



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA



**Comparação da eficiência da fermentação alcoólica entre leveduras
naturais da cana-de-açúcar e levedura comercial**

Discente: Gabriele Santos Martins

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Octavio Antonio Valsechi

São Carlos

2025

RESUMO

A cana-de-açúcar abriga uma microbiota diversa que pode influenciar diretamente o desempenho da fermentação alcoólica, sobretudo quando leveduras nativas apresentam adaptação ao substrato e às condições de estresse do processo. Este trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar leveduras naturais associadas ao colmo de três variedades de cana-de-açúcar (RB 855453, RB 92579 e RB 855156) e comparar seu crescimento com uma linhagem comercial amplamente usada na indústria (*S. cerevisiae* CAT-1), visando selecionar candidatas com potencial biotecnológico. Inicialmente, o sequenciamento de isolados do caldo in natura indicou predominância de leveduras não-*Saccharomyces*, sugerindo baixa abundância inicial de *S. cerevisiae* no caldo. Para enriquecer o gênero-alvo, o caldo foi submetido a 24 h de fermentação espontânea (30 °C; 200 rpm), o que resultou em amplicons compatíveis com o controle positivo e no aparecimento de *Saccharomyces cerevisiae* após o sequenciamento. Na etapa de desempenho fisiológico, curvas de crescimento mostraram que cinco linhagens nativas (855453-26, 855453-27, 92579-25, 92579-26 e 92579-31) apresentaram crescimento superior ou similar ao da CAT-1, indicando potencial de competitividade em contexto fermentativo. Conclui-se que a cana-de-açúcar é uma fonte relevante de leveduras com potencial industrial e que o enriquecimento fermentativo prévio é uma estratégia eficaz para recuperar *S. cerevisiae* a partir do caldo, fornecendo linhagens promissoras para validações futuras com produção de etanol, consumo de açúcares e tolerância a estresses do processo.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; *Saccharomyces cerevisiae*; leveduras endofíticas; fermentação alcoólica.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	5
2.	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.1.2	Histórico da utilização de leveduras.....	8
2.2.	Bioquímica da fermentação	9
2.3.	Cana-de-açúcar	10
2.4.	Diversidade microbiana da cana.....	11
2.5.	Impacto do uso de leveduras endofíticas na indústria sucroalcooleira.....	13
3.	JUSTIFICATIVA	16
4.	OBJETIVO GERAL	19
4.1.	Objetivos específicos	19
5.	METODOLOGIA.....	19
5.1.	Coleta de materiais	20
5.2.	Plaqueamento das amostras	20
5.3.	Isolamento de leveduras cultiváveis	21
5.4.	Extração do DNA	21
5.5.	Amplificação da região ITS.....	22
5.6.	Curva de crescimento	23
5.7.	Análise de consumo de glicose.....	23
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
6.1.	Coleta de materiais	24
6.2.	Plaqueamento das amostras	26
6.3.	Isolamento de leveduras cultiváveis	30
6.4.	Amplificação da região ITS.....	31
6.5.	Sequenciamento.....	33
6.6.	Curva de crescimento	36

6.7.	Análise de consumo da glicose.....	38
7.	CONCLUSÃO.....	38
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

As leveduras, pertencentes ao grupo dos fungos unicelulares, constituem um conjunto de microrganismos de grande relevância biotecnológica devido à sua notável capacidade fermentativa, atributo que lhes confere ampla aplicabilidade em diferentes segmentos produtivos. Elas são empregadas em processos industriais que englobam desde a fabricação de alimentos e bebidas, como pães, vinhos e cervejas, até a produção de biocombustíveis e a elaboração de compostos de interesse farmacêutico (Corbu, et al., 2023). Essa versatilidade de aplicação decorre de suas características fisiológicas e metabólicas singulares, as quais permitem não apenas a conversão eficiente de açúcares em produtos de valor agregado, mas também a adaptação a uma ampla variedade de nichos ecológicos.

Diante dessa multiplicidade de usos, estudos envolvendo leveduras abrangem desde investigações fundamentais, voltadas para compreender suas interações ecológicas e mecanismos adaptativos, até pesquisas aplicadas, direcionadas à otimização de processos industriais em larga escala. No contexto específico da cana-de-açúcar, um cultivo de elevada importância socioeconômica, diferentes pesquisas têm evidenciado o papel estratégico desses microrganismos, revelando informações valiosas sobre sua ocorrência, diversidade e funcionalidade em ecossistemas associados a essa cultura (Costa, et al., 2023).

Nos últimos anos, as investigações científicas voltadas à cana-de-açúcar têm direcionado esforços para compreender a atuação das leveduras na fermentação de subprodutos derivados dessa planta. Destaca-se, nesse cenário, a relevância de sua presença no colmo, estrutura correspondente ao caule, onde podem desempenhar funções essenciais na produção de etanol e em outros processos fermentativos de interesse industrial. Tais funções são particularmente importantes para a bioconversão da biomassa vegetal, contribuindo para a transformação de açúcares e outros compostos presentes no caldo da cana em produtos com valor econômico agregado (Ray, et al., 2020).

Entre as ferramentas que permitem investigar de forma mais aprofundada a diversidade e o papel das leveduras, o sequenciamento genético ocupa posição de destaque. Essa abordagem pode ser aplicada tanto ao genoma completo dos microrganismos quanto a regiões-alvo específicas, como o espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer* - ITS). O sequenciamento do ITS é especialmente útil por se tratar de uma região altamente variável entre diferentes espécies, possibilitando a

identificação taxonômica precisa e a caracterização da diversidade genética de comunidades microbianas presentes em diferentes tipos de amostras ambientais (Vandana, et al., 2021). Além disso, a análise dessa região fornece subsídios importantes para compreender as dinâmicas ecológicas dessas comunidades, bem como para identificar potenciais aplicações biotecnológicas de cepas específicas.

Estudos prévios demonstram o potencial dessa ferramenta no contexto da cana-de-açúcar. Em um trabalho conduzido na Tailândia, por exemplo, foi analisada a diversidade de leveduras em tecidos foliares de três culturas agrícolas de importância econômica, entre elas a cana-de-açúcar. Nessa pesquisa, utilizou-se um método de isolamento por cultivo, seguido de identificação taxonômica com base na análise da região D1/D2 do gene do RNAr da subunidade maior. Os resultados indicaram que tais culturas constituem fontes promissoras para o isolamento de novas espécies ou mesmo de cepas previamente conhecidas, como *Saccharomyces cerevisiae*, mas que apresentem características adaptativas diferenciadas (Liu, et al. 2023).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente reconhecida como um dos microrganismos mais estudados pela ciência moderna, figurando como o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (Khunnamwong; Jindamorakot; Limtong, 2018). Essa característica, aliada à sua facilidade de cultivo e manipulação genética, fez dessa espécie um organismo modelo em diversas áreas da biologia e da biotecnologia. Paralelamente à sua relevância acadêmica, a *S. cerevisiae* ocupa posição central na indústria fermentativa, sendo utilizada na produção de bebidas alcoólicas como vinho e cerveja, na panificação e, mais recentemente, de forma intensiva na produção de bioetanol (Goffeau, et al., 1996).

Entre os aspectos mais notáveis do seu metabolismo, destaca-se o padrão “produzir–acumular–consumir”, intimamente relacionado ao chamado efeito Crabtree. Esse efeito leva a levedura, mesmo em condições aeróbias, a priorizar a via fermentativa em detrimento da respiração celular, convertendo açúcares diretamente em etanol. O acúmulo

de etanol no meio não apenas representa a geração de um produto de interesse industrial, mas também confere à levedura uma vantagem competitiva, uma vez que essa substância atua como metabólito tóxico para outros microrganismos competidores, reduzindo sua proliferação (Zhuang; Renault; Archer, 2021).

O êxito industrial da *S. cerevisiae* está diretamente associado a sua robustez fisiológica. Essa espécie apresenta elevada tolerância a condições de estresse, como altas temperaturas, concentrações elevadas de etanol, variações no pH e presença de compostos inibidores. Além disso, a flexibilidade para melhoramento genético e sua capacidade de adaptação a sistemas fermentativos de grande porte consolidam seu protagonismo na produção de biocombustíveis. Em biorreatores industriais, as condições impostas visam maximizar a produtividade alcoólica no menor tempo possível, e a *S. cerevisiae* se destaca por conseguir manter desempenho elevado mesmo em cenários de elevada demanda metabólica (Parapouli, 2020).

As cepas industriais dessa espécie, muitas vezes selecionadas diretamente de ambientes fermentativos, reúnem características de resistência superiores às de linhagens de uso doméstico ou laboratorial. Observa-se, em diversos processos industriais, a substituição natural de leveduras comerciais inoculadas no início da safra, como as empregadas em panificação, por linhagens mais bem adaptadas ao meio de fermentação ao longo do ciclo produtivo. Esse fenômeno de seleção natural é impulsionado por pressões ambientais, como estresse osmótico decorrente de altas concentrações de açúcares e sais, oscilações de pH e contaminações bacterianas. Apenas as cepas capazes de resistir a esses desafios permanecem ativas e, muitas vezes, são isoladas e incorporadas oficialmente ao processo industrial (Argueso, 2009).

No Brasil, duas cepas se destacam como pilares da produção de etanol: CAT-1 e PE-2. Juntas, representam aproximadamente 80% das leveduras comerciais empregadas no setor. Evidências apontam que ambas, inicialmente consideradas emergentes espontaneamente nos biorreatores, têm origem associada à microbiota endógena da própria cana-de-açúcar (Silva; Oka; Fonseca, 2019; Walker & Basso, 2020). Essa constatação reforça a importância estratégica de explorar a biodiversidade microbiana presente na matéria-prima como fonte de novas cepas adaptadas, capazes de elevar a eficiência, a estabilidade e a resiliência dos processos fermentativos frente às crescentes demandas e desafios impostos pela indústria sucroenergética.

2.1.2 Histórico da utilização de leveduras

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* ocorre em uma ampla gama de ambientes, tanto naturais quanto artificiais, apresentando grande diversidade genética e fenotípica. Entre suas diferentes linhagens, grupos associados à produção de vinho, pão, queijo e outros produtos desenvolveram propriedades fisiológicas específicas, adaptadas a nichos ecológicos respectivos (Legras, et al., 2018). Essas populações especializadas se diferenciam tanto entre si quanto das formas naturais, e as que têm como habitat o interior da cana-de-açúcar ainda permanecem pouco investigadas.

Nos últimos anos, se observa um renovado interesse por métodos tradicionais de fermentação, nos quais são utilizadas comunidades microbianas naturalmente presentes no próprio local de produção. Essa abordagem, que valoriza a biodiversidade local, pode enriquecer o valor nutricional das matérias-primas, reduzir o desperdício de alimentos e, no contexto presente, minimizar gastos com microrganismos comerciais, tornando mais eficientes os processos fermentativos (Von Gastrow, et al., 2023).

No campo da conservação da biodiversidade, o uso de leveduras obtidas naturalmente constitui uma estratégia promissora. Essa prática promove a valorização de recursos genéticos pouco explorados e pode estar associada à criação de bancos de microrganismos, que asseguram tanto a preservação desses recursos quanto a possibilidade de bioprospecção e repartição equitativa dos benefícios oriundos de seu uso (De Guidi, et al., 2023).

Compreender de forma mais aprofundada as comunidades microbianas que participam das fermentações é essencial para explorar plenamente a complexidade desses sistemas. No caso das leveduras, mais de 200 espécies já foram identificadas em produtos fermentados, evidenciando um potencial ainda pouco aproveitado para aplicações industriais e biotecnológicas (Rué, et al., 2023).

