

**Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)**  
**Departamento de Genética e Evolução (DGE)**

DARIO SAMPAIO DA SILVA

**PREVALÊNCIA DE LEVEDURAS DA ESPÉCIE *SACCHAROMYCES*  
*CEREVISIAE* NA PRODUÇÃO DE ETANOL: SELEÇÃO DE  
LINHAGENS PROMISSORAS PARA O MELHORAMENTO DA  
EFICIÊNCIA PRODUTIVA**

SÃO CARLOS - SP  
2026

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**DARIO SAMPAIO DA SILVA**

**PREVALÊNCIA DE LEVEDURAS DA ESPÉCIE *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* NA PRODUÇÃO DE ETANOL: SELEÇÃO DE  
LINHAGENS PROMISSORAS PARA O MELHORAMENTO DA  
EFICIÊNCIA PRODUTIVA**

Trabalho apresentado à banca examinadora da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biologia Molecular  
Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

SÃO CARLOS - SP

2026

## RESUMO

A produção de etanol combustível no Brasil depende do desempenho de leveduras industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas a sucessivos estresses durante o processo fermentativo. Neste trabalho, vinte linhagens industriais foram avaliadas por meio da integração de análises moleculares e fisiológicas, tendo a linhagem CAT-1 como controle, com o objetivo de selecionar cepas promissoras para aplicação industrial. As análises moleculares confirmaram a identidade das linhagens como *S. cerevisiae* e evidenciaram elevada diversidade genética, com a formação de quatro grupos genotípicos principais, além das linhagens que apresentaram perfil genotípico exclusivos. A avaliação do desempenho fisiológico, baseada no perfil de crescimento em diferentes meios, permitiu a obtenção do Índice de Desempenho Total (IDT), destacando as linhagens 2018-12, 2018-08, 2023-02 e 2022-13 com crescimento superior ao controle. A tolerância ao estresse ácido, avaliada por viabilidade e concentração celular após tratamento ácido, foi integrada no Índice de Tolerância ao Tratamento Ácido (ITA), evidenciando as linhagens 2022-15 e 2023-06 como uma das mais resistentes. A análise conjunta dos índices IDT e ITA permitiu classificar as linhagens em três perfis fisiológicos distintos: alta performance de crescimento e baixa tolerância ao ácido; alta tolerância ao ácido e desempenho moderado; e equilíbrio entre crescimento e tolerância ao estresse. Nesse contexto, as linhagens 2022-13 e 2022-04 destacaram-se pelo desempenho equilibrado, configurando-se como as candidatas mais promissoras para aplicação em processos industriais de produção de etanol. Esses resultados demonstram que a integração de abordagens moleculares e fisiológicas constitui uma estratégia eficiente para a seleção de leveduras adaptadas ao ambiente fermentativo industrial.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*; etanol combustível; ITS; genotipagem; perfil de crescimento; tratamento ácido; linhagens promissoras.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplificação da estrutura do gene do RNA ribossômico e suas subunidades com regiões espaçadoras.....	14
Figura 2. Delineamento experimental do perfil de crescimento e ensaio de viabilidade por Dropout das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
Figura 3. Delineamento experimental do ensaio de tolerância ao estresse ácido em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
Figura 4. Perfil de amplificação da região ITS (primers ITS1 e ITS4) de isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
Figura 5. Perfis de amplificação obtidos para os marcadores moleculares SPA2c (P1), MNN4c (P2), PIR3c (P3), EPL1 (P4) e SPAG3 (P5) em isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
Figura 6. Perfil de crescimento das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio YPD 4% expressa em número de gerações celulares (n).....	35
Figura 7. Perfil de crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> em meio YPD 2% / Sacarose 10% expressa em número de gerações celulares (n).....	35
Figura 8. Perfil de crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> em meio YPD 4% / Etanol 12% expressa em número de gerações celulares (n).....	36
Figura 9. Distribuição dos valores de AUC (n.h) das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos três meios de cultivo.....	37
Figura 10. Desempenho de crescimento das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos diferentes meios de cultivo.....	37
Figura 11. Índice de Desempenho Total (IDT) ponderado das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> nos três meios de cultivo.....	39
Figura 12. Avaliação da viabilidade celular das linhagens de leveduras por plaqueamento dropout após crescimento em diferentes meios de cultivo.....	40

<b>Figura 13. Efeito do tratamento ácido (pH 2,0 por 30 min) sobre a viabilidade celular de linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 14. Efeito do tratamento ácido (pH 2,0 por 30 min) sobre a viabilidade celular de linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 15. Índice de Tolerância ao Tratamento Ácido (ITA) das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após cinco ciclos de exposição ao pH 2.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 16. Painel comparativo do crescimento de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após tratamento ácido (pH 2).....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Genes, Iniciadores e Temperatura de Melting (°C).....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 2. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> selecionadas do Banco de Leveduras do LBGA e utilizadas neste estudo.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 3. Valores de área sob a curva de crescimento (AUC, n-h), médias, desvios padrão, escores padronizados (Z-score) e Índice de Desempenho Total (IDT) das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos diferentes meios de cultivo.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 4. Viabilidade celular, contagem total de células e Índice de Tolerância ao Ácido (ITA) das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após exposição ao tratamento ácido.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 5. Classificação das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> quanto ao desempenho global (IDT) e tolerância ao estresse ácido (ITA).....</b>	<b>50</b>

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1. Produção de Etanol: Obtenção e Processos .....	11
2.2. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> na Produção de Etanol.....	11
2.3. Fermentação Alcoólica e Metabolismo de <i>S. Cerevisiae</i> .....	12
2.4. Seleção e Caracterização de Leveduras .....	13
OBJETIVOS .....	15
2.5. Objetivo Geral .....	15
2.6. Objetivos Específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
3.1. Seleção e Identificação de Linhagens Prevalentes .....	16
3.2. Extração de DNA.....	17
3.3. Identificação por Internal Transcribed Spacer (ITS).....	17
3.4. Genotipagem.....	18
3.5. Perfil das Curvas de Crescimento em Diferentes Meios .....	19
3.6. Avaliação da Viabilidade Celular após Tratamento Ácido .....	23
3.6.1. Tratamento Ácido ( $H_2SO_4$ ).....	23
3.6.2. Plaqueamento por Método Spot Assay .....	25
3.6.3. Contagem em Câmara de Neubauer.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Seleção e Identificação de Linhagens Prevalentes .....	28
4.2. Extração de DNA e Identificação por Internal Transcribed Spacer (ITS) .....	29
4.3. Genotipagem.....	30
4.4. Perfil das Curvas De Crescimento em Diferentes Meios .....	32
4.5. Avaliação da Tolerância após Tratamento Ácido .....	42
5. CONCLUSÃO.....	51
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	52
7. REFERÊNCIAS .....	53
8. APÊNDICES.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia renováveis e sustentáveis tem se intensificado nas últimas décadas em função do crescimento populacional, da instabilidade dos mercados energéticos e da necessidade de mitigação das emissões de gases de efeito estufa. Nesse contexto, o etanol combustível destaca-se como uma alternativa estratégica aos combustíveis fósseis, sendo amplamente utilizado como biocombustível em diversos países. O etanol é um álcool obtido principalmente por meio da fermentação de açúcares por microrganismos, processo no qual as leveduras desempenham papel central, convertendo carboidratos de matérias primas, como cana-de-açúcar, milho e beterraba, em etanol e dióxido de carbono (BALAT, 2011; REN21, 2016).

