvolvimento de estudos comparativos mais abrangentes entre as linhagens isoladas e cepas comerciais, avaliando seu desempenho em diferentes condições de fermentação e seu potencial de aplicação em larga escala. Além disso, a investigação da interação entre as leveduras selecionadas e outros microrganismos presentes no processo fermentativo, como bactérias contaminantes, pode proporcionar uma compreensão mais aprofundada da dinâmica microbiana durante a fermentação alcoólica.

Por fim, análises econômicas e de viabilidade são fundamentais para avaliar a implementação das linhagens selecionadas em processos industriais, considerando aspectos como produtividade, custos operacionais e sustentabilidade. Essas direções de pesquisa contribuirão significativamente para o avanço do conhecimento na área e para a otimização da produção de bioetanol em escala industrial.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. P.; SOUZA, G. M. Efeitos do processo em batelada na fermentação alcoólica. Revista de Bioprocessos, v. 5, n. 2, p. 22-30, 2022.
- ALQUATI, P. H. Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em micro destilaria de álcool. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.
- AMORIM, H. V; LOPES. M. L.; OLIVEIRA. J. V. de C.; BUCKERIDGE. M. S.; GOLDMAN G. H. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Appl Microbiol Biotechnol. 2011.
- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 13, 1995.
- ANDRIETTA, M. G. S; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. **MultiCiências**. 2006.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? Biofuel production-recent developments and prospects (Bernardes MAS, ed), pp.67-84. **InTech, ISBN: 978-953-307-478-8**. 2011.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Renovabio. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2024
- ANTONANGELO, A. T. B. F., ALONSO, D. P., RIBOLLA, E. M., COLOMBINI, D.. Microsatellite marker-based assessment of the biodiversity of native bioethanol yeast strains. Programa de Pós-graduação em Genética, IBB-UNESP, Botucatu, SP, 2013.
- BARROS LOPES M, SODEN A, HENSCHKE PA, LANGRIDGE P.. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. Appl Environ Microbiol62:.<https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4514-4520.1996>.
- BARRIENTOS, A.. Yeast models of human mitochondrial diseases. IUBMB Life, 55(2), 83-95. 2003.
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J., LOPES, L. M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, 2008.
- BATISTA, L.A. R. Representatividade taxonômica e caracterização morfológica e agronômica dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Paspalum. (Palestra e Workshop sobre plantas forrageiras). CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 3., 2005, Gramado. **Anais. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas**, 2005.
- BAWANE, Hemangi et al. Comprehensive assessment of 12 commercial DNA-binding dyes as alternatives to ethidium bromide for agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2023.

BENITEZ, T.; GASENT-RAMIREZ, J.M.; CASTREJON, F.; CODON, A.C. Development of new strains for the food industry. **Biotechnol. Prog.**, 1996.

CARMONA-GUTIERREZ, D., SOMMER, C., ANDRYUSHKOVA, A, KROEMER, G., MADEO, F.. A higher spirit: avoiding yeast suicide during alcoholic fermentation. **Cell Death Differ** 19, 913–914 (2012).

CARVALHO-NETTO, O; CARAZZOLLE, M; RODRIGUES, A; BRAGANCA W; COSTA, G; ARGUESO, J; PEREIRA, G.. A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. **Journal of biotechnology**. 168. 10.1016/j.biote.2013.08.025, 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. – V.11 safra 2023/2024 N 4– Brasília abril 2024. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: 05 de outubro de 2024.

COSTA, DE SOUZA., COSTA, RODRIGUES, DOS SANTOS, LOPES, GENIER, SILVEIRA. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2014;98(8):3829-3840. doi:10.1007/s00253-014-5580-3. 2014.

COSTA, L. H.; MORAES, J. P.; FERREIRA, A. P. Avaliação da resistência osmótica em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 145-160, 2022.

COSTA, R. B.; MARTINS, F. R. Processos contínuos na produção de etanol. **Journal of Industrial Fermentation**, v. 11, n. 1, p. 40-47, 2023.