As leveduras não convencionais, muitas vezes distantes das linhagens tradicionalmente utilizadas, exercem influência significativa sobre a diversidade sensorial e funcional dos produtos fermentados. Além de sua contribuição individual, merece destaque o papel das interações que estabelecem com outros microrganismos. O conceito de holobionte — que considera um organismo juntamente com sua microbiota como uma unidade ecológica — reforça a importância de estudar as relações simbióticas e competitivas entre microrganismos, especialmente em ecossistemas fermentativos

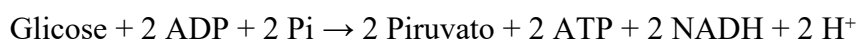
complexos, como os observados na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (De Guidi, et al., 2023).

2.2. Bioquímica da fermentação

A glicólise, segundo Nelson e Cox (2019), constitui uma via metabólica central para o metabolismo energético, responsável por converter uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato. Esse processo, que ocorre no citosol das células, é composto por uma sequência coordenada de dez reações enzimáticas e pode ser dividido em duas fases distintas: a fase de investimento energético e a fase de compensação energética.

Na fase inicial de investimento, a molécula de glicose sofre modificações estruturais que demandam a utilização de ATP, cuja função é ativar os substratos e torná-los quimicamente mais reativos. Já na fase de compensação energética, os intermediários formados passam por reações de oxidação e transferência de grupos fosfato, culminando na produção líquida de ATP e NADH. Essa divisão funcional garante que o processo seja termodinamicamente favorável e energeticamente eficiente.

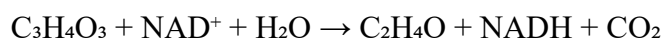
Do ponto de vista quantitativo, a estequiometria da glicólise estabelece a relação proporcional entre os reagentes consumidos e os produtos formados, podendo ser resumida pela equação:



A glicólise está diretamente associada aos processos fermentativos, especialmente em condições anaeróbias. Na ausência de oxigênio, o piruvato gerado não é encaminhado ao ciclo de Krebs e à fosforilação oxidativa, mas sim convertido em produtos finais fermentativos, como etanol ou ácido lático. Esse desvio metabólico desempenha papel essencial na regeneração do NAD^+ a partir do NADH, garantindo a continuidade do fluxo glicolítico mesmo quando a cadeia transportadora de elétrons não está funcional devido à falta de aceptor final de elétrons.

Entre as rotas fermentativas, destaca-se a fermentação alcoólica, caracterizada pela conversão do piruvato em etanol e dióxido de carbono. Esse processo ocorre em duas etapas principais: na primeira, o piruvato sofre descarboxilação, gerando acetaldeído e liberando CO_2 ; na segunda, o acetaldeído é reduzido a etanol, reação catalisada pela enzima álcool-desidrogenase, na qual o NADH doa elétrons, regenerando NAD^+ (Nelson & Cox, 2019).

A primeira reação pode ser representada pela equação:



A eficiência da fermentação alcoólica é elevada, com rendimento estimado em cerca de 90%, o que significa que, a cada 10 moléculas de piruvato consumidas, aproximadamente 9 moléculas de etanol são produzidas, juntamente com 1 molécula residual de NADH (Marzzoco & Torres, 1999). Essa elevada eficiência, aliada à simplicidade do processo e à tolerância de microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae* ao etanol, explica a ampla utilização dessa rota bioquímica na produção industrial de bebidas alcoólicas e de biocombustíveis.

2.3. Cana-de-açúcar

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a safra 2024/25 de cana-de-açúcar no Brasil encerrou com uma produção aproximada de 677 milhões de toneladas, valor que representa o segundo maior volume colhido desde o início dos registros históricos. O açúcar extraído dessa cultura apresenta grande relevância não apenas para a indústria alimentícia e de bebidas, mas também para setores químicos e energéticos, podendo ser convertido em etanol (Galdos, et al., 2018).

O Brasil ocupa posição de destaque mundial na produção de bioetanol de primeira geração (E1G) a partir da cana-de-açúcar, tecnologia que se mantém hegemônica devido à sua viabilidade econômica, simplicidade operacional e elevado rendimento. O país é responsável por cerca de 29% da produção global de E1G, obtida majoritariamente a partir dessa matéria-prima (Torroba & Orozco, 2022; Naylor & Coleman-Derr, 2022). Em 2024, a produção total nacional de etanol registrou crescimento de 4,4%, alcançando 37,2 bilhões de litros (Conab, 2025).

Até a década de 2010, a queima da palha da cana-de-açúcar era prática comum antes da colheita, visando facilitar o corte manual e reduzir o volume de material vegetal a ser processado. Contudo, essa prática foi gradualmente abolida devido aos impactos ambientais, principalmente pela emissão significativa de gases de efeito estufa (Moitinho, et al., 2021). A proibição da queima modificou significativamente o ecossistema microbiano associado à matéria-prima, permitindo que microrganismos antes destruídos pelo fogo passassem a integrar e, em alguns casos, dominar o processo fermentativo.

Paulino, et al. (2018) demonstrou esse fenômeno ao acompanhar a safra de 2016 em uma usina do Estado de São Paulo. No início da safra, a fermentação era conduzida por um inóculo composto por 80% de leveduras de panificação e 20% da linhagem industrial CAT-1. No entanto, a partir do terceiro mês de processamento, essas cepas foram totalmente substituídas por uma levedura natural, presumivelmente proveniente da microbiota da cana, mais adaptada às condições específicas da unidade industrial.

A literatura científica aponta que a microbiota associada às plantas — distribuída na rizosfera, filosfera e endosfera — desempenha funções cruciais para o crescimento vegetal e para a proteção contra patógenos (Compant, et al., 2019). Em especial, o caldo contido no colmo da cana-de-açúcar permanece como um ambiente pouco explorado em termos de caracterização microbiológica. Com o fim das queimadas, espera-se um aumento significativo na diversidade de microrganismos presentes nesse caldo, os quais são transferidos diretamente para os reatores industriais de produção de etanol.

Um estudo conduzido por Martini (2009) investigou a composição microbiana do caldo proveniente de dez variedades distintas de cana-de-açúcar. Os resultados revelaram ampla diversidade de leveduras, com predominância do gênero *Saccharomyces* em três regiões distintas do colmo. Além disso, observou-se variação significativa na quantidade de leveduras conforme a variedade analisada. Esses dados sugerem que a caracterização microbiológica do caldo de cana representa uma estratégia promissora para identificar cepas com elevado potencial fermentativo, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de processos mais eficientes e resistentes a variações ambientais na indústria sucroenergética.

2.4. Diversidade microbiana da cana

O caldo de cana-de-açúcar constitui um ecossistema microbiano complexo e dinâmico, favorecido por suas propriedades físico-químicas: alto teor de açúcares (°Brix médio de 19–20%), água (>80%), nutrientes e pH levemente ácido, criando um ambiente ideal para a proliferação de microrganismos. Estudos em fermentações artesanais de cachaça mostraram que o caldo é dominado sequencialmente por diferentes espécies. Em fases iniciais, encontram-se leveduras não-*Saccharomyces*, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* emerge como predominante nas etapas finais de fermentação. Essa sucessão

está associada à adição contínua de caldo fresco, o que renova os nutrientes e permite dinâmica genética entre as linhagens (Schwan, et al., 2001).

Na indústria sucroalcooleira brasileira, a inoculação de leveduras industriais, como as cepas PE-2 e CAT-1, é uma prática consolidada devido ao seu alto rendimento e robustez em processos fermentativos contínuos. No entanto, diversos estudos têm revelado que, ao longo da safra, essas linhagens comerciais podem ser progressivamente substituídas por cepas nativas originadas da própria microbiota associada à cana-de-açúcar ou ao ambiente da usina.

Essa substituição gradual ocorre como resultado de uma seleção natural dirigida pelas condições industriais adversas, como alta concentração de açúcares, pH ácido, presença de contaminantes bacterianos, altas temperaturas e reciclagem celular intensa. Nesse contexto, as cepas locais demonstram maior capacidade adaptativa e resistência a estresses ambientais, superando as comerciais em desempenho fermentativo (De Souza, et al., 2018).

Segundo Viana et al. (2020), análises moleculares realizadas em uma unidade de produção de etanol mostraram que, já nos primeiros meses de fermentação, a cepa PE-2 foi completamente suplantada por uma linhagem nativa dominante. A investigação revelou que essa cepa autóctone apresentou maior viabilidade, tolerância ao etanol e estabilidade genética, o que lhe conferiu vantagem competitiva ao longo do ciclo da safra. Esses achados reforçam a hipótese de que o ambiente fermentativo atua como um ecossistema seletivo, promovendo o enriquecimento de linhagens mais bem adaptadas, mesmo em detrimento de cepas comerciais previamente inoculadas.

Não obstante, a dificuldade de esterilização do caldo de cana em escala industrial e o reaproveitamento de biomassa microbiana entre ciclos contribuem para a persistência e expansão das leveduras locais. Essa dinâmica microbiológica destaca a importância de estratégias de monitoramento genético contínuo e da valorização da biodiversidade microbiana regional como fonte de linhagens promissoras para a biotecnologia do etanol (Jacobus, et al., 2021)

Diferentes variedades de cana-de-açúcar, especialmente aquelas com níveis variados de teor de sacarose e tempos de maturação, exercem influência significativa sobre a composição microbiológica do caldo fermentativo. Um estudo realizado por Martini et al. (2011) avaliou o caldo extraído de 10 variedades do programa RB ao longo da safra.

Observou-se uma diminuição na contagem total de leveduras conforme a cana atingia sua maturidade máxima, enquanto a proporção de *Saccharomyces cerevisiae* aumentava proporcionalmente com a maturação.

Essas tendências sugerem que variedades de maturação precoce e média podem favorecer um início mais rápido da fermentação — reduzindo o tempo necessário para a ativação do tradicional “fermento caipira” — e, simultaneamente, assegurar a predominância de cepas fermentativas eficientes no estágio inicial da safra. Esses resultados indicam a possibilidade de uma gestão varietal estratégica, onde variedades específicas da cana são escolhidas com base no estágio da colheita para otimizar o processo fermentativo. Assim, combinar uma variedade precoce com alta capacidade de suporte microbiano à fermentação pode tornar o “fermento caipira” mais eficaz e robusto, impactando positivamente a qualidade e rendimento de bebidas tradicionais como a cachaça.

2.5. Impacto do uso de leveduras endofíticas na indústria sucroalcooleira

A utilização de leveduras endofíticas, isto é, cepas microbianas naturalmente associadas à cana-de-açúcar e isoladas de seus diferentes tecidos vegetais, como colmo e folhas, tem sido apontada como uma estratégia inovadora e promissora para a indústria sucroalcooleira. Estudos demonstram que a cana-de-açúcar abriga uma microbiota endofítica diversa, cuja composição varia de acordo com o tecido vegetal, a variedade e o estágio de desenvolvimento da planta, incluindo leveduras com potencial fermentativo relevante. A valorização dessas comunidades microbianas locais contribui para o aproveitamento da biodiversidade regional e pode favorecer processos fermentativos mais adaptados às condições ambientais e à matéria-prima disponível (Romão-Dumaresq *et al.*, 2016). Além disso, o uso de leveduras nativas tem sido associado ao potencial de reduzir a dependência de inoculantes comerciais e de mitigar custos operacionais, ao explorar microrganismos já adaptados ao substrato e ao ambiente produtivo (Tenea & Veintimilla, 2021).