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial da produção de bioetanol, especialmente devido à utilização da cana-de-açúcar como matéria-prima, cuja elevada produtividade agrícola e eficiência energética conferem vantagens econômicas e ambientais ao processo (AMORIM, H. V. et al., 2011). Desde a implantação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), na década de 1970, o setor sucroenergético brasileiro tem evoluído continuamente, incorporando avanços tecnológicos que resultaram em maior eficiência fermentativa, redução de impactos ambientais e ampliação da competitividade do etanol como combustível renovável (BASSO et al., 2011; WHEALS et al., 1999). Paralelamente, esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento do etanol de segunda geração (2G), produzido a partir de materiais lignocelulósicos, ampliando o aproveitamento de resíduos agroindustriais e fortalecendo a bioeconomia nacional (BALAT, 2011; REN21, 2016).

Industrialmente, a produção de etanol no Brasil ocorre predominantemente por meio dos processos de fermentação em batelada alimentada e fermentação contínua, sendo o primeiro o mais amplamente utilizado nas usinas sucroenergéticas. Nesse sistema, as dornas são alimentadas com elevadas concentrações celulares e de substrato, tipicamente na faixa de 10 a 20 g/L de biomassa e cerca de 20 °Brix, respectivamente. O mosto, constituído por caldo de cana, melaço ou pela combinação de ambos, juntamente com nutrientes e leveduras, é adicionado à dorna, onde ocorre a fermentação por um período médio de aproximadamente oito horas. Ao final desse ciclo, o conteúdo fermentado é removido e submetido à centrifugação, separando-se

o vinho — termo empregado industrialmente para o meio fermentado isento de leveduras — que segue para as colunas de destilação, do leite de levedura, destinado à reutilização no processo fermentativo (WHEALS et al., 1999; ATTFIELD et al., 2025).

O leite de levedura recuperado é então submetido ao tratamento ácido, etapa fundamental para o controle microbiológico do processo. Esse tratamento é geralmente realizado por meio da adição controlada de ácido sulfúrico até que o pH da suspensão celular atinja valores próximos a 2,0, o que favorece a redução de contaminantes bacterianos e contribui para a manutenção da dominância de *Saccharomyces cerevisiae* no sistema fermentativo. Após o tratamento ácido, as leveduras passam por etapas de lavagem para correção do pH e, posteriormente, retornam às dornas de fermentação, dando início a um novo ciclo fermentativo com uma nova carga de substrato (WHEALS et al., 1999; AMORIM H. V. et al., 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; DA SILVA FERNANDES et al., 2022).

A fermentação alcoólica industrial no Brasil é conduzida predominantemente por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, reconhecida por sua elevada capacidade fermentativa e adaptação às condições adversas como tolerância a altas concentrações de etanol, baixo pH e altas temperaturas encontradas em processos industriais contínuos (BASSO et al., 2008; STEWART, 2016). No entanto, ambientes fermentativos industriais são altamente dinâmicos e seletivos, caracterizados por variações de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, reciclagem celular e exposição recorrente a estresses químicos e fisiológicos, como o próprio tratamento ácido. Esses fatores exercem forte pressão seletiva sobre as populações de leveduras, promovendo o surgimento, a substituição e a coexistência de diferentes linhagens ao longo das safras (CARVALHO NETO et al., 2013; QIU et al., 2019).

Durante a produção industrial de etanol, são inoculadas altas concentrações da levedura no início do processo com o intuito de garantir fermentações rápidas e eficientes. Entretanto, a dinâmica microbiana em ambientes industriais é influenciada por múltiplos fatores estressantes como os já citados anteriormente, que exercem pressão seletiva sobre as populações de leveduras. Nesses ambientes, linhagens originalmente inoculadas perdem predominância ao longo das safras, sendo substituídas por leveduras residentes ou selvagens, que conseguem se adaptar melhor às condições específicas de cada usina (NETTO; DESTRUHAUT; GOMA, 1985; BASSO et al., 2008; CECCATO-ANTONINI, 2012).

Estudos de longa duração em destilarias brasileiras demonstraram que essas linhagens “residentes” podem persistir e, muitas vezes, dominar os cultivos, mantendo ou mesmo melhorando a eficiência fermentativa, o que levou os pesquisadores a isolar e caracterizar essas cepas para uso deliberado como inoculantes industriais (BASSO et al., 2008; BASSO et al., 2011). A seleção dirigida de cepas ocorre, portanto, não apenas por meio de práticas laboratoriais, mas também por um processo evolutivo contínuo de adaptação às condições de processo, resultando em linhagens com maior tolerância a teores alcoólicos elevados, resistência ao tratamento ácido e melhor desempenho fisiológico em meios industriais (BASSO et al., 2008).

Adicionalmente, mudanças tecnológicas e operacionais, como a proibição da queima da cana-de-açúcar antes da colheita, alteraram significativamente as características do mosto e das condições fermentativas, introduzindo novos desafios ambientais ao processo. A ausência da queima deixou maior quantidade de resíduos sólidos e cargas microbianas no caldo de cana, modificando o ambiente seletivo que as leveduras enfrentam durante a fermentação (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que a diversidade genética e fisiológica de *S. cerevisiae* em ambientes industriais é ampla, refletindo processos adaptativos contínuos (CARVALHO NETO et al., 2013; BASSO et al., 2008). Essa variabilidade resulta em diferenças significativas no desempenho fermentativo, na taxa de crescimento, na tolerância ao etanol e na resistência a diferentes tipos de estresse, fatores diretamente relacionados à eficiência global do processo produtivo. Assim, o perfil fisiológico das leveduras industriais é considerado um dos principais determinantes da estabilidade e do rendimento da fermentação alcoólica (STEWART, 2016; QIU et al., 2019). Essas mudanças reforçam a necessidade de identificar ou selecionar linhagens de *S. cerevisiae* que sejam especialmente adaptadas às condições contemporâneas de processo, tanto em termos de eficiência fermentativa quanto de tolerância a estresses combinados (BASSO et al., 2008; STEWART, 2016).

Diante desse cenário, a identificação, caracterização e seleção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* com elevado desempenho fermentativo e maior tolerância ao estresse ácido tornam-se estratégias fundamentais para a otimização dos processos de produção de etanol. Abordagens que integram análises genotípicas e fenotípicas, como a identificação molecular por regiões ITS,

genotipagem e avaliação de parâmetros fisiológicos, têm se mostrado particularmente eficazes para a triagem de linhagens promissoras, permitindo correlacionar perfis genéticos com características adaptativas relevantes (FRANCO-DUARTE et al., 2019; CARVALHO NETO et al., 2013; STEWART, 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar linhagens de leveduras promissoras por meio da avaliação da prevalência, diversidade genética e desempenho fisiológico de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas ao longo de diferentes safras da Usina São Luís, localizada no município de Ourinhos (SP). As análises foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada da Universidade Federal de São Carlos (LBGA - UFSCar), Campus São Carlos, envolvendo a identificação molecular por meio do gene ITS, genotipagem, caracterização dos perfis de crescimento em diferentes meios e avaliação da viabilidade celular após tratamento ácido, permitindo a identificação de linhagens com potencial aplicação em processos industriais de produção de etanol.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produção de Etanol: Obtenção e Processos

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol, destacando-se pela produção a partir da cana-de-açúcar, uma matéria-prima renovável com elevada eficiência energética (GOLDEMBERG, 2008). A consolidação da indústria sucroalcooleira brasileira ocorreu principalmente após a implementação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que promoveu avanços tecnológicos significativos nos processos industriais de fermentação (BNDES; CGEE, 2008).