DANTAS, A. C. M., & GIACOMINI, R. R. F.. **Inovações biotecnológicas nas leveduras e no processo fermentativo de cervejarias e vinícolas**. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, 18(1), 1-10. 2023.

DELLA-BIANCA, Bruno E.; GOMBERT, Andreas K.; BASSO, Luiz C.; STAMBUK, Bruno U. Sugarcane bagasse hydrolysate detoxification: effects of activated charcoal, ion-exchange resin, and lime. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5653-5664, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Arlington v.12 p. 13-15, 1990.

DUAN, S. F., HAN, P. J., WANG, Q. M., LIU, W. Q., SHI, J. Y., & BAI, F. Y.. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. **Nature Communications**, 9, 2690. 2019.

DUPERRAY, M., DELVENNE, M., FRANÇOIS, J., DELVIGNE, F., & CAPP, J. Instabilidade genômica e metabólica durante a fermentação de longo prazo de uma cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* projetada para utilização de açúcar C5. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** , 12. 2024.

FARIA, L. C.; LOPES, T. A.; MENDES, H. B. Classificação dos processos fermentativos. **Ciência e Tecnologia em Fermentação**, v. 9, n. 4, p. 150-158, 2024.

FERREIRA, A. P.; COSTA, M. L.; OLIVEIRA, R. T.; LIMA, J. S. Otimização de processos fermentativos industriais. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v. 54, n. 2, p. 87-102, 2023.

FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada**. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2005.

FERREIRA, R. M.; LIMA, C. S.; ROCHA, D. P.; MENDONÇA, A. P. Genetic variation and metabolic engineering in yeast strains: advances in primer-based identification methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 112-125, 2022.

GALLEGOS-CASILLAS, Porfirio et al. Yeast diversity in open agave fermentations across Mexico. *bioRxiv*, 2023.

GIANNAKOU, K., COTTERRELL, M., DELNERI, D.. Genomic Adaptation of *Saccharomyces* Species to Industrial Environments. *Frontiers in Genetics*, 11. 2020.

GOLDEMBERG, J.. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, 2007.

GONÇALVES, P.; SANTOS, H.; LEÃO, C. Effects of ethanol on the plasma membrane permeability of *Saccharomyces cerevisiae* assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 1, p. 369-378, 1990.

GREEN, S. R.; GRAY, P. P.. Industry Fermentation; A Differential Procedure for. Wallerstein Laboratories Communications, v. 14, n. 47, p. 289, 1951.

GRELLET, M. A. C., DANTUR, K. I., PERERA, M. F., AHMED, P. M., CASTAGNARO, A., ARROYO-LOPEZ, F. N. & RUIZ, R. M.. Genotypic and phenotypic characterization of industrial autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* for the selection of well-adapted bioethanol-producing strains. *Fungal biology*, v. 126, n. 10, p. 658-673, 2022.

GRETSCHMANN, A.S. **Ajuste de curvas na produção de etanol num processo em batelada**. In: X ENCONTRO GAÚCHO DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 10., 2009, Ijuí: Anais. Ijuí: Trabalhos X EGEM. 2009.

GURA, T. Driving biofuels from field to fuel tank. *Cell*, v.138, p.9-12, 2009.

HOHMANN, S.; Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts **Microbiology and molecular biology reviews**, 2002.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani, W. Biotecnologia Industrial. Ed. 1, São Paulo: Egard Blucher, v. 2. cap.6, p. 93-122, 2001.

JAMALUDDIN, E. I. RIYANTI, N. R. MUBARIK AND E. LISTANTO. "Construction of Novel Yeast Strains from *Candida tropicalis* KBKTI 10.5.1 and *Saccharomyces cerevisiae* DBY1 to Improve the Performance of Ethanol Production Using Lignocellulosic Hydrolysate." *Tropical Life Sciences Research*, 34 (2023): 81 - 107. 2023.

JAMES, S.A., & ROBERTS, I.N.. Use of repetitive-element PCR to differentiate genetically and phenotypically similar yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2196-2205, 2001.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International journal of food microbiology*, v. 33, n. 1, p. 139-155, 1996.