Embora o uso industrial de leveduras endofíticas para etanol ainda esteja em consolidação, fungos endofíticos já são aplicados de forma bem estabelecida em outros contextos produtivos. Em pastagens, endófitos do gênero *Epichloë* são incorporados a cultivares de azevém (*Lolium perenne*) por conferirem maior persistência e proteção

contra pragas via produção de metabólitos secundários, sendo um exemplo clássico de aplicação prática de endofitismo na agricultura (Karpyn Esqueda et al., 2017). Ainda, o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* pode colonizar plantas como endófito após inoculação e tem sido investigado/empregado como ferramenta de **controle biológico**, associando endofitismo à redução de danos por pragas e também a efeitos sobre doenças (Ownley et al., 2008).

A bioprospecção de leveduras naturais diretamente da cana-de-açúcar, sobretudo a partir de seu colmo, representa uma estratégia eficaz e de baixo custo para o desenvolvimento de culturas iniciadoras adaptadas ao processo fermentativo. Ao contrário das cepas comerciais, que demandam aquisição recorrente, propagação em laboratório, controle de qualidade e logística de transporte refrigerado, as cepas nativas isoladas diretamente da matéria-prima já estão naturalmente aclimatadas às condições físico-químicas do caldo, como alto teor de açúcares, pH ácido, e eventual presença de contaminantes (Tenea & Veintimilla, 2021).

Essa adaptação natural ao substrato da cana favorece o estabelecimento rápido das leveduras já nas primeiras horas de fermentação, reduzindo a necessidade de grandes volumes inoculantes ou de reforços periódicos ao longo da safra. O substrato vegetal atua como suporte físico e nutricional, permitindo a fixação eficiente das células e favorecendo sua persistência no sistema fermentativo, observada em estudos que demonstram alta produtividade alcoólica e estabilidade operacional com imobilização de leveduras em peças de cana, mesmo após diversos ciclos de fermentação. Como resultado, práticas como reinoculação frequente tornam-se menos necessárias, e o risco de variações no desempenho fermentativo diminui consideravelmente (Liang, et al., 2008)

A obtenção direta de leveduras endógenas a partir da biomassa vegetal da cana-de-açúcar representa uma solução estrategicamente vantajosa, especialmente para pequenas destilarias e usinas de menor porte que enfrentam dificuldades para adquirir cepas comerciais de alto rendimento. Ao selecionar linhagens nativas presentes na própria cana, não são necessários grandes estoques de inoculantes nem re-inoculações frequentes, pois essas cepas já estão adaptadas ao substrato natural.

Ademais, essas leveduras demonstram ser capazes de fermentar o caldo de cana com eficiência, como evidencia um estudo conduzido por Moraes et al. (2020), no qual leveduras isoladas de madeira em decomposição na bagaça de cana produziram etanol e enzimas xilanolíticas com bom desempenho fermentativo. Assim, o uso direto dessas

linhagens endógenas otimiza o processo desde o início, reduz custos operacionais e garante maior compatibilidade bioquímica — minimizando flutuações fermentativas e promovendo maior autonomia tecnológica.

2.6. Caracterização molecular de fungos

Nas últimas décadas, as técnicas empregadas na caracterização de leveduras evoluíram de forma acelerada, resultando em abordagens mais precisas, rápidas e economicamente mais viáveis. Historicamente, a caracterização de culturas foi fortemente baseada em métodos dependentes de cultivo, utilizando critérios morfológicos, além de características bioquímicas e fisiológicas. Contudo, com os avanços tecnológicos recentes, esses procedimentos vêm sendo progressivamente substituídos por metodologias moleculares, que oferecem maior especificidade e demandam menos tempo de execução (Franco-Duarte et al., 2019).

No que se refere ao entendimento das relações entre microrganismos e seus processos evolutivos, a classificação filogenética desempenha papel central. Esse procedimento comumente se apoia no sequenciamento de regiões do DNA associadas ao gene que codifica o RNA ribossômico; em seguida, ferramentas computacionais são aplicadas para alinhar sequências nucleotídicas, selecionar modelos de substituição mais adequados e, por fim, inferir relações filogenéticas por máxima verossimilhança (Kurtzman, 2011).

No contexto de processos biotecnológicos e fermentativos, diferentes técnicas moleculares têm sido adotadas com o objetivo de identificar as linhagens presentes e acompanhar sua dinâmica no meio. A cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), por exemplo, é utilizada para diferenciar e caracterizar leveduras do gênero *Saccharomyces* a partir da comparação dos perfis de bandas cromossômicas (Basso et al., 2019). Carvalho-Netto et al. (2013), por sua vez, acompanharam populações de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo da fermentação para produção de bioetanol mediante a definição de um conjunto de quatro marcadores moleculares baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR).

Ainda assim, o método mais difundido para a identificação de leveduras fundamenta-se no sequenciamento de regiões do rDNA nuclear, composto pelos genes 18S, 5.8S e 25S, transcritos como uma única unidade pela RNA polimerase I. Em

especial, a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que abrange o gene 5.8S e os espaçadores ITS1 e ITS2, é considerada uma das porções mais informativas para discriminação de espécies no reino *Fungi*. Conforme descrito por Esteve-Zarzoso et al. (1999), iniciadores (ITS-1 e ITS-4) que flanqueiam as regiões polimórficas ITS1 e ITS2 são utilizados para permitir a identificação de diferentes espécies de leveduras (Andrion, 2022).

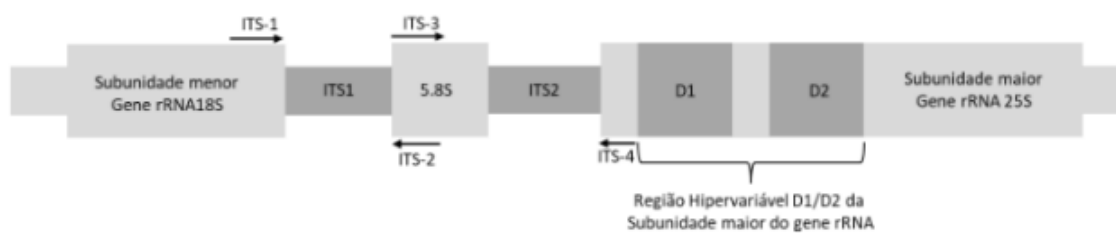


Figura 1: Diagrama do complexo gênico ribossômico (fora de escala). A estrutura inclui: sequência codificadora da subunidade menor rRNA 18S, região espaçadora interna 1 (ITS1), sequência codificadora da subunidade 5.8S, região espaçadora interna 2 (ITS2) e sequência codificadora da subunidade ribossômica 26S. As setas representam as posições aproximadas de ancoragem dos primers específicos.

Fonte: Adaptado de Martins (2023).

3. JUSTIFICATIVA

Os microrganismos, reconhecidos como as formas de vida mais antigas, diversas e abundantes do planeta, apresentam ampla diversidade genética e estão distribuídos nos mais variados ecossistemas, incluindo ambientes agrícolas, onde exercem funções de grande relevância para a manutenção e o incremento da produtividade (Cheavegatti-Gianotto, et al., 2011). Em tais ecossistemas, atuam como agentes-chave em processos ecológicos e bioquímicos, influenciando desde o ciclo de nutrientes até a proteção contra patógenos. No caso específico da agricultura, sua presença e atividade podem impactar diretamente a eficiência produtiva, seja de forma benéfica, favorecendo o crescimento das plantas, seja por meio de interações complexas com a microbiota nativa.

Apesar desse reconhecimento, ainda existe uma lacuna considerável no entendimento da composição e do papel das comunidades microbianas naturalmente presentes em vegetais de interesse econômico, como a cana-de-açúcar. Essa lacuna é

particularmente relevante em regiões de destaque para a produção dessa cultura, como o Estado de São Paulo, que responde por uma parcela expressiva da produção nacional e internacional (Cheavegatti-Gianotto, et al., 2011).

A compreensão aprofundada da diversidade microbiana associada à cana-de-açúcar é estratégica para a prospecção de novos microrganismos com potencial para aplicações industriais e para o manejo agrícola sustentável. Considerando que microrganismos endofíticos e epifíticos presentes na planta podem participar ativamente dos processos fermentativos, sua caracterização torna-se fundamental para compreender como influenciam não apenas a eficiência da fermentação, mas também a qualidade do produto in natura e de seus derivados. Ao investigar as comunidades microbianas presentes no caldo dos colmos e caracterizar a diversidade de leveduras associadas ao caldo de cana e avaliar características relacionadas ao desempenho fermentativo (Vera; Wicke; Van Der Hilst, 2020; Silva, et al., 2020).

Historicamente, no Brasil, os avanços tecnológicos voltados para superar desafios da produção de bioetanol concentraram-se predominantemente em aspectos agrônômicos e de engenharia de processo, com foco em aumentar a produtividade da matéria-prima e otimizar a operação industrial. No entanto, as questões microbiológicas, especialmente relacionadas à fermentação, não receberam a mesma atenção. Apenas nas últimas duas décadas observou-se uma intensificação dos estudos voltados ao isolamento e à seleção de linhagens de leveduras capazes de otimizar o processo fermentativo, resultando em ganhos significativos na eficiência da produção (Krogerus; Magalhães; Gibson, 2016).

O conhecimento detalhado sobre a dinâmica das populações de leveduras associadas à cana-de-açúcar, principal matéria-prima para a produção de bioetanol no Brasil, apresenta potencial para gerar vantagens competitivas na otimização dos processos fermentativos. Diferentes cepas de leveduras exibem capacidades distintas de fermentação, tolerância a altas concentrações de etanol e perfis variados na produção de subprodutos. Esses fatores influenciam diretamente o rendimento, a velocidade de fermentação e as características sensoriais e químicas do produto final. Assim, identificar e selecionar cepas mais eficientes pode contribuir para acelerar o processo fermentativo e reduzir a formação de compostos indesejados, melhorando a qualidade e a padronização do produto (Khan, et al., 2023).

A introdução antecipada de cepas previamente selecionadas nos reatores fermentativos representa uma estratégia eficaz para promover sua rápida predominância

sobre outras populações microbianas. Essa prática não apenas acelera a fermentação, mas também aumenta a estabilidade do processo, elevando a produtividade global do sistema. Essa abordagem integrada é aplicável tanto à produção de bioetanol quanto à de cachaça, fortalecendo a sustentabilidade e a competitividade dos setores envolvidos (De Andrade, et al., 2023).

Adicionalmente, a identificação e o uso de linhagens autóctones — naturalmente adaptadas às condições ambientais e ao substrato local — possibilitam personalizar os processos fermentativos e reduzir a dependência de leveduras industriais comerciais. Essa substituição pode diminuir custos de aquisição, aumentar a competitividade econômica e, ao mesmo tempo, favorecer a rápida predominância de cepas eficientes sobre microrganismos contaminantes provenientes da cana, do solo ou das instalações industriais.

A identificação taxonômica de leveduras pode ser realizada por abordagens morfológicas e fisiológicas, porém, em comunidades naturais com espécies próximas, métodos moleculares oferecem maior confiabilidade. Entre eles, a região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal é amplamente utilizada para fungos e leveduras, pois combina trechos conservados (que permitem amplificação) com variabilidade suficiente para diferenciar espécies em muitos casos. Assim, o sequenciamento da região ITS permite inferir a identidade dos isolados por comparação com bancos de dados, contribuindo para descrever a diversidade microbiana associada à cana-de-açúcar. Ainda assim, em alguns grupos muito próximos, a ITS pode ter poder discriminatório limitado, podendo exigir marcadores adicionais quando necessário.

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA), vinculado ao Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus São Carlos. O LBGA possui sólida experiência em estudos microbiológicos voltados ao isolamento e à bioprospecção de microrganismos, incluindo leveduras fermentativas e análises metagenômicas de solo. Além disso, contará com a colaboração do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSCar, campus Araras, em especial do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural (DTaiSeR-Ar), reconhecido por sua tradição em pesquisas voltadas à agroindústria, socioeconomia rural e tecnologia sucroenergética, incluindo estudos aplicados à produção de bioetanol.