A produção industrial de etanol envolve as etapas de moagem da cana-de-açúcar, extração do caldo, tratamento do mosto, fermentação alcoólica, destilação e, quando necessário, desidratação do etanol. O caldo de cana, rico em sacarose, é tratado para remoção de impurezas e ajustado quanto ao pH e à concentração de açúcares fermentescíveis antes de ser encaminhado à fermentação (LIMA et al., 2001).

No Brasil, a fermentação alcoólica é realizada predominantemente pelo processo de batelada alimentada com reciclo de células, conhecido como processo Melle-Boinot, no qual a levedura é recuperada por centrifugação e reutilizada em ciclos sucessivos (AMORIM H. V. et al., 2011). Esse sistema permite alta produtividade, menor custo operacional e maior controle microbiológico do processo.

Durante a fermentação industrial, as leveduras são submetidas a condições severas de estresse, como elevadas concentrações de etanol, pH ácido, altas temperaturas e presença de contaminantes bacterianos, o que exige microrganismos altamente adaptados para manter a eficiência do processo (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

### 2.2. *Saccharomyces Cerevisiae* na Produção de Etanol

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um dos microrganismos eucarióticos mais investigados pela ciência moderna. Sua importância histórica e científica é evidenciada pelo fato de ter sido o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, o que consolidou seu uso como organismo modelo para estudos em genética, fisiologia, metabolismo e biologia celular (BOTSTEIN; CHERVITZ; CHERRY, 1997).

Além da importância como modelo experimental, *S. cerevisiae* apresenta características fisiológicas que a tornam altamente adequada para processos industriais, especialmente na produção de etanol. Essa levedura demonstra elevada capacidade fermentativa, crescimento rápido, eficiência na conversão de açúcares em etanol e notável tolerância a condições adversas, como altas concentrações alcoólicas, variações de pH e estresses osmóticos e térmicos (PARAPOULI et al., 2020).

No contexto da indústria sucroenergética brasileira, *S. cerevisiae* é amplamente utilizada devido à sua robustez e adaptabilidade ao ambiente industrial, no qual é submetida a sucessivos ciclos fermentativos com reciclo celular. Ao longo desses ciclos, observa-se frequentemente a substituição das cepas comerciais inicialmente inoculadas por cepas residentes mais bem adaptadas, capazes de manter elevado desempenho fermentativo mesmo sob condições de estresse prolongado (BASSO et al., 2008; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

### **2.3. Fermentação Alcoólica e Metabolismo de *S. Cerevisiae***

A fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae* é um processo metabólico central para a conversão de açúcares fermentescíveis em etanol e dióxido de carbono, com concomitante geração de energia metabólica. Esse processo tem como base a glicólise, via metabólica universal responsável pela degradação da glicose em piruvato, com produção líquida de ATP e NADH (NELSON; COX, 2019).

Na glicólise a glicose é fosforilada e progressivamente convertida em intermediários de três carbonos, culminando na formação de piruvato. Em condições anaeróbias — ou em ambientes com elevada concentração de glicose — o piruvato é descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, sendo posteriormente reduzido a etanol pela álcool desidrogenase, regenerando  $\text{NAD}^+$  e permitindo a continuidade da via glicolítica (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Mesmo na presença de oxigênio, *S. cerevisiae* pode manter o metabolismo fermentativo quando exposta a altas concentrações de glicose, fenômeno conhecido como efeito Crabtree, amplamente explorado nos processos industriais de produção de etanol. Essa característica metabólica contribui para a elevada produtividade

alcoólica observada nos sistemas fermentativos industriais, como os empregados nas usinas brasileiras (DE DEKEN, 1966; NELSON; COX, 2019).

O acúmulo progressivo de etanol, aliado à limitação de nutrientes e às variações de pH e temperatura, impõe estresses significativos às células, afetando sua viabilidade e vitalidade. A capacidade de manter a atividade glicolítica e a integridade celular sob essas condições varia entre diferentes cepas, reforçando a importância da seleção de leveduras robustas e bem adaptadas ao processo industrial (STANLEY et al., 2010).

#### **2.4. Seleção e Caracterização de Leveduras**

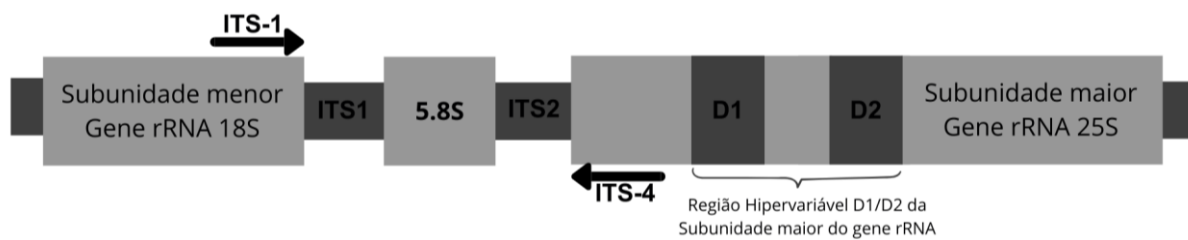
Historicamente, a seleção e caracterização de leveduras utilizadas em processos fermentativos baseiam-se predominantemente em critérios fenotípicos e fisiológicos, como taxa fermentativa, produção de etanol, tolerância a estresses e viabilidade celular. No entanto, o avanço das ferramentas moleculares promoveu uma transição significativa na forma como as leveduras industriais são identificadas, diferenciadas e monitoradas ao longo dos processos fermentativos (FRANCO-DUARTE et al., 2019).

Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido utilizados para o monitoramento populacional de *S. cerevisiae* durante a fermentação de bioetanol. Carvalho-Netto et al. (2013) demonstraram a eficácia do uso de um conjunto de marcadores moleculares específicos para acompanhar a dinâmica das populações de leveduras ao longo dos ciclos fermentativos, permitindo avaliar a persistência e substituição de cepas no ambiente industrial.

Atualmente, a técnica mais amplamente utilizada para a identificação de leveduras baseia-se na análise da sequência do gene do RNA ribossômico nuclear, que compreende os genes 18S, 5.8S e 25S. Dentre essas regiões, o espaçador interno transcrito (ITS – Internal Transcribed Spacer), que inclui os segmentos ITS1, ITS2 e o gene 5.8S (Figura 1), é considerado altamente discriminatório para a identificação de espécies do reino Fungi (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999).