KALEKA, C.; DEBIEUX, P.; ANTONIOLI, E.; ZUCCONI, E.; COHEN, M.; FERRETTI, M. **Impacto do ácido hialurônico na viabilidade das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas em membrana de colágeno tipo I/III.** *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 57, p. 1022-1029, 2021.

KRETZER, L. G.. **Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de fermentar celobiose.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

KURTZMAN, C.P., & ROBNETT, C.J.. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331-371, 1998.

LAIRÓN-PERIS M, CASTIGLIONI GL, ROUTLEDGE SJ, ALONSO-DEL-REAL J, LINNEY JA, PITT AR, MELCR J, GODDARD AD, BARRIO E, QUEROL A. Adaptive response to wine selective pressures shapes the genome of a *Saccharomyces* interspecies hybrid. *Microbial genomics*. 2057-5858. 2021.

LEGRAS, J.L., & KARST, F. *Fungal Genetics and Biology*, 40(1), 93-106, 2003.

LERTWATTANASAKUL, N., PATTANAKITTIVORAKUL, S., NITIYON, S., MATSUTANI, M., OGUCHI, A., HIRATA, K., KOSAKA, T., LIMTONG, S., & YAMADA, M. Mutants with Enhanced Multi-Stress Tolerance of *Kluyveromyces marxianus* and Their Ability for Ethanol Fermentation. *Fuels*. 2023.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖRNER, T.. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*. v.33, p. 413-426. 1993.

LIMA, L. R; MARCONDES, A. A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira.** Curitiba: Editora UFPR, 2002.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LUDWING, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da flocação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, 2001.

MACEDO, LCH de. Álcool etílico: da cachaça ao cereal. **São Paulo: Ícone**, 1993.

MARTINS, F. R.; OLIVEIRA, T. A. Matérias-primas alternativas para fermentação alcoólica. *Revista Brasileira de Bioenergia*, v. 9, n. 1, p. 88-95, 2023.

MARTINS, P. R.; SOUZA, C. A.; RODRIGUES, L. M. Melhoramento genético de leveduras industriais: perspectivas e desafios. *Journal of Industrial Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 29-45, 2023.

MARULLO, P.; MASNEUF-POMAREDE, B.; DUBOURDIEU, I.; AIGLE, M., D. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. **FEMS yeast research**, 2004.

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

MOREIRA, J. R.; SCHMIDT, C. A.; FREITAS, M. A. V. Advances in sugarcane ethanol production and sustainability in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 180, p. 113-137, 2023.

MOURA, R. T.; CARVALHO, S. M.; GOMES, L. F. Metodologias avançadas na fermentação alcoólica. *BioTech Journal*, v. 15, n. 3, p. 200-210, 2024.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., ... & TEIXEIRA, J. A.. Technological trends, global Market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 817-830, 2010.

NAGAI, S. A method for detecting respiratory deficiency in yeast. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 85-91, 1963.

NAVES, FERNANDES, PINTO, NAVES. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11; 2010.

NASCIMENTO, Maria V.; FONSECA, Flávia C. Avaliação do desempenho fermentativo de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, v. 14, n. 2, p. 23-30, 2021.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A.A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 2,p. 275-278. 2005.

NEVES, M. F.. Etanol de milho (livro eletrônico): cenário atual e perspectivas para a cadeia no Brasil. 1^a ed. Ribeirão Preto, SP: UNEM, 2021.

NOBRE, T. DE P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R.. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 1, p. 20–25, jan. 2007.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E.. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, p. 19-24, 2004.

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com Leveduras de Características Floculantes em Reator Tipo Torre com Escoamento Ascendente.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, MG. 2010.

PAPIN, L. F.. **Influência das interações entre leveduras e bactérias contaminantes no rendimento da fermentação etanólica.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, SP. 2024.

PATARO C, GUERRA JB, PETRILLO-PEIXOTO ML, MENDONÇA-HAGLER LC, LINARDI VR, ROSA CA. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J Appl Microbiol*. Jul;89(1):24-31. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01092.x. PMID: 10945775. 2000.