4. OBJETIVO GERAL

Identificar leveduras pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae* presentes nos colmos de cana-de-açúcar de 3 diferentes variedades (RB 855453, RB 92579 e RB 855156) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, na cidade de Araras, São Paulo, e comparar seu crescimento com linhagem comercial, visando a sua aplicação em processos fermentativos.

4.1. Objetivos específicos

- Coletar amostras de colmos de cana-de-açúcar das variedades RB 855453, RB 92579 e RB 855156 em áreas representativas das variedades mais plantadas no Estado de São Paulo.
- Isolar leveduras naturais a partir das amostras do caldo retirado dos colmos da cana.
- Caracterizar os microrganismos isolados quanto à sua identidade taxonômica através de técnicas moleculares, como sequenciamento da região ITS do de DNA ribossômico 18S.
- Avaliar o crescimento dos microrganismos isolados naturais, através de ensaios laboratoriais e comparar com a linhagem comercial.

5. METODOLOGIA

A metodologia utilizada na execução deste trabalho está descrita a seguir e foi desenvolvida segundo o cronograma da Figura 1:

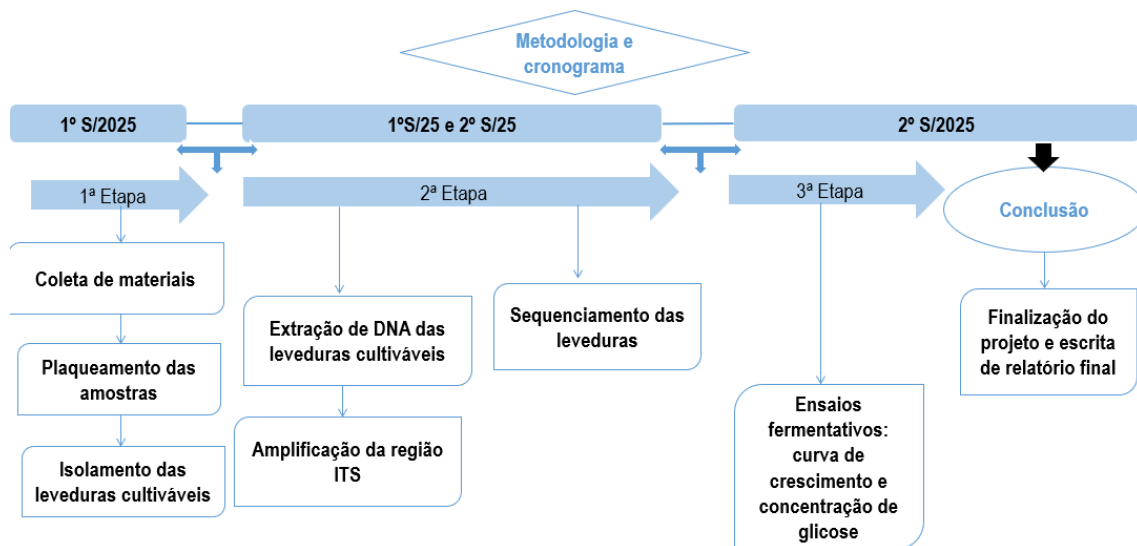


Figura 2: Cronograma da metodologia empregada no presente projeto.

Fonte: Autora, 2025.

5.1. Coleta de materiais

Foram coletadas amostras do caldo extraído dos colmos de três variedades de cana-de-açúcar (RB 855453, RB 92579 e RB 855156), selecionadas por serem cultivares amplamente adotadas em canaviais do estado de São Paulo e, portanto, representativas das condições predominantes do setor sucroenergético regional. A escolha dessas variedades buscou aumentar a robustez do estudo ao contemplar materiais genéticos distintos sob um mesmo contexto agrônomo, reduzindo o risco de que os resultados refletissem particularidades de uma única cultivar. Dessa forma, a amostragem favorece maior generalização dos achados sobre a microbiota associada ao colmo e ao caldo, aproximando o desenho experimental da realidade de campo.

A coleta foi realizada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, na cidade de Araras (SP). A extração do caldo seguiu o Consecana (2015), conforme a norma ABNT 16221. As amostras foram acondicionadas em caixas refrigeradas para transporte até o Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, no Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, campus São Carlos.

5.2. Plaqueamento das amostras

As amostras de caldo do colmo foram diluídas em 10 mL de água ultrapura autoclavada. A partir dessa diluição inicial, foram realizadas mais cinco diluições em série para posterior plaqueamento. Foram plaqueados 50 µL de cada uma das diferentes

diluições em placas de Petri contendo meio YPD 2% suplementado com ampicilina e tetraciclina, com o objetivo de inibir o crescimento bacteriano. O espalhamento foi realizado com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada por flambagem. Após o processo de plaqueamento, as placas foram incubadas a 30°C durante a noite em estufa para permitir o crescimento das colônias, conforme descrito por Cabrini e Gallo (1999).

5.3. Isolamento de leveduras cultiváveis

Todas as colônias de leveduras que obtiveram crescimento em placas foram isoladas em placas individuais a partir do método de repicagem, seguidas de crescimento em estufa à 30°C *overnight*. Para o armazenamento em freezer -80°C, cada colônia foi posteriormente inoculada em 800 µL de YPD 2% líquido e foram incubadas *overnight* em agitador orbital a 30°C e 80 rpm de agitação. Após o crescimento, 800 µL de glicerol 60% foram acrescentados ao meio e os tubos foram armazenados em freezer a -80°C. Assim as leveduras foram armazenadas e utilizadas para os estudos propostos neste projeto, conforme descrito por Novello (2015).

5.4. Extração do DNA

Cada colônia isolada foi inoculada individualmente para crescimento *overnight* em 3 mL de YPD 2% líquido a 30°C. O DNA foi extraído pela técnica do Fenol-Clorofórmio (Hoffman, 1997). Resumidamente, o pré-inóculo foi centrifugado a 4.000 g por 5 minutos, e o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de tampão Tris-HCl-SDS. Aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro foram adicionadas a esta solução, sendo em seguida submetida a agitação vigorosa por 10 minutos. Desta solução, 200 µL foram transferidos para novos tubos cônicos e agitados vigorosamente.

Posteriormente, procedeu-se à adição de 100 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio. Centrifugou-se a 12.000 g por aproximadamente 10 minutos e a fase superior (aquosa) foi transferida para um novo tubo, no qual o DNA foi precipitado mediante adição de mesmo volume (aproximadamente 300 µL) de isopropanol. O tubo foi mantido em repouso a -80°C por aproximadamente 1 hora.

Sequencialmente, centrifugou-se a 12.000 g por 5 minutos e, em seguida, o precipitado foi lavado com 300 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação à

velocidade máxima por 1 minuto. O etanol foi evaporado ao se deixar o tubo repousar entreaberto em capela de fluxo laminar. Finalmente, adicionou-se 80 µL de água deionizada e homogeneizou-se a solução. As amostras foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

5.5. Amplificação da região ITS

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificação dos fragmentos de DNA (extraídos conforme técnica do Fenol Clorofórmio descrita anteriormente) compreendidos entre a região intergênica ITS-1 e ITS-4 que são espaçadores internos dos genes que codificam para o RNA ribossômico nuclear em eucariotos (18S, 5.8S e 28S), e são importantes instrumentos para diferenciação genética de leveduras (Esteve-Zarboso, et al., 1999).

Os iniciadores para esta amplificação foram os seguintes:

ITS-F 5'ACGGTGAGAGATTTCTGTGC3'

ITS-R 5'AGCTGGCAGTATTCCCACAG3'

As reações foram compostas de 1µL de DNA genômico (aproximadamente 50 ng), 0,4 µL de cada primer (iniciador) a 10 pMol, 10 µL do Mastermix 2X (dNPTs, enzima Taq Polimerase e tampão) (Cellco) e 8,2 µL de água deionizada. As reações de amplificação foram conduzidas em um Termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 seg, hibridização a 55 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 1 min e 72 °C por 5 min para finalizar a extensão. O tamanho do fragmento esperado para leveduras da espécie *S. cerevisiae* com esses iniciadores é de 837 pbs. Amplificações com tamanhos diferentes do esperado foram caracterizados como leveduras não-*S. cerevisiae*.

Para visualização dos produtos da PCR, foi realizado procedimento de eletroforese em gel de agarose 1% com comparação com padrões prévios positivos de amplificação. DNA extraído de *Candida albicans* foi utilizado como controle não-*Saccharomyces* e a cepa comercial de *S. cerevisiae* CAT-1 amplamente utilizada na produção de etanol como controles *Saccharomyces*.

5.6. Curva de crescimento

As leveduras isoladas e identificadas como diferentes foram utilizadas em ensaios fermentativos visando caracterizar o seu crescimento e consumo de sacarose em condições semelhantes às de produção industrial de etanol.

A curva de crescimento de leveduras foi realizada com o objetivo de avaliar o crescimento de diferentes linhagens de leveduras em meios com diferentes composições, utilizando a medida de Densidade Óptica (DO) a 600 nm. A DO foi medida em intervalos de tempo definidos, a cada 2 horas, para monitorar o desenvolvimento das culturas de levedura. O experimento foi conduzido com o pré-inóculo das leveduras, que foi incubado em meio YPD 2% a 30°C por 16–18 horas, utilizando *shaker* a 180 rpm, para garantir um crescimento rápido e uniforme.

Foi utilizado um tipo de meio para o cultivo das leveduras: o YPD 4%, um meio básico. Em seguida, as amostras foram incubadas em tubos falcons de 50 mL a 30°C sob agitação constante, e as leituras de DO foram realizadas a cada 2 horas ao longo de 8 horas.

A curva de crescimento foi construída a partir das medições de DO a 600 nm ao longo do tempo. As diferentes linhagens de leveduras foram observadas para verificar a capacidade de crescimento em diferentes condições de cultivo. Esse método de monitoramento do crescimento das leveduras e da viabilidade celular é essencial para otimizar processos fermentativos e tem aplicação direta na indústria de biotecnologia, como na produção de bioetanol.

5.7. Análise de consumo de glicose

Inicialmente, foi preparada uma curva padrão de glicose utilizando soluções padrão de glicose de concentrações conhecidas, para servir como referência na análise das amostras. As soluções padrão foram preparadas diluindo uma solução estoque de glicose em água destilada para obter diferentes concentrações.

A curva padrão foi construída ao misturar as soluções padrão com o reagente enzimático fornecido pelo kit da Analisa, que contém a enzima glicose oxidase. A glicose oxidase catalisa a conversão da glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio

(H₂O₂). O peróxido de hidrogênio gerado na reação reage com outro componente do sistema enzimático para formar um complexo colorido, cuja intensidade é proporcional à quantidade de glicose presente na amostra. A absorbância foi medida a 505 nm, e a concentração de glicose foi determinada a partir da curva padrão, correlacionando a absorbância medida nas amostras com a dos padrões de glicose.

Para as amostras de fermentação, foi coletada uma alíquota de cada amostra após o processo de fermentação e preparada da mesma forma que as soluções padrão. As amostras foram misturadas com o reagente enzimático do kit e incubadas de acordo com as instruções do fabricante, geralmente por um período de 10 minutos, a uma temperatura de 37°C. Após esse tempo, as absorbâncias das amostras foram lidas a 505 nm em um espectrofotômetro.

A quantificação de glicose foi realizada comparando as absorbâncias das amostras com a curva padrão previamente construída. A concentração de glicose nas amostras foi então calculada utilizando a equação obtida a partir da curva padrão, que relaciona a absorbância com a concentração de glicose.