Na metodologia clássica descrita por Esteve-Zarzoso et al. (1999), os oligonucleotídeos iniciadores ITS-1 e ITS-4, que flanqueiam as regiões polimórficas ITS1 e ITS2, são utilizados para amplificação por PCR, possibilitando a diferenciação de espécies de leveduras com elevada confiabilidade. Essa abordagem tem sido

amplamente aplicada em estudos de caracterização de leveduras industriais e ambientais (FONSECA, 2019; PRADO, 2020; ANDRION, A., 2020; FRANCO-DUARTE et al., 2019). A incorporação dessas técnicas moleculares à seleção e caracterização de leveduras industriais contribuiu significativamente para a compreensão da diversidade genética, adaptação e estabilidade das cepas utilizadas na produção de etanol, fortalecendo estratégias de controle e otimização dos processos fermentativos (FRANCO-DUARTE et al., 2019).



**Figura 1 – Exemplificação da estrutura do gene do RNA ribossômico e suas subunidades com regiões espaçadoras**

Diagrama do complexo gênico ribossômico (sem escala). A estrutura contempla a sequência codificadora para a subunidade menor do rRNA (18S), a região espaçadora interna 1 (ITS1), a região codificadora para a subunidade 5.8S, a região espaçadora interna 2 (ITS2) e a sequência codificadora para a subunidade ribossômica maior (25S). As setas indicam as regiões aproximadas de ancoragem dos primers ITS-1 e ITS-4, utilizados para a amplificação da região ITS. **Fonte:** Adaptado de Arbefeville et al. (2017).

Considerando esse contexto o objetivo deste trabalho é fazer uma análise integrada de técnicas moleculares e testes fisiológicos para identificação e caracterização de linhagens de leveduras provenientes da Usina São Luiz (Ourinhos - SP), mantidas no Banco de Leveduras do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada da UFSCar (LBGA), para selecionar as mais promissoras para melhorias na produção de bioetanol.

## OBJETIVOS

### 2.5. Objetivo Geral

Selecionar e caracterizar genotipicamente e fisiologicamente linhagens promissoras de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes da Usina São Luís com potencial para aumento da eficiência na produção de etanol.

### 2.6. Objetivos Específicos

- ✓ Confirmar a identificação taxonômica das linhagens de leveduras por meio da amplificação da região ITS do rDNA.
- ✓ Discriminar geneticamente as linhagens por meio de genotipagem molecular utilizando um conjunto de primers específicos para diferenciação intraespécie.
- ✓ Caracterizar o desempenho fisiológico das linhagens por meio de ensaios de perfil de crescimento em diferentes condições de cultivo, representativas do ambiente industrial.
- ✓ Avaliar a tolerância ao estresse ácido, por meio da aplicação de diluições seriadas e tratamento ácido, com posterior análise de viabilidade celular.
- ✓ Comparar o desempenho fisiológico e a tolerância ao estresse das linhagens isoladas com linhagens industriais de referência (ex.: CAT-1), visando identificar candidatos superiores ou complementares para aplicação industrial.

### 3. METODOLOGIA

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA) do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

#### 3.1. Seleção e Identificação de Linhagens Prevalentes

Foram analisados os laudos técnicos elaborados pelo Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA) entre os anos de 2016 e 2023, referentes às amostras provenientes da Usina São Luís (USL). O Banco de Leveduras mantido pelo LBGA possui aproximadamente 600 isolados de leveduras obtidos em diferentes períodos de fermentação.

Devido às limitações experimentais e ao elevado número de amostras, estabeleceu-se como critério de seleção a inclusão apenas das linhagens que apresentaram pelo menos cinco aparições nos laudos do LBGA dentro desse intervalo temporal. Esse critério permitiu a priorização de linhagens recorrentes e potencialmente relevantes nos processos fermentativos da usina.

Após a pré-seleção, realizou-se a organização dessas leveduras, retirando-as de suas antigas caixas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e realizando-se o novo armazenamento das mesmas na caixa nomeada como Amostras para Análise. As amostras foram nomeadas assumindo o padrão "USL Ano do Laudo - Número da Amostra", tomando como exemplo a amostra do ano 2019 é nomeada como USL 2019-09.

Em sequência inoculou-se 200uL das amostras para análise em 5mL de YPD 2% líquido overnight (16h a 18h) a  $30^{\circ}\text{C}$ . A partir do mesmo inóculo foram realizados plaqueamentos por estriamento em placas de petri com YPD 2% sólido (ágar 2%) e colocadas em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  deixando crescer overnight. No dia seguinte foram inoculadas colônias isoladas de cada levedura em 5mL de YPD 2% líquido deixando crescer overnight (16h a 18h) a  $30^{\circ}\text{C}$ . A partir deste crescimento, no dia seguinte foi realizado o armazenamento das amostras em tubo eppendorf 2mL com 1000uL de glicerol 60% + 1000uL de inóculo, esse estoque foi feito em duplicata, armazenando-as no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e nomeando o novo banco de leveduras como "Banco de Leveduras - Amostras Seleccionadas".

Também desse mesmo inóculo foram separadas alíquotas de 1mL para realizar a extração do DNA e fazer as análises moleculares. As formulações completas dos meios de cultivo utilizados nos experimentos, bem como suas respectivas concentrações, estão apresentadas no **Apêndice A**.

### **3.2. Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada pela técnica do Fenol-Clorofórmio. Resumidamente, as alíquotas de 1mL são centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos em seguida descarta-se sobrenadante, tendo seu precipitado ressuspensionado em 500 µL de tampão Tris-HCl-SDS (200 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA e 0,5% SDS) (MALVAZI E GOLDMAN, 2012). Aproximadamente 300 mg de pérolas (mais ou menos 5 pérolas) de vidro são adicionadas a esta solução, seguindo de agitação vigorosa em vórtex por 10 minutos. Transfere-se 200 µL desta solução para novos tubos cônicos de eppendorf 1,5 mL, em sequência procede-se à adição (1:1) de 100 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio agitando vigorosamente por 5 minutos. Centrifuga-se a 12.000 rpm por aproximadamente 10 minutos a 4°C e transfere-se 150µL da fase superior (aquosa) para um novo microtubo, no qual o DNA será precipitado mediante adição de 300 µL de isopropanol e homogeneização. Procede-se ao repouso a -80°C por aproximadamente 10 minutos a 1 hora. Sequencialmente, centrifuga-se a 14.000 rpm por 10 minutos, descartou-se sobrenadante e, em seguida, o precipitado é lavado com 300 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto, novamente descartou-se sobrenadante. O etanol residual deverá ser evaporado deixando o tubo repousar entreaberto na bancada. Finalmente, adiciona-se 80 µL de água deionizada e procede-se à sua homogeneização. Estoca-se as amostras a -20°C até o momento do uso.

### **3.3. Identificação por Internal Transcribed Spacer (ITS)**

A partir dos fragmentos de DNA extraídos pela técnica Fenol-Clorofórmio, foi realizada a reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificação desses fragmentos compreendidos entre a região intergênica (ITS 1 e ITS 2) usando os iniciadores ITS-1 e ITS-4. Essas regiões 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, ótimo para identificar o gênero e a espécie (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida*, *Pichia* etc.),

mas não diferencia linhagens da mesma espécie, pois essa região é altamente conservada em *S. cerevisiae*. (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999). Os iniciadores para esta amplificação estão descritos abaixo:

ITS1-F 5'ACGGTGAGAGATTTCTGTGC3'

ITS4-R 5'AGCTGGCAGTATTCCCACAG3'

As reações foram compostas de 2 µL de DNA genômico, 2 µL de cada primer (iniciador), 10 µL do mastermix (dNPTs, enzima Taq Polimerase e tampão) e 4 µL de água deionizada. As reações de amplificação foram conduzidas em um BioRad T100 Termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55,5 °C por 2 min e extensão a 72 °C por 2 min e 72 °C por 10 min para finalizar a extensão (ŠURANSKÁ; VRÁNOVÁ; OMELKOVÁ, 2016).