PEREIRA, W. M. Caracterização de levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante mutada no gene STB5. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

QUEROL, A.; FERNANDEZ-ESPINAR, M. T.; OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. *International journal of food microbiology*, v. 86, 2003.

RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D., INOSTROZA-PONTA, M., VALENTE, P. (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting as a technique for discrimination of wine associated yeasts?. *PloS one*, 9(8), e105870, 2014.

REVERTER-BRANCHAT, G.; CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J.. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae* common targets and prevention by calorie restriction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, 2004.

RIBEIRO, R., BOURBON-MELO, N., SÁ-CORREIA, I., The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 13. 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953479>.

SAHANA & B. R, BALAMURALIKRISHNAN & K S, JOSEPH & P., MANIKANTAN & L., WEN-CHAO & A., MEYYAZHAGAN & K., HESAM & C., SHREESHIVADASAN & J., B.. (2024). A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: Current knowledge in biotechnological applications and future directions. *Process Biochemistry*. 138. 10.1016/j.procbio.2023.12.024.

SALVATO, F.. **Fermentação de mosto industrial por linhagens *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa.** 94 p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura ‘Luiz Queiroz’, Piracicaba, 2010.

SANDERSON, K. US biofuels: A field in ferment. *Nature*, v.444, p.673-676, 2006.

SANTOS, J. P.; FERREIRA, L. H.; CAMARGO, R. B.; NASCIMENTO, D. G. Seleção de linhagens de levedura para fermentação alcoólica: aspectos metabólicos e genéticos. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 5, p. 105-119, 2021

SANTOS JUNIOR, F. G.. **Desenvolvimento de uma nova versão do injetor comutador automático: determinação fotométrica de etanol em bebidas destiladas.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SANTOS, G. M.; LIMA, U. A. Reciclagem de leveduras na fermentação alcoólica. *Brazilian Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 45-53, 2023.

SHIBASAKI, T.; SUGIYAMA, M.; NAKAZAWA, M.; NAGAI, S. Studies on the mechanism of respiratory deficiency in yeast. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 49-58, 1967.

SILVA, A.F. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* soladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambiques da Bahia.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2009.

SILVA FILHO, E. A. **Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação.** 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

SILVA-FILHO, E.A.; MEOL, H.F.; ANTUNES, D.F.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JR, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.32, p. 481-486, (2005a).

SILVA-FILHO, E.A.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M., de Morais, J.O.F.; MORAIS Jr. M.A.; SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Ant van Leeuwen* 88:13–23. (2005b).

SILVA, J. P.; MENDONÇA, M. G.; FREITAS, R. L. Características das leveduras na produção de etanol. *BioTech Journal*, v. 15, n. 3, p. 210-220, 2023.

SILVA, J. P.; PEREIRA, M. G.; COSTA, R. B. Uso de Biomassa Lignocelulósica na Produção de Etanol. *BioTech Journal*, v. 15, n. 3, p. 120-128, 2022.

SILVA, J. R.; OLIVEIRA, T. F.; SANTOS, R. M.; ALMEIDA, P. P. Advances in primer selection for structural polymorphism identification in eukaryotes. *Genomics and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 89-102, 2021.

SILVA, R. A.; GOMES, P. C.; TEIXEIRA, V. F.; BARROS, E. Influência da conversão de substratos na eficiência fermentativa de leveduras industriais. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 8, p. 3627-3641, 2020.

SILVA, R. P.; FONSECA, André L. Comparação entre leveduras *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* quanto à eficiência fermentativa em diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, n. 1, p. 78-85, 2015.

SNYDER, M.. The SPA2 protein of yeast localizes to sites of cell growth.. *The Journal of Cell Biology*, 108(4), 1419-1429. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1419>, 1989.

SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R.. Floculação de leveduras por Lactobacillus fermentum em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 893-898, 2004.