Assim, o método enzimático-colorimétrico (Trinder) com glicose oxidase é uma técnica precisa e confiável para a determinação de glicose em amostras, especialmente em sistemas biológicos como os de fermentação. A construção da curva padrão foi fundamental para garantir a precisão na quantificação de glicose nas amostras, permitindo uma avaliação detalhada do consumo de glicose pelas leveduras durante o processo fermentativo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Coleta de materiais

As amostras da cana-de-açúcar das variedades RB 855453, RB 92579 e RB 855156 foram retiradas diretamente de um canavial localizado dentro do Centro de Ciências Agrárias (CCA) localizado na Universidade Federal de São Carlos, *campus* Araras, São Paulo. Após a coleta, foram colocadas em uma caminhonete a fim de serem transportadas até o Laboratório de Análise e Simulação Tecnológica (LAST).



Figura 3: Canavial localizado no CCA, Araras, SP.

Fonte: Autora, 2025.

A extração do caldo foi realizada segundo Consecana, mais especificamente a norma ABNT 16221, utilizando-se uma prensa hidráulica usada para a extração de caldo de cana-de-açúcar. Ele funciona aplicando pressão nas canas, extraindo o suco. A máquina é composta por cilindros e pistões que, ao serem acionados, comprimem as canas e liberam o líquido. Esse tipo de prensa é comumente utilizado na indústria sucroalcooleira.



Figura 4: Prensa hidráulica do LAST.

Fonte: Autora, 2025.

6.2. Plaqueamento das amostras

As amostras de caldo do colmo de cada variedade de cana-de-açúcar foram diluídas em 10 mL de água ultrapura, seguidas por cinco diluições em série para plaqueamento em placa de Petri contendo o antibiótico ampicilina, seguido por incubação a 30°C *overnight* em estufa visando seu crescimento, conforme descrito por Cabrini e Gallo. As utilizadas para isolamento na próxima etapa da metodologia foram aquelas que apresentaram maior número de colônias, foram as de diluição -1 e -2.

Além disso, 40 mL de cada caldo foram submetidos à fermentação sob agitação de 200 rpm, em uma temperatura de 30 °C, por um período de 24 horas. O objetivo principal dessa etapa foi favorecer seletivamente o crescimento de leveduras, em especial *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que, em processos fermentativos com produção de etanol, leveduras dessa espécie apresentam maior tolerância ao etanol e são

reconhecidamente capazes de conduzir a fermentação até o seu término, mesmo sob concentrações elevadas desse composto.

Dessa forma, essa etapa fermentativa atuou como um filtro seletivo, promovendo o enriquecimento de microrganismos mais adaptados a ambientes com altos teores de etanol, visto que são o objetivo principal deste estudo. Após o período de fermentação, procedeu-se à mesma etapa de diluição seriada e plaqueamento em meio YPD suplementado com ampicilina, com o intuito de inibir o crescimento bacteriano e permitir a recuperação seletiva das leveduras.

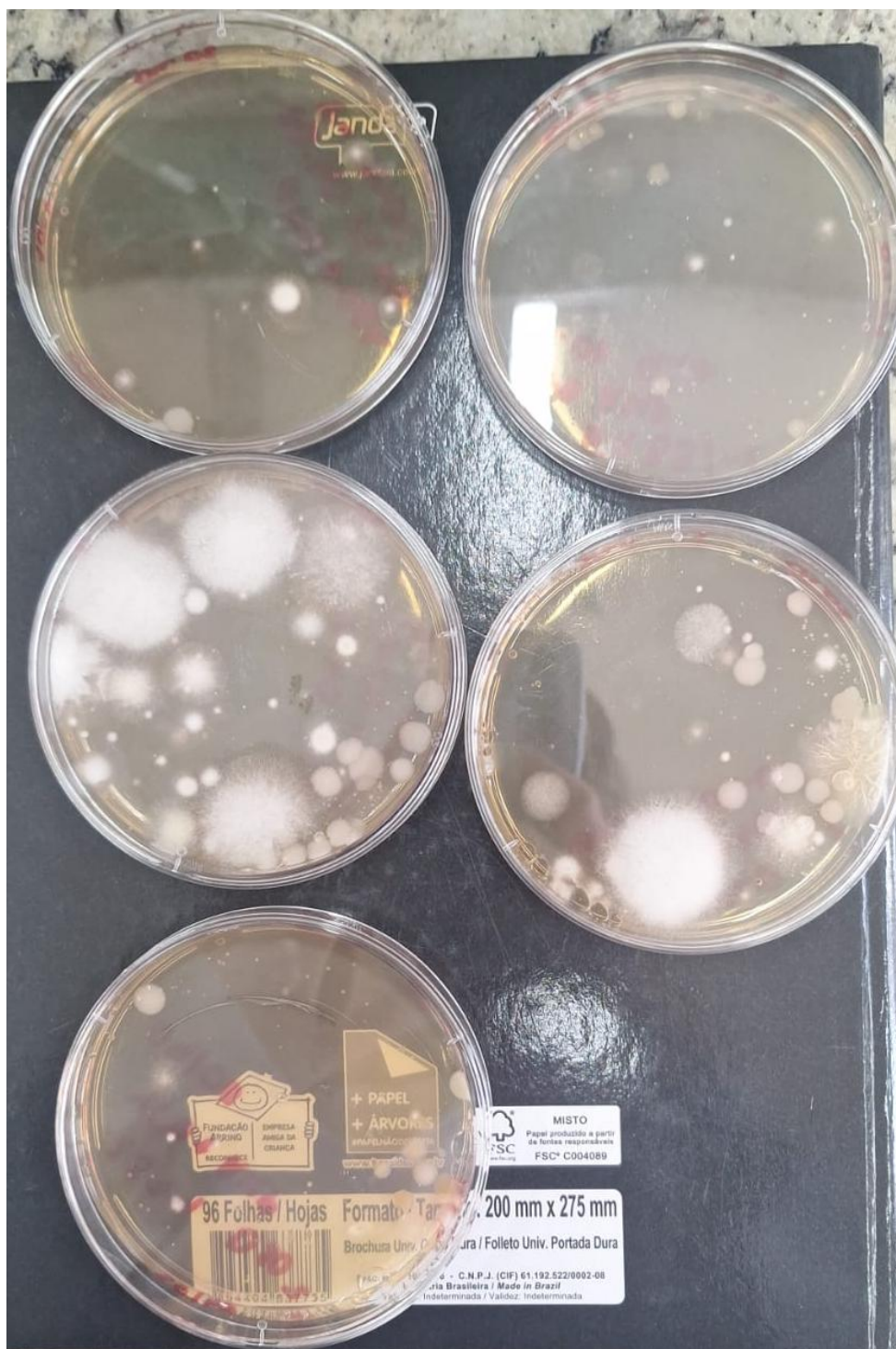


Figura 5: Placas diversas contendo o caldo direto do colmo, ou seja, que não passaram por fermentação espontânea como processo seletivo.

Fonte: Autora, 2025.

Foi possível observar um incremento expressivo no número de colônias, indicando que a fermentação espontânea proporcionou condições mais favoráveis para a multiplicação dos microrganismos presentes na amostra. As imagens a seguir evidenciam de forma clara e significativa essa diferença, demonstrando um aumento marcante na densidade e diversidade aparente de colônias em comparação às placas iniciais.

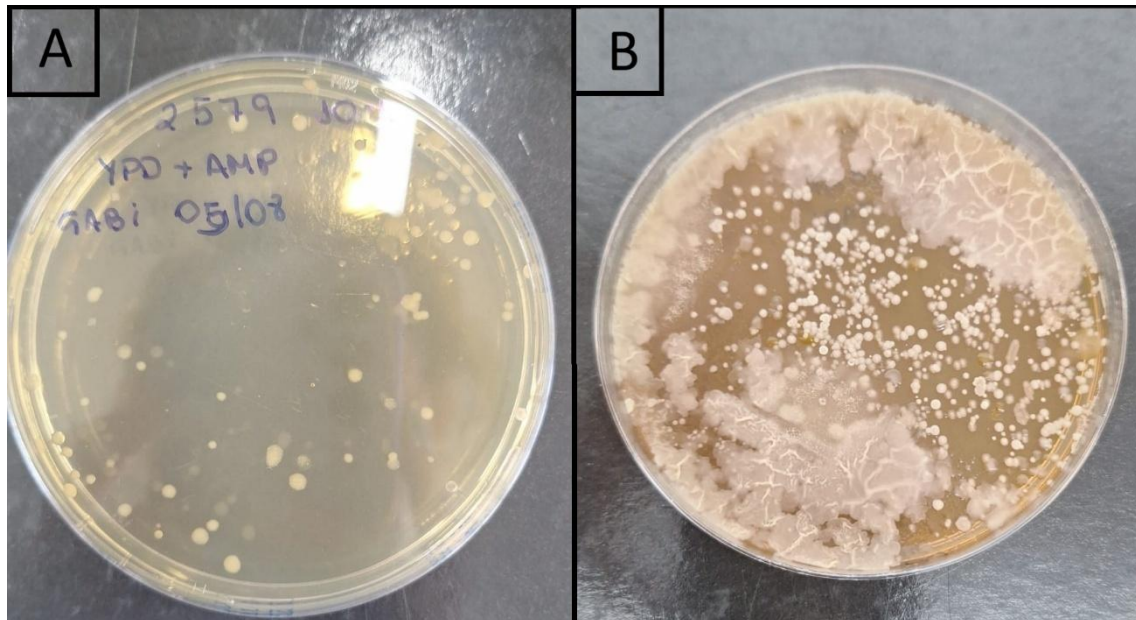


Figura 6: Comparativo da placa da variedade 922579: a da esquerda (A) não passou por fermentação espontânea, enquanto a da direita (B) foi submetida à esse processo.

Fonte: Autora, 2025.

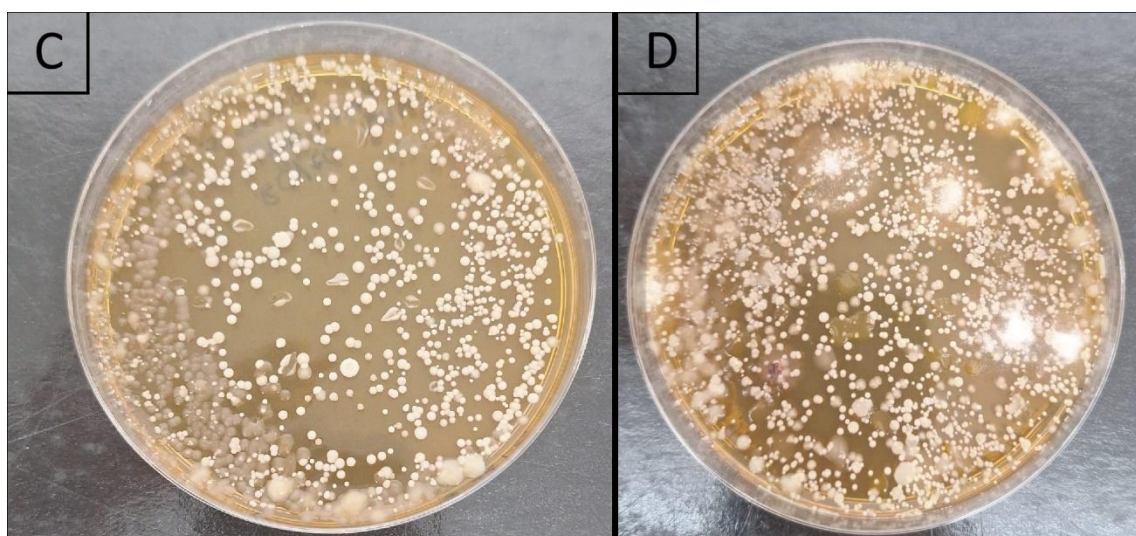


Figura 7: Placa da variedade 855156 (C) e 855453 (D), ambas passaram pela fermentação espontânea.