Para visualização dos produtos da PCR, foi realizado procedimento de eletroforese em gel de agarose 1% por comparação com padrões prévios de amplificação usando o marcador High Range DNA Ladder da Cellco. A CAT 1 foi utilizada como controle positivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.4. Genotipagem

Após as leveduras serem caracterizadas como semelhantes ao gênero *Saccharomyces*, foi realizada a PCR para o teste de genotipagem, utilizando os marcadores moleculares SPA2c, MNN4c, PIR3c, EPL1 e SPAG3 (Tabela 1). Esses genes correspondem a loci polimórficos do genoma de *S. cerevisiae* que apresentam variações de tamanho entre linhagens da mesma espécie. Através dessa técnica, esses iniciadores específicos foram utilizados para amplificação de regiões polimórficas específicas do DNA de *Saccharomyces cerevisiae* com objetivo de diferenciação de linhagens intraespécie (CARVALHO-NETTO ET AL., 2013).

Para preparar a PCR os 5 oligonucleotídios iniciadores foram utilizados (2 µL de cada iniciador, 10 µL de master mix, 4 µL de água deionizada e 1 µL de DNA). As diversas linhagens puderam ser identificadas e comparadas com a levedura comercial CAT 1 e também foram comparadas entre si.

**Tabela 1 – Genes, Iniciadores e Temperatura de Melting (°C)**

Primers	ORF	Genes	Sequências de iniciadores	Temperatura de Melting (°C)
P1	YLL021W	SPA2c	GAAAATGACGATGCAGACGA AGGACTCGCTTTCCCTTACC	55
P2	YKL201C	MNN4c	TAGACCTTTTTGCGCCAACT ATTACCACGATTCCGTCGAA	57
P3	YKL163W	PIR3c	TGTCGCCTCATCTAAAGCAA TGTAATTTGGGATGCAGCAG	55
P4	YFL024C	EPL1	ACGATTCCAAATACGACGAA TTCTGTTTCGCTTCTGAATTG	57
P5	YDR504C	SPAG3	TCGACAACCTTTCAGATTGCTG AATGGAAGCGGCTGTTAGAA	55

Fonte: Adaptado de Carvalho-Netto *et al.* (2013).

A PCR para amplificação das regiões polimórficas consistiu no seguinte ciclo: desnaturação inicial por 5 minutos a 94° C, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 94° C. Adicionalmente, procedeu-se à fase de anelamento por 40 segundos à temperatura de melting específica para cada primer conforme Tabela 1, seguido de 45 segundos a 72° C. 5 minutos a 72° C foi a condição para a extensão final.

Para visualização dos amplicons de PCR, foi realizado procedimento de eletroforese em gel de agarose 1% pela comparação com padrões prévios de amplificação usando o marcador High Range DNA Ladder da Cellco. A CAT 1 foi utilizada como controle positivo em cada um dos primers. Os tamanhos dos amplicons de cada levedura foram especificados no **Apêndice C**.

### 3.5. Perfil das Curvas de Crescimento em Diferentes Meios

De modo semelhante ao que ocorre na produção de cerveja, em que o perfil fisiológico da levedura determina boa parte da qualidade sensorial e organoléptica do produto final (STEWART, 2016), a seleção de linhagens com desempenho superior é fundamental para a otimização de processos biotecnológicos baseados em fermentação alcoólica.

Nesse contexto, a caracterização fisiológica das linhagens torna-se uma etapa essencial para identificar aquelas com maior potencial fermentativo. Entre os parâmetros avaliados, o crescimento celular em diferentes condições de cultivo é um dos principais indicadores de adaptação e desempenho metabólico.

Assim, foi realizado o acompanhamento do perfil de crescimento das linhagens em três meios distintos: YPD 4% glicose, YPD 2% / 10% sacarose e YPD 4% / 12%

etanol, permitindo avaliar o comportamento das leveduras frente a variações na fonte de carbono e na presença de estresse etanólico.

No dia anterior ao experimento, a linhagem selecionada foi pré-inoculada a partir de colônia isolada em placa de Petri contendo YPD 2% sólido (ágar 2%), transferida para 40 mL do meio YPD 2% líquido e cultivada overnight (aproximadamente 16 horas) a 30°C, sob agitação de 180 rpm em incubadora tipo shaker.

No dia seguinte, a densidade óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) do inóculo foi determinada e utilizada para o preparo das culturas experimentais. O volume total de 120 mL de cada meio de cultivo (YPD 4%, YPD 2% / 10% sacarose e YPD 4% / 12% etanol) foi inoculado de forma a obter uma OD inicial de 0,1.

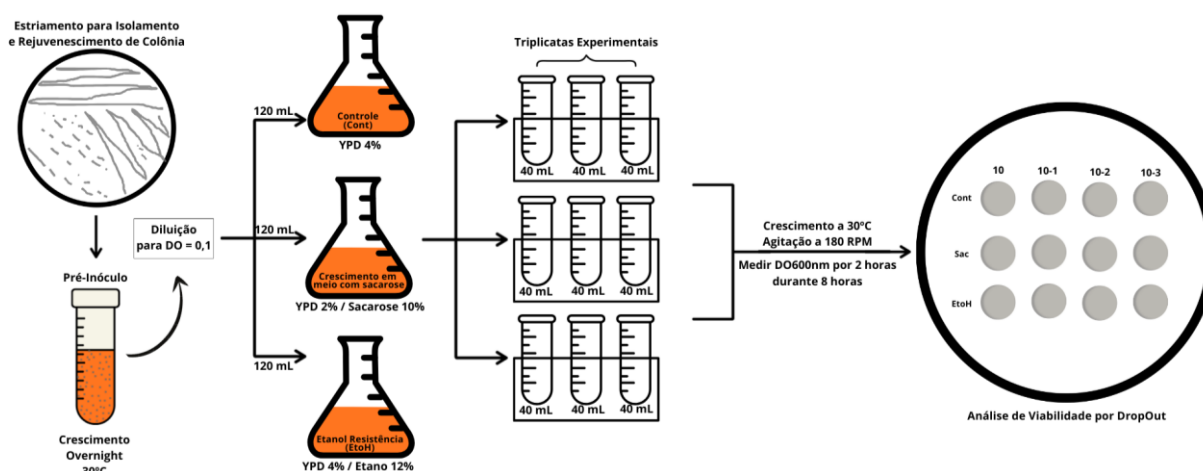
Cada meio foi preparado em erlenmeyer de 250 mL, garantindo que todas as condições iniciais de cultivo fossem idênticas entre as triplicatas. Após a homogeneização, cada erlen foi subdividido em três tubos Falcon® de 50 mL, resultando em nove reatores experimentais independentes (três triplicatas biológicas por meio, cada uma com 40 mL com OD 0,1).