SOUZA, R. D.. Estudo da calabura (*muntingia calabura*) para produção de etanol. In: 8º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. 2017.

SOUZA, H. F; BORGES, L. A.; SOARES, S. B.; BRANDI, I. V. Uso do método ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) para quantificação de lactose em alimentos e suas aplicações. 12º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG). Universidade Estadual de Montes Claros, MG. ISSN:1806-549X. 2018.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, Brasil, 2001.

STEENSELS, J., & VERSTREPEN, K. J.. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61-80. 2014.

SWAMY, K., ZHOU, N.."Experimental evolution: its principles and applications in developing stress-tolerant yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 2067 - 2077. 2019.

TAMANG, J.; LAMA, Sonam. Diversity of yeasts in Indian fermented foods and alcoholic beverages. *FEMS yeast research*, 2023.

TAVARES, F.C.A.. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.4, n.17, p.44-49, 1992.

TONOLI, F. C.. *Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2017.

TOSETTO, G. T.. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2008.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G.A.S.; ARAGÃO, F. A. S.. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza. 29 p.: Boletim de pesquisa e desenvolvimento, ISSN 1679-6543; 88. 2013.

VAN DIJKEN, J.P.; VAN DEN BOSCH, E.; HERMANS J.J.; DE MIRANDA, L.R.; SCHEFFERS, W.A.. Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. **Yeast**, v. 2, p. 123-127, 1986.

VAN URK, H.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the composition of growth medium. *Journal of General Microbiology*, v. 136, n. 3, p. 195-200, 1990.

VELOSO, I. Il. K.. Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

VIANA. N. C.. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica.** Piracicaba, Dissertação (Mestrado) - USP / Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’. 68 p. 2017.

VIANA, N., NASCIMENTO, D., PRADA, M., & DA CRUZ, S.. Caracterização Molecular De Cepas De Levedura Dominantes Isoladas Durante O Processo De Fermentação Etanólica. Revista Brasileira De Agricultura - Revista De Agricultura , 95, 48-58. 2020.

WALKER, G. M., & WALKER, R. S. K.. Enhancing yeast alcoholic fermentations. In G. Gadd, & S. Sariaslani (Eds.), Advances in applied microbiology (Vol. 105, pp. 87-129). (Advances in Applied Microbiology). Academic Press, 2018.

WATANABE, Daisuke, and Wataru Hashimoto. ‘Adaptation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to grape-skin environment.’ *Scientific reports* vol. 13,1 9279. 20 jun. 2023.

WHEALS, A.E.; BASSO, L. C.; ALVES, M. G.; AMORIM, H. V.. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., & TINGEY, S. V.. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531–6535 (1990).

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; GÍRIO, F.; SPENCER-MARTINS, I. Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 127-132, 2011.

YANG, J., BAE, J. Y., LEE, Y. M., KWON, H., MOON, H. Y., KANG, H. A., YEE, S. B., KIM, W., & CHOI, W. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance. *Biotechnology and bioengineering*, 108(8), 1776–1787, 2011.

YANG, J.; TAVAZOIE, S."Regulatory and evolutionary adaptation of yeast to acute lethal ethanol stress." *PLoS ONE*, 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239528>.

ZABUKOVEC, Polona et al. Isolation and Identification of Indigenous Wine Yeasts and Their Use in Alcoholic Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 58, p. 337-347, 2020.

ZAZULYA, A., SEMKIV, M., DMYTRUK, K., SIBIRNY, A.. Adaptive Evolution for the Improvement of Ethanol Production During Alcoholic Fermentation with the Industrial Strains of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Cytol. Genet.* 54, 398–407 (2020).

ZHENG, D. Q., WU, X. C., TAO, X. L., WANG, P. M., LI, P., CHI, X. Q., LI, Y. D., YAN, Q. F., & ZHAO, Y. H.. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. *Bioresource technology*, 102(3), 3020–3027, 2011.

ZHENG, J.; WANG, H.. Highly Efficient Gel Electrophoresis for Accurate Quantification of Nucleic Acid Modifications via in-Gel Digestion with UHPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2023.