Fonte: Autora, 2025.

6.3. Isolamento de leveduras cultiváveis

Todas as colônias de leveduras que obtiveram crescimento, especialmente nas placas de diluição -1 e -2 (como explicitado no tópico anterior), foram isoladas em placas individuais a partir do método de repicagem, seguidas de crescimento em estufa à 30°C *overnight*. Nesse momento a colônia isolada também foi inoculada em 800 µL de YPD 2% líquido e foram incubadas *overnight*, para no dia seguinte ser acrescentado 800 µL do criogênico glicerol 60%, e os tubos foram armazenados em freezer a -80°C, conforme descrito por Novello (2015).

As duas placas isoladas da variedade 5453 (totalizando 50 colônias isoladas) apresentaram em sua totalidade colônias alaranjadas, redondas e brilhantes. Essa morfologia não é a esperada para *Saccharomyces cerevisiae*, que se espera uma cor de branca a creme, com uma opacidade alta (Vopálenská, 2005).

No caso da variedade 5156, apenas houveram colônias isoladas para uma única placa (25 colônias isoladas). Majoritariamente houveram colônias alaranjadas e brilhantes, assim como observado na variedade 855453.

As amostras isoladas da variedade 2579 apresentaram colônias mais diferenciadas em comparação às outras duas. As amostras isoladas do solo, que foi diluído 1 grama em 9,0 mL de água, seguida por diluições seriadas, apresentaram colônias brancas, opacas e circulares. Em contrapartida, os isolados das amostras que passaram por 24 horas em *shaker* com o objetivo de aerar e favorecer o crescimento microbiano apresentaram-se com colônias muito similares às esperadas para *Saccharomyces* (Figura 6).

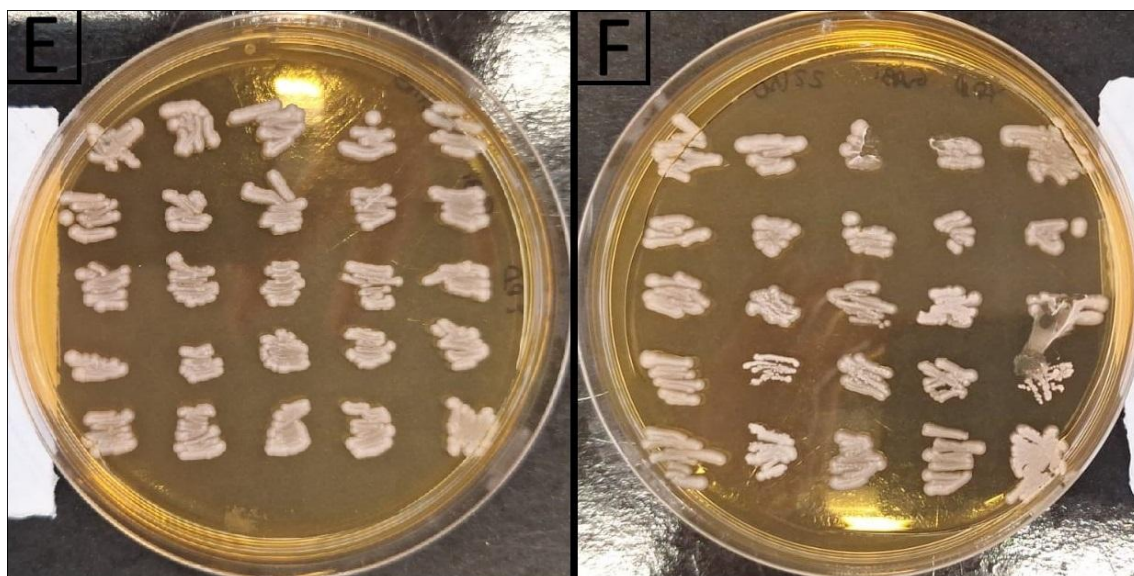


Figura 8: Amostras isoladas da 92579 fermentada (E) e da 855156 fermentada (F).

Fonte: Autora, 2025.

6.4. Amplificação da região ITS

Após a extração de DNA dos fungos cultiváveis isolados em placa YPD pelo método de fenol-clorofórmio, foi realizada a amplificação pela reação de PCR. O fragmento de interesse é o que compreende a região intergênica ITS-1 e ITS-4, espaçadores internos dos genes que codificam para o RNA ribossômico nuclear em eucariotos. Para visualização dos produtos da PCR, foi realizado procedimento de eletroforese em gel de agarose 1% com comparação com padrões prévios positivos de amplificação, a CAT-1.

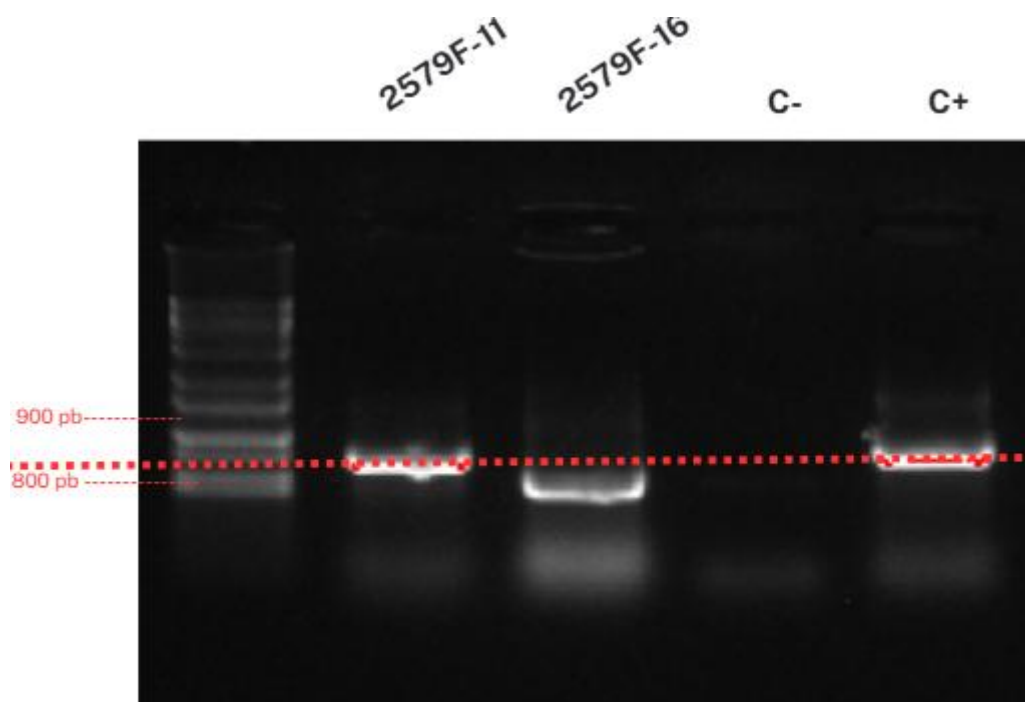


Figura 9: Amplificação por PCR da região ITS revelado pelo ImageLab.

Fonte: Autora, 2025.

Como pode-se observar na figura 9, as duas amostras da variedade 2579 que passaram por fermentação (11 e 16) apresentaram fragmento de amplificação. Entretanto, a primeira apresentou um fragmento de tamanho similar ao controle positivo que é uma levedura *S. cerevisiae*, enquanto a segunda é de tamanho menor, cerca de 700 pb.

Dessa forma, foram realizadas comparações entre o tamanho de cada fragmento amplificado (quando presente) para a região ITS com a do controle positivo, comprovadamente *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. Aqueles selecionados foram submetidos ao sequenciamento descrito na etapa posterior com o objetivo de se verificar se algumas das linhagens isoladas pertenceriam ao gênero *Saccharomyces*.

Antes da etapa de sequenciamento, as amostras foram purificadas conforme descrito em Materiais e Métodos.

6.5. Sequenciamento

O primeiro sequenciamento foi realizado em novembro de 2025, a partir de amostras isoladas diretamente do caldo do colmo das três variedades de cana-de-açúcar. Contudo, praticamente todas as sequências obtidas corresponderam à espécie *Hanseniaspora*, sendo que as únicas exceções foram *Wickerhamomyces anomalus* e *Lachancea thermotolerans*, ambas detectadas em amostras da variedade 2579. Tendo isso em vista, levantou-se a hipótese de que, nos estágios iniciais do caldo (antes da fermentação), a quantidade de microrganismos é consideravelmente baixa para representantes do gênero *Saccharomyces*.

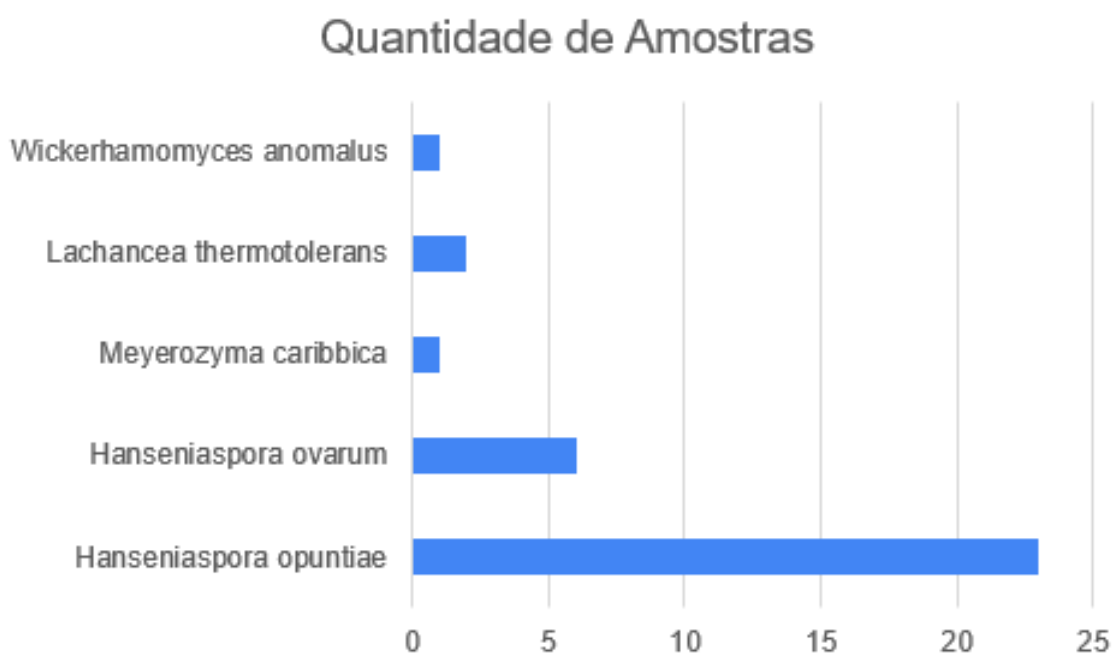


Gráfico 1: Leveduras identificadas no caldo do colmo.

Fonte: Autora, 2025.

Portanto, nesse caldo in natura, foram isoladas predominantemente outras espécies que não são as de interesse desse estudo. Dinâmica semelhante é descrita na fermentação de vinho, em que leveduras não-*Saccharomyces* tendem a predominar nos estágios iniciais, antes do estabelecimento de populações de *Saccharomyces cerevisiae* (Lleixá, J. et al., 2016; Padilla, Gil & Manzanares, 2016).

Dessa forma, em etanol combustível de cana, o caldo in natura pode ter baixa abundância de *Saccharomyces* e presença de várias outras leveduras e bactérias. Porém, na usina, o processo é inoculado e reciclado justamente para aumentar e manter populações enormes de *S. cerevisiae* ao longo dos ciclos de fermentação.