As culturas foram incubadas a 30°C, sob agitação de 180 rpm, em incubadora tipo shaker, por um período de 8 horas, condição que simula o ambiente industrial de fermentação.

No tempo zero, uma amostra de 1 mL foi retirada diretamente do erlen original antes da subdivisão, garantindo a mesma referência inicial para todas as triplicatas. As leituras subsequentes de  $OD_{600}$  foram realizadas a cada 2 horas, utilizando as amostras individuais dos tubos Falcon®. Dessa forma, as curvas de crescimento foram obtidas a partir de leituras de densidade óptica (OD) realizadas nesse intervalo de tempo, todos os dados foram registrados no software excel®.

Ao final do experimento, com o objetivo de avaliar a viabilidade celular, as amostras de cada triplicata foram submetidas a diluições seriadas decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Para isso, foram preparados quatro microtubos de 1,5 mL contendo 900  $\mu$ L de água deionizada estéril, nos quais foram realizadas diluições sequenciais pela transferência de 100  $\mu$ L da amostra entre os tubos consecutivos.

Em seguida, foram realizados plaqueamentos por gotejamento (dropout) de 3  $\mu\text{L}$  de cada diluição sobre placas de Petri contendo meio YPD 2% sólido (ágar 2%). As placas foram incubadas a 30°C por 16 a 18 horas (overnight), e posteriormente foram registradas imagens de cada placa para análise qualitativa do crescimento. A Figura 2 apresenta, de forma resumida, o delineamento experimental do teste de crescimento.



**Figura 2 – Delineamento experimental do perfil de crescimento e ensaio de viabilidade por Dropout das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***

O experimento iniciou-se com o estriamento de cada linhagem em placas de YPD 2%, a partir das quais uma colônia isolada foi transferida para preparo do pré-inóculo, cultivado overnight a 30°C sob agitação de 180 rpm. No dia seguinte, a densidade óptica ( $OD_{600}$ ) foi ajustada para 0,1 em 120 mL de cada meio de cultivo (YPD 4%, YPD 2% / Sacarose 10% e YPD 4% / Etano 12%). Cada cultura foi distribuída em três tubos Falcon® (40 mL cada), correspondendo às triplicatas experimentais. As amostras foram incubadas a 30°C sob agitação (180 rpm), com leituras de  $OD_{600}$  registradas a cada 2 h durante 8 h de crescimento. Ao término do experimento, alíquotas foram submetidas a diluições seriadas e plaqueamento por gotejamento (Dropout) em YPD 2%, incubadas overnight a 30°C, e as imagens das placas foram registradas para análise qualitativa da viabilidade celular. **Fonte:** Elaboração própria.

A partir das leituras de densidade óptica ( $OD_{600}$ ) registradas no software excel®, os valores foram convertidos em número de gerações celulares ( $n$ ), segundo a relação em que  $n = \log_2(OD_t/OD_0)$ , conforme descrito por Madigan et al. (2021) e Shuler & Kargi (2017), em que  $OD_0$  representa a densidade óptica inicial no tempo zero. Essa transformação logarítmica expressa o crescimento celular em termos de duplicações populacionais acumuladas ao longo do tempo, permitindo uma comparação biológica mais direta entre linhagens e condições de cultivo. Cada réplica foi tratada como um

perfil de crescimento celular independente e foram plotados gráficos XY no Prisma para evidenciar o crescimento.

Em seguida, os números de geração foram utilizados para o cálculo da área sob a curva de crescimento (AUC). A AUC foi calculada individualmente para cada réplica no software GraphPad Prism versão 10.6.1, utilizando baseline zero, sendo utilizada como uma medida integrada do desempenho global de crescimento em cada meio testado.

Os valores individuais de AUC obtidos para cada réplica foram utilizados para as análises estatísticas. Inicialmente, foi realizada uma análise de variância de uma via (one-way ANOVA) com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas no crescimento das leveduras entre os diferentes meios de cultivo. Para essa análise, os valores de AUC foram agrupados por meio de cultivo, independentemente da amostra e testes post hoc foram aplicados para comparações múltiplas entre os meios.

Adicionalmente, foi realizada uma análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) para avaliar simultaneamente os efeitos do meio de cultivo e da amostra sobre o crescimento das leveduras, bem como a interação entre esses fatores. Para essa análise, os valores de AUC individuais foram organizados considerando os fatores 'meio de cultivo' e 'amostra', permitindo a identificação de variações no desempenho de crescimento associadas a cada fator isoladamente ou à sua interação.

As comparações entre amostras e meios de cultivo foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, foi adotado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para integrar o desempenho global de crescimento das linhagens testadas nos diferentes meios de cultivo, foi calculado um Índice de Desempenho Total (IDT) a partir dos valores de área sob a curva (AUC). O IDT permitiu comparar o comportamento relativo das linhagens considerando simultaneamente as condições de crescimento em meio YPD 4%, YPD 2% suplementado com 10% de sacarose e YPD 4% contendo 12% de etanol.

Inicialmente, os valores médios de AUC obtidos em cada meio foram padronizados pelo método de Z-score, de modo a eliminar o efeito das diferentes escalas de variação entre as condições. A padronização foi realizada segundo a expressão:  $Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$ , em que X representa o valor médio de AUC da linhagem,  $\mu$  é a média das AUCs de todas as linhagens naquele meio e  $\sigma$  o desvio padrão correspondente (GHASEMI & ZAHEDIASL, 2012).

Posteriormente, foram atribuídos pesos distintos a cada meio de acordo com sua relevância fisiológica para o processo fermentativo: YPD 4% (peso 2), YPD 2%/Sacarose 10% (peso 2) e YPD 4%/Etanol 12% (peso 1). O IDT foi então calculado conforme a equação ponderada:  $IDT = \frac{(2 \cdot Z_{YPD} + 2 \cdot Z_{Sacarose} + 1 \cdot Z_{Etanol})}{5}$ .

Por fim, as linhagens foram classificadas em ordem decrescente de IDT, resultando em um ranking de desempenho global, no qual valores mais altos indicam maior capacidade adaptativa e potencial fermentativo sob as condições avaliadas (QIU ET AL., 2019; CARVALHO NETO ET AL., 2018). Os cálculos foram realizados no software Microsoft Excel® (versão 365), e os resultados foram utilizados para selecionar as linhagens mais promissoras.

### **3.6. Avaliação da Viabilidade Celular após Tratamento Ácido**

#### **3.6.1. Tratamento Ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

O objetivo deste ensaio é avaliar a viabilidade celular de leveduras submetidas a tratamento ácido, baseado em condições industriais, por meio de diluições seriadas e plaqueamento em meio YPD 2% sólido (ágar 2%), permitindo a comparação entre amostras controle e tratadas (AMORIM H. V. et al., 2011).

Todos os procedimentos de preparo experimental, manipulação das amostras, diluições seriadas, plaqueamento e descarte de resíduos foram realizados em fluxo laminar, a fim de garantir assepsia e evitar contaminações. Os resíduos líquidos contendo ácido foram previamente neutralizados com solução de NaOH (2M) antes do descarte, conforme normas de segurança laboratorial (ANVISA/BRASIL, 2010).

As leveduras foram inoculadas em 10 mL de meio YPD 4% e incubadas a 30 °C por 16–18 horas, sob agitação a 180 rpm, visando a obtenção de cultura em fase ativa de crescimento.

Após o crescimento do pré-inóculo, a cultura foi diluída na proporção 1:10 (100 µL de cultura em 900 µL de água estéril) para leitura da densidade óptica (OD) a 600 nm em espectrofotômetro. O branco foi preparado utilizando o mesmo meio empregado no pré-inóculo. O volume de inóculo necessário para ajustar a cultura a DO inicial igual a 1,0 em um volume final de 5 mL foi calculado pela equação  $C1 \times V1 = C2 \times V2$ , garantindo a padronização da densidade celular inicial entre as amostras.

Para cada amostra, foram preparados dois tubos Falcon® de 15 mL, correspondendo às condições de controle e tratamento ácido. Após ajuste do volume para 5 mL com água estéril, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado.

No tubo referente ao tratamento, foi adicionada solução aquosa previamente ajustada para pH 2 com ácido sulfúrico, simulando condições de estresse ácido aplicadas em processos industriais de fermentação alcoólica, como os utilizados na Usina São Luís (Ourinhos, SP). O tubo de controle recebeu apenas água estéril para completar o volume. As amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após o período de exposição ao ácido, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas três vezes com água estéril, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em meio YPD 4% líquido.

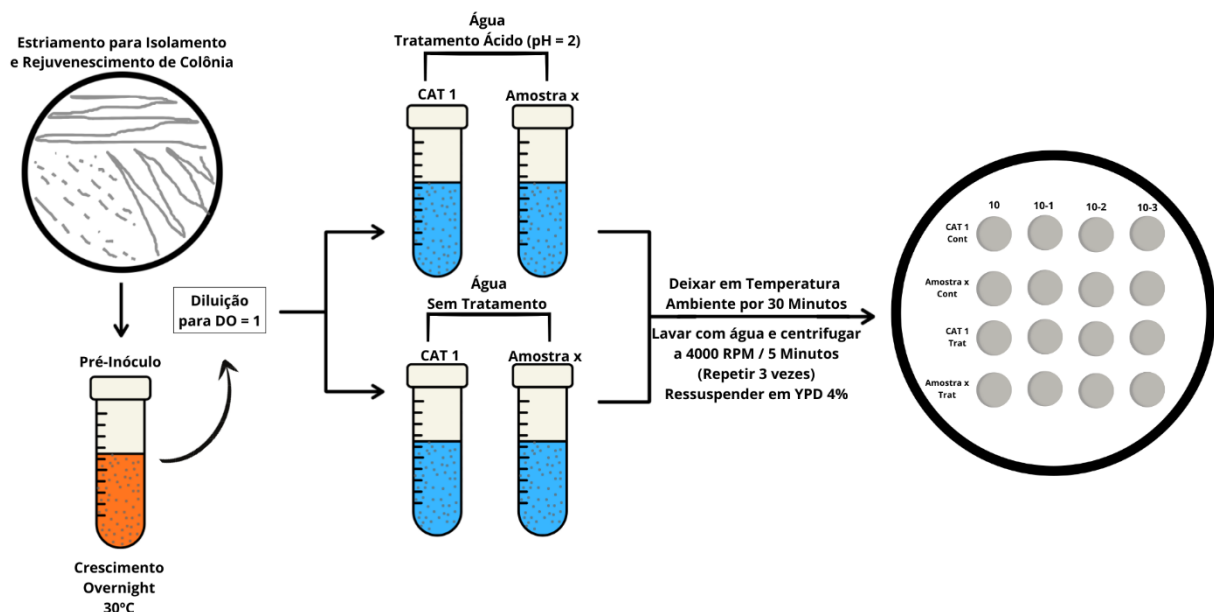
O experimento foi conduzido ao longo de cinco dias, sendo realizados ciclos sucessivos de tratamento ácido e recuperação celular em meio YPD 4% líquido, conforme descrito acima. O plaqueamento para avaliação da viabilidade celular foi realizado apenas no quinto dia experimental.

No quinto dia, após o último ciclo de tratamento, as amostras foram ressuspensas em 5 mL de meio YPD 4% líquido. Diluições seriadas ( $10$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foram preparadas utilizando 900 µL de água estéril em tubos Eppendorf previamente rotulados, adicionando-se 100 µL da cultura em cada etapa.

### 3.6.2. Plaqueamento por Método Spot Assay

O plaqueamento foi realizado pelo método de dropout (spot assay), no qual 3  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram aplicados sobre placas de Petri contendo meio YPD 2% sólido (ágar 2%). O plaqueamento foi iniciado a partir da diluição mais diluída para a mais concentrada, mantendo-se as placas abertas o mínimo de tempo possível dentro do fluxo laminar. As placas de petri foram feitas individualmente para cada amostra, em uma mesma placa foi a amostra teste controle e tratamento, e a CAT 1 controle e tratamento. As placas foram incubadas a 30°C por 16 - 18 horas.

No dia seguinte à incubação, as placas foram analisadas visualmente e registradas fotograficamente. A presença e intensidade do crescimento celular nas diferentes diluições foram utilizadas como indicativo da viabilidade celular das leveduras, permitindo a comparação entre amostras controle e tratadas. A figura 3 apresenta, de forma resumida, o delineamento experimental do teste de tratamento ácido.



**Figura 3 – Delineamento experimental do ensaio de tolerância ao estresse ácido em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***

A partir de colônias isoladas em placas de YPD 2% sólido (2% ágar), foi preparado o pré-inóculo em meio YPD 4%, cultivado overnight a 30°C sob agitação de 180 rpm. No dia seguinte, a densidade óptica ( $\text{OD}_{600}$ ) foi ajustada para 1 em 5 mL de água deionizada estéril em 4 tubos Falcon® 15 mL. As suspensões celulares foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 min, e os pellets divididos em dois grupos experimentais: (i) Tratamento ácido: células ressuspensas em água deionizada estéril ajustada para pH 2, contendo tubos para a linhagem controle (CAT-1) e a linhagem teste; (ii) Controle: células

ressuspendidas em água deionizada estéril em pH neutro. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 min e, em seguida, lavadas três vezes com água deionizada estéril (centrifugação a 4.000 rpm por 5 min). Após o tratamento, as células foram ressuspendidas em YPD 4% e incubadas a 30°C overnight. Esse ciclo de exposição e recuperação foi repetido diariamente por cinco dias consecutivos. Ao final do quinto ciclo, as amostras foram ressuspendidas em YPD 4% e submetidas a diluições seriadas e plaqueamento por gotejamento (Dropout) em YPD 2% sólido (2% ágar), nas seguintes disposições: CAT-1 controle, amostra controle, CAT-1 tratamento ácido e amostra tratamento ácido. As mesmas amostras foram utilizadas para contagem celular em câmara de Neubauer. **Fonte:** Elaboração própria.

O tratamento ácido foi baseado em protocolos empregados na indústria sucroalcooleira brasileira, utilizados para o controle microbiológico e seleção de leveduras mais tolerantes ao estresse ácido durante a fermentação alcoólica (AMORIM H. V. et al., 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). O método de plaqueamento por dropout foi adotado por sua ampla utilização em microbiologia e biologia molecular como técnica semi-quantitativa para avaliação de viabilidade celular (GUTHRIE; FINK, 2002).

### 3.6.3. Contagem em Câmara de Neubauer

A contagem celular e a determinação da viabilidade foram realizadas no quinto dia experimental, imediatamente após a finalização do ciclo de tratamento ácido, utilizando as mesmas suspensões celulares empregadas na etapa de plaqueamento. Dessa forma, ambas as análises refletem o mesmo estado fisiológico das células no momento da avaliação.

Alíquotas das amostras foram retiradas e diluídas em solução de Tween 80 a 0,01%, com o objetivo de reduzir a formação de aglomerados celulares e facilitar a contagem em Câmara de Neubauer. As diluições realizadas variaram de acordo com a densidade celular de cada amostra e foram devidamente registradas.

Após a etapa de desagregação celular, as amostras foram diluídas duas vezes na proporção 1:1 em tampão contendo Azul de Metileno a 0,01%, utilizado como corante vital para diferenciação entre células viáveis e não viáveis, SMART et al. (1999) demonstraram o uso do violeta de metileno para determinar a viabilidade.

A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer, após correta montagem da lamínula, com aplicação de 10 µL da amostra em cada campo da câmara. A contagem

foi efetuada em cinco quadrados centrais, considerando-se células viáveis aquelas não coradas (translúcidas) e células não viáveis aquelas coradas em azul.

A partir dos valores obtidos, foram calculadas a concentração celular (células/mL) e a viabilidade celular (fração). A análise foi realizada para as amostras controle e tratadas, permitindo a comparação do efeito do tratamento ácido sobre a concentração e viabilidade das leveduras.

A análise dos dados de viabilidade e concentração foi realizada por meio do cálculo do Índice de Tolerância ao Tratamento Ácido (ITA), definido como a razão entre as viabilidades (tratamento/controle) multiplicada pela razão entre as concentrações celulares (tratamento/controle). Essa abordagem de índices relativos de tolerância baseia-se em comparações diretas entre condições estressantes e controles, metodologia comum em estudos de resposta ao estresse ambiental em leveduras e outras células, onde a viabilidade é utilizada como principal indicador de tolerância ao estresse (BAYROCK; INGLEDEW, 2007; QIU *et al.*, 2019)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção e Identificação de Linhagens Prevalentes

Inicialmente, foram selecionadas 19 linhagens do Banco de Leveduras do LBGA (Tabela 2), previamente triadas como *S. cerevisiae* por análises moleculares. Posteriormente, foi incluída a linhagem 2023-06, isolada dos processos fermentativos mais recentes da Usina São Luís, por sua prevalência observada nos laudos a partir de 2023. As amostras são nomeadas conforme o ano que foram identificadas e pela ordem de identificação naquele ano na usina (Usina São Luís ou USL nº), tomando a amostra 1 como exemplo, o ano de identificação foi 2016 e a primeira identificada 01, a nomeação fica 2016-01 e a sétima seria 2016-07.

**Tabela 2 – Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas do Banco de Leveduras do LBGA e utilizadas neste estudo**

Número	Ano	USL nº	(Laudos.Amostragem)	Outros anos	Frequência
1	2016	01	1.2/1.8/2.3		09
2	2016	07	3.7/3.9/4.4		88
3	2017	01	3.1/3.2/3.6		08
4	2017	02	3.3/3.4/3.9		10
5	2017	04	9.4/9.5/9.6		5
6	2017	05	10.2/10.4/10.5		6
7	2018	01	3.1/3.6/8.1		21
8	2018	02	3.4/3.5/3.8		15
9	2018	08	6.1/7.9/7.10		5
10	2018	12	6.10	2021: 2.1/2.2	71
11	2019	09	10.2/10.3/10.4		6
12	2020	05	7.4/7.7	2021: 9.2	7
13	2021	08	6.1/7.1/7.2		6
14	2022	04	1.4/1.5/1.6		6
15	2022	13	4.3/4.5/4.7		6
16	2022	15	6.1/6.2/6.4		18
17	2023	01	1.1/1.3/1.7		5
18	2023	02	3.1/3.2/3.5		13
19	2023	03	3.3/3.8/3.9		6
20	2023	06	-	-	-

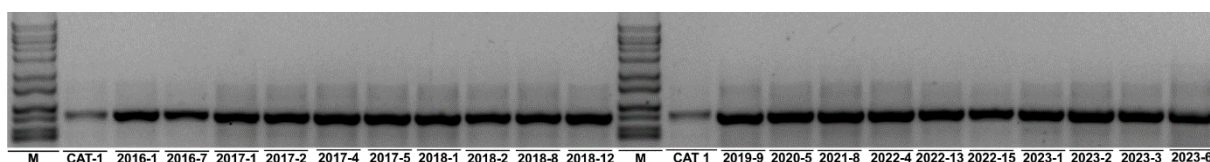
Relação das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas a partir dos laudos do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA), de acordo com a frequência de aparição nos relatórios da Usina São Luís (USL). A linhagem CAT-1 foi adotada como controle positivo por sua ampla utilização industrial e representatividade nos processos fermentativos da usina. **Fonte:** Elaboração própria com base nos registros do LBGA (2016–2023).

Todas as etapas experimentais deste trabalho foram conduzidas utilizando as linhagens apresentadas na Tabela 2. Como controle positivo, foi adotada a linhagem

CAT-1, amplamente empregada industrialmente e utilizada como cepa de referência nos processos fermentativos da Usina São Luís (Ourinhos – SP).

#### 4.2. Extração de DNA e Identificação por Internal Transcribed Spacer (ITS)

A amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi realizada utilizando os primers universais ITS1 e ITS4, com o objetivo de confirmar o gênero e a espécie das leveduras isoladas. A análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, revelou a presença de bandas únicas e definidas em todas as amostras analisadas (Figura 4).



**Figura 4 – Perfil de amplificação da região ITS (primers ITS1 e ITS4) de isolados de *Saccharomyces cerevisiae***

Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M – marcador de peso molecular (High Range DNA Ladder, Cellco); 2016-1, 2016-7, 2017-1, 2017-2, 2017-4, 2017-5, 2018-1, 2018-2, 2018-8, 2018-12, 2019-9, 2020-5, 2021-8, 2022-4, 2022-13, 2022-15, 2023-1, 2023-2, 2023-6 – amostras de leveduras analisadas; CAT 1 – controle positivo (*S. cerevisiae* industrial). **Fonte:** Elaboração própria.

O padrão de amplificação observado para as 20 amostras foi idêntico ao obtido para a linhagem CAT 1, utilizada como controle positivo, confirmando que todas potencialmente pertencem à mesma espécie. Não foram observadas diferenças de tamanho ou intensidade entre as bandas, o que indica ausência de variação interespecies entre os isolados.

A amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) é amplamente utilizada para identificação taxonômica de leveduras, uma vez que essa região do DNA ribossomal contém sequências conservadas flanqueadas por trechos variáveis capazes de diferenciar espécies próximas (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; PRAMATEFTAKI; LANARIDIS; TYPAS, 2000). No presente estudo, todas as amostras apresentaram um único amplicon de aproximadamente 800 pb, idêntico ao padrão obtido para a linhagem controle positiva *Saccharomyces cerevisiae* (CAT 1). Esse resultado confirma que todas as leveduras isoladas podem pertencer à mesma