Para testar essa hipótese, o caldo foi submetido a 24 horas de fermentação espontânea, sob agitação de 200 rpm e em temperatura controlada a 30°C (explicado anteriormente) aos mesmos testes de PCR com primers do ITS-1 e ITS-4, finalizando com o sequenciamento. Os resultados, por sua vez, foram mais promissores, indicando que maior concentração de etanol ocasiona à diminuição de competição de microrganismos por substrato, favorecendo o gênero *Saccharomyces*:

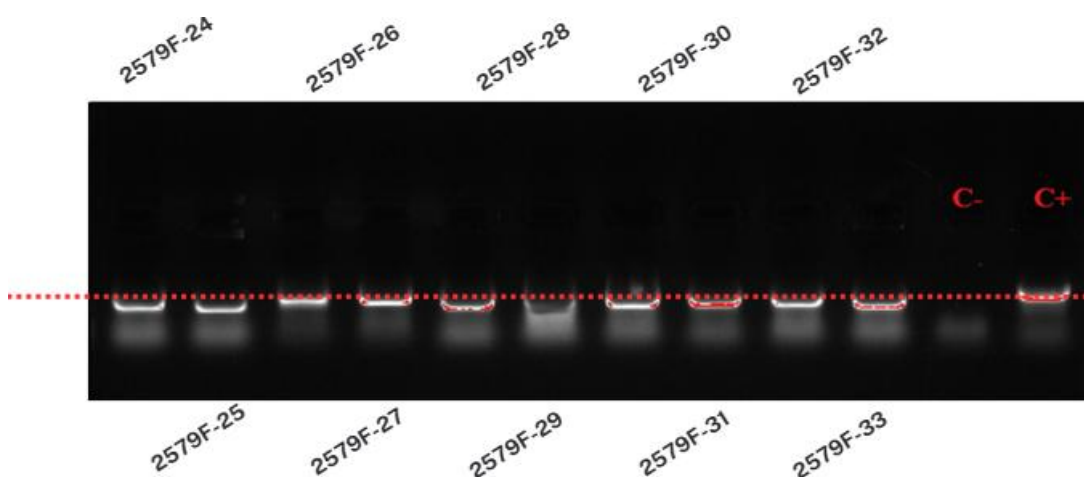


Figura 10: Gel de eletroforese de amostras que foram submetidas à fermentação espontânea. Todas apresentaram amplicon de mesmo peso que o controle positivo (*Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 – amostra mais a direita).

Fonte: Autora, 2025.

Após o sequenciamento das amostras que foram submetidas à fermentação espontânea, foram elaborados dois gráficos: o primeiro apresenta a proporção de leveduras cuja identificação em nível de espécie foi realizada com sucesso (Gráfico 2), enquanto o segundo demonstra a quantificação dos microrganismos identificados, distribuídos de acordo com cada espécie (Gráfico 3). Conforme esperado, observou-se o aparecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Resultado do sequenciamento

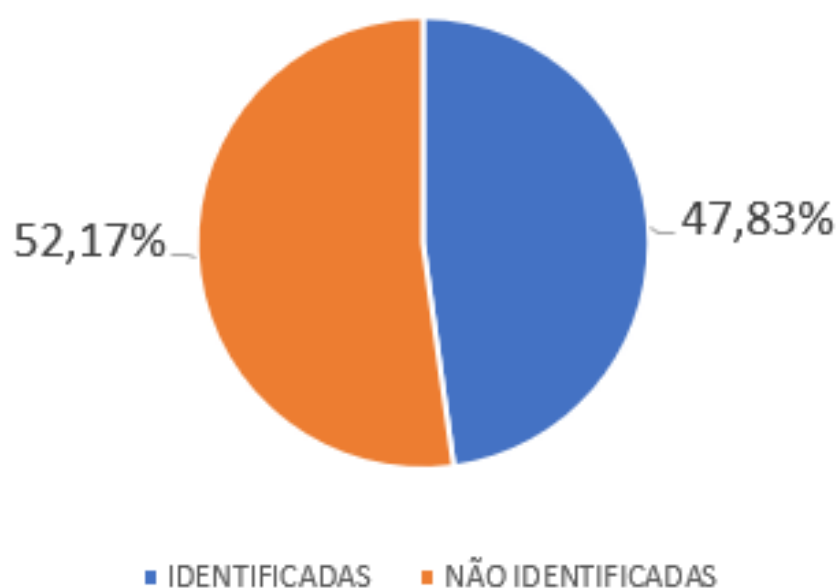


Gráfico 2: Relação de espécies identificadas e não identificadas no segundo sequenciamento, realizado com amostras submetidas à fermentação espontânea.

Fonte: Autora, 2025.

Espécies identificadas

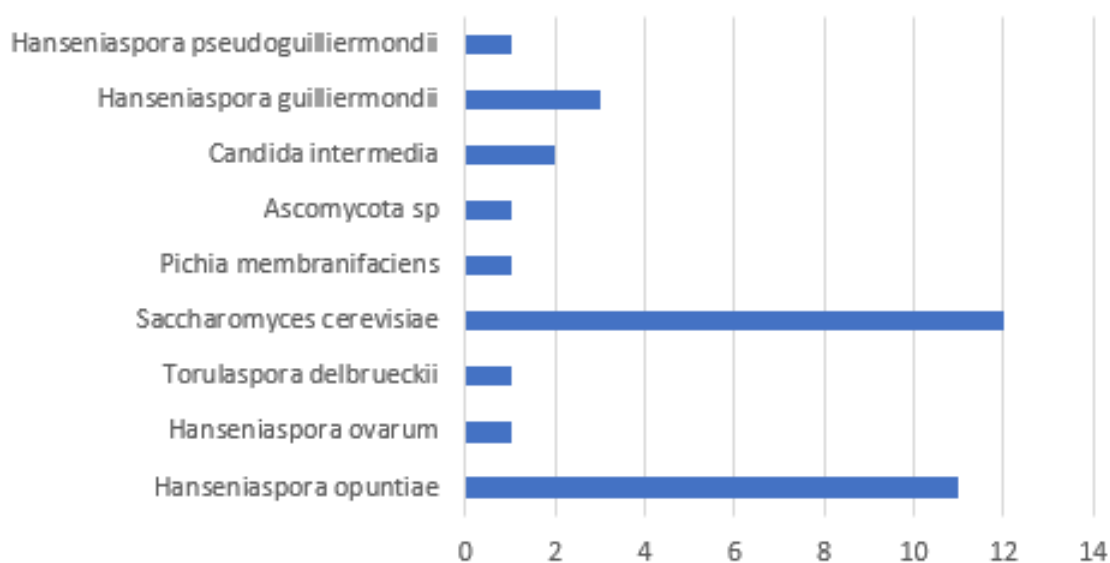


Gráfico 3: Espécies identificadas no sequenciamento das amostras que foram submetidas à fermentação espontânea.

Fonte: Autora, 2025.

6.6. Curva de crescimento

No gráfico 4, gerado pelo software Excel, estão registradas todas as amostras que foram submetidas ao experimento explicado, comparadas à linhagem comercial CAT-1. Posteriormente, selecionamos as cinco linhagens com melhor desempenho de crescimento (Gráfico 5) que apresentaram crescimento superior a CAT-1. É importante ressaltar que isso não significa que são melhores do ponto de vista fermentativo, porém representa um resultado relevante, indicando que seria interessante estudar mais profundamente as selecionadas.

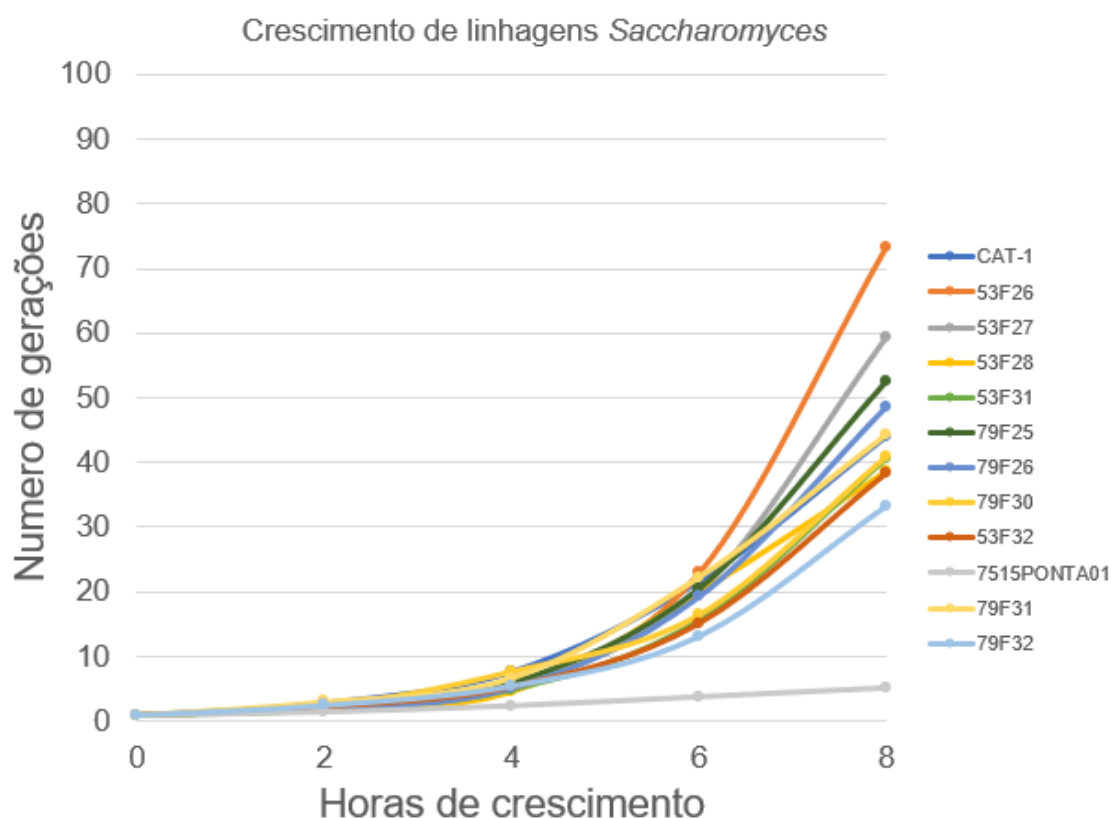


Gráfico 4: Todas as linhagens *Saccharomyces* estudadas quanto ao crescimento celular comparado à linhagem comercial CAT-1.

Fonte: Autores, 2025.

Portanto, as amostras que apresentaram crescimento superior ao da cepa comercial CAT-1 foram 855453-26, 855453-27, 92579-25, 92579-26 e 92579-31 (Gráfico 05). Esse resultado é relevante no contexto da indústria sucroenergética, pois linhagens capazes de crescer de forma igual ou superior a uma cepa amplamente utilizada podem indicar maior aptidão fisiológica para se manterem competitivas em condições de processo.

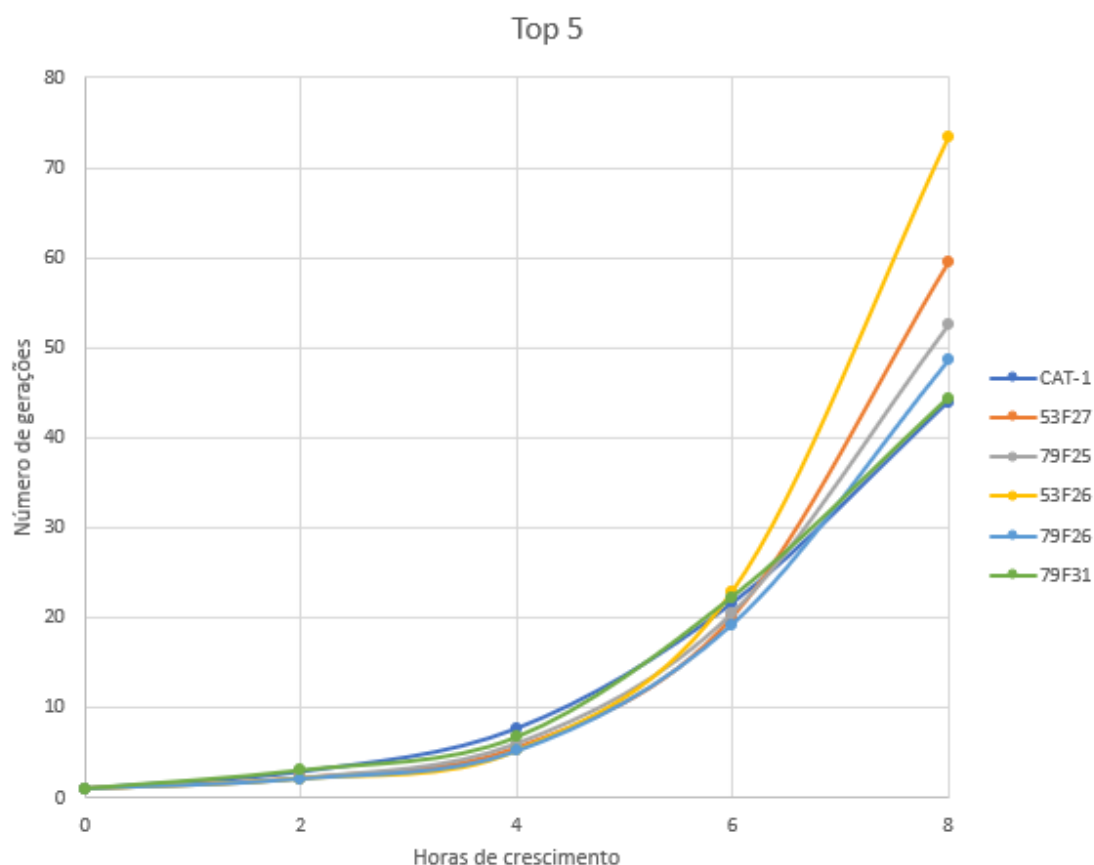


Gráfico 5: As 5 melhores linhagens *Saccharomyces* que obtiveram crescimento superior ou similar ao da CAT-1.

Fonte: Autores, 2025.

Não obstante, a associação entre desempenho de crescimento e identificação molecular reforça a hipótese central deste trabalho de que a cana-de-açúcar pode atuar como reservatório de linhagens nativas com potencial biotecnológico. De acordo com o que é descrito para cepas nativas, a adaptação ao substrato e ao ambiente de origem pode

contribuir para melhor desempenho em características de interesse industrial, justificando a seleção dessas linhagens como candidatas para validações posteriores.

Finalmente, cabe ressaltar que crescimento celular, embora seja um indicativo importante, não equivale necessariamente a maior eficiência fermentativa. Dessa forma, a confirmação do potencial tecnológico dessas linhagens requer ensaios complementares, incluindo consumo de açúcares, produção de etanol e tolerância a estresses típicos do processo, conforme recomendado na literatura para validação de cepas com aptidão industrial.

6.7. Análise de consumo da glicose

Em razão de inconsistências observadas durante a execução dos ensaios, possivelmente relacionadas ao reagente Analisa utilizado, os testes fermentativos não apresentaram resultados conclusivos até a data de elaboração deste documento. Ainda, a limitação de tempo disponível para a realização dos experimentos contribuiu para a impossibilidade de obtenção de dados consistentes. Está prevista a aquisição de um novo reagente, a fim de que os testes sejam repetidos e os resultados devidamente obtidos e analisados.

7. CONCLUSÃO

Este estudo isolou, identificou e caracterizou leveduras naturais associadas ao colmo da cana-de-açúcar de diferentes variedades, por meio de isolamento em cultivo, amplificação e sequenciamento da região ITS e avaliação do crescimento celular. As amostras obtidas diretamente do caldo in natura apresentaram predominância de leveduras não-*Saccharomyces*, especialmente do gênero *Hanseniaspora*, enquanto a fermentação espontânea por 24 horas favoreceu o enriquecimento seletivo de *Saccharomyces*. Entre as 12 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas, cinco exibiram crescimento superior ao da cepa comercial CAT-1, evidenciando a cana-de-açúcar como uma fonte consistente de linhagens autóctones com potencial biotecnológico. A etapa de consumo de glicose não foi concluída por limitações técnicas do reagente, porém os resultados obtidos já estabelecem uma base sólida para a seleção de linhagens promissoras e para etapas posteriores de validação tecnológica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRION, B. C. Isolamento, caracterização taxonômica e aplicação de leveduras no processo de fabricação de cervejas personalizadas. 2022. *Dissertação (Doutorado em Biotecnologia)* – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.
- ARGUESO, J. L. *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*, v. 19, n. 12, p. 2258–2270, 2009.
- BASSO, R. F. Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas. 2019. *Dissertação (Mestrado em Ciências)* – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agricola*, v. 56, n. 1, p. 207–216, 1999.
- CARVALHO-NETTO, O. V. *et al.* 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*, v. 168, n. 4, p. 701–709, 2013.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. *et al.* Sugarcane (*Saccharum* × *officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*, p. 62–89, 2011.
- COMPANT, S. *et al.* A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, v. 19, p. 29–37, 2019.
- CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar: safra 2024/2025*. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2025.
- CONSECANA-SP. *Manual de instruções*. 6. ed. Piracicaba: Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Etanol do Estado de São Paulo, 2015.
- CORBU, V. M. *et al.* Current insights in fungal importance: a comprehensive review. *Microorganisms*, 2023.
- COSTA, F. F. *et al.* Sugarcane: an unexpected habitat for black yeasts in Chaetothyriales. *IMA Fungus*, v. 14, n. 1, 2023.
- DE ANDRADE, L. A. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 2023.

DE GUIDI, I. *et al.* Yeast domestication in fermented food and beverages: past research and new avenues. *Current Opinion in Food Science*, v. 51, 2023.

DE SOUZA, J. P. *et al.* Improvement of Brazilian bioethanol production: challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Biology*, v. 122, n. 6, p. 583–591, 2018.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999.

FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present. *Microorganisms*, 7(5), mai. 2019, 130.

GALDOS, M. V. *et al.* The role of ethanol as a gasoline substitute in Brazil: lessons learned. *Energy Policy*, v. 122, p. 382–395, 2018.

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, 1996.

HOFFMAN, C. S. Preparation of yeast DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*, v. 39, n. 1, 1997.

JACOBUS, A. P. *et al.* Comparative genomics supports that Brazilian bioethanol *Saccharomyces cerevisiae* comprise a unified group of domesticated strains related to cachaça spirit yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021.

KARPYN ESQUEDA, Mijail; YEN, Alan L.; ROCHFORD, Simone; GUTHRIDGE, Kathryn M.; POWELL, Kevin S.; EDWARDS, Jacqueline; SPANGENBERG, German C. A Review of Perennial Ryegrass Endophytes and Their Potential Use in the Management of African Black Beetle in Perennial Grazing Systems in Australia. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2017.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). The yeasts: a taxonomic study. *San Diego: Elsevier*, 2011. Cap. 1, p. 3.

KHAN, S. *et al.* Microalgal feedstock for biofuel production: recent advances, challenges, and future perspective. *Fermentation*, 2023.

KHUNNAMWONG, P.; JINDAMORAKOT, S.; LIMTONG, S. Endophytic yeast diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand. *Fungal Biology*, v. 122, n. 8, p. 785–799, 2018.

- KROGERUS, R.; MAGALHÃES, F.; GIBSON, B. High ethanol resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is associated with expression of genes involved in cell wall integrity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 21, p. 9895–9906, 2016.
- LEGRAS, J.-L. *et al.* Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 7, p. 1712–1727, 2018.
- LIANG, L. *et al.* Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 35, p. 1605–1613, 2008.
- LIU, Q. *et al.* Rhizosphere fungal dynamics in sugarcane during different growth stages. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 6, 2023.
- LLEIXÀ, J. *et al.* *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* competition during microvinification. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.
- MARTINI, C. *Avaliação dos aspectos microbiológicos do caldo de diferentes variedades e partes do colmo da cana-de-açúcar sob manejo orgânico*. 2009. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2009.
- MARTINI, C. *et al.* Yeast composition of sugar cane juice in relation to plant varieties and seasonality. *Bioscience Journal*, v. 27, n. 5, p. 710–717, 2011.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- MARTINS, J. G. de O.. Caracterização genética e fisiológica de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens para produção cervejeira: desenvolvimento de um scale up industrial. 2023. *Monografia (Exame Geral de Qualificação de Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia*, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023
- MOITINHO, M. R. *et al.* Effects of burned and unburned sugarcane harvesting systems on soil CO₂ emission. *Catena*, v. 196, 2021.
- MORAIS, C. G. *et al.* Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. *Fungal Biology*, v. 124, n. 7, p. 639–647, 2020.
- NAYLOR, D.; COLEMAN-DERR, D. Drought stress and root-associated bacterial communities. *Frontiers in Plant Science*, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NOVELLO, A. P. *Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando processo de fermentação extrativa*. 2015. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

OWNLEY, Bonnie H.; GRIFFIN, Mary R.; KLINGEMAN, William E.; GWINN, Kimberly D.; MOULTON, J. Kevin; PEREIRA, Roberto M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, n. 3, p. 267–270, 2008.

PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.

PARAPOULI, M. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2020.

RAY, P. *et al.* Microbe to microbiome: a paradigm shift in the application of microorganisms for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 2020.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S. *et al.* Diversity of cultivated fungi associated with conventional and transgenic sugarcane. *PLOS ONE*, v. 11, n. 7, 2016.

RUÉ, O. *et al.* Comparison of metabarcoding taxonomic markers to describe fungal communities in fermented foods. *Peer Community Journal*, v. 3, 2023.

SCHWAN, R. F. *et al.* Microbiology and physiology of cachaça fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 79, n. 1, p. 89–96, 2001.

SILVA, C. A. A.; OKA, M. L.; FONSECA, G. G. Physiology of yeast strains isolated from Brazilian biomes. *3 Biotech*, v. 9, 2019.

SILVA, H. S. *et al.* Microbial communities in the rhizosphere of sugarcane. *Sugar Tech*, v. 22, 2020.

TORROBA, A.; OROZCO, R. *Atlas de los biocombustibles líquidos: 2021–2022*. San José: IICA, 2022.

VANDANA, U. K. *et al.* The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions. *Biology*, v. 10, n. 2, 2021.

- VERA, I.; WICKE, B.; VAN DER HILST, F. Spatial variation in environmental impacts of sugarcane expansion in Brazil. *Land*, v. 9, n. 10, 2020.
- VIANA, N. C. *et al.* Molecular characterization of dominant yeast strains isolated during ethanol fermentation. *Revista de Agricultura*, v. 95, n. 1, p. 48–58, 2020.
- VON GASTROW, L. *et al.* Microbial community dispersal from wheat grains to sourdoughs. *Molecular Ecology*, v. 32, n. 10, p. 2413–2427, 2023.
- VOPÁLENSKÁ, I. *et al.* The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *Research in Microbiology*, v. 156, n. 9, p. 921–931, 2005.
- WALKER, G. M.; BASSO, L. C. *Saccharomyces cerevisiae* strains PE-2 and CAT-1: references and characteristics. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.
- ZHUANG, S.; RENAULT, N.; ARCHER, I. Multidisciplinary engineering in fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, v. 339, p. 32–41, 2021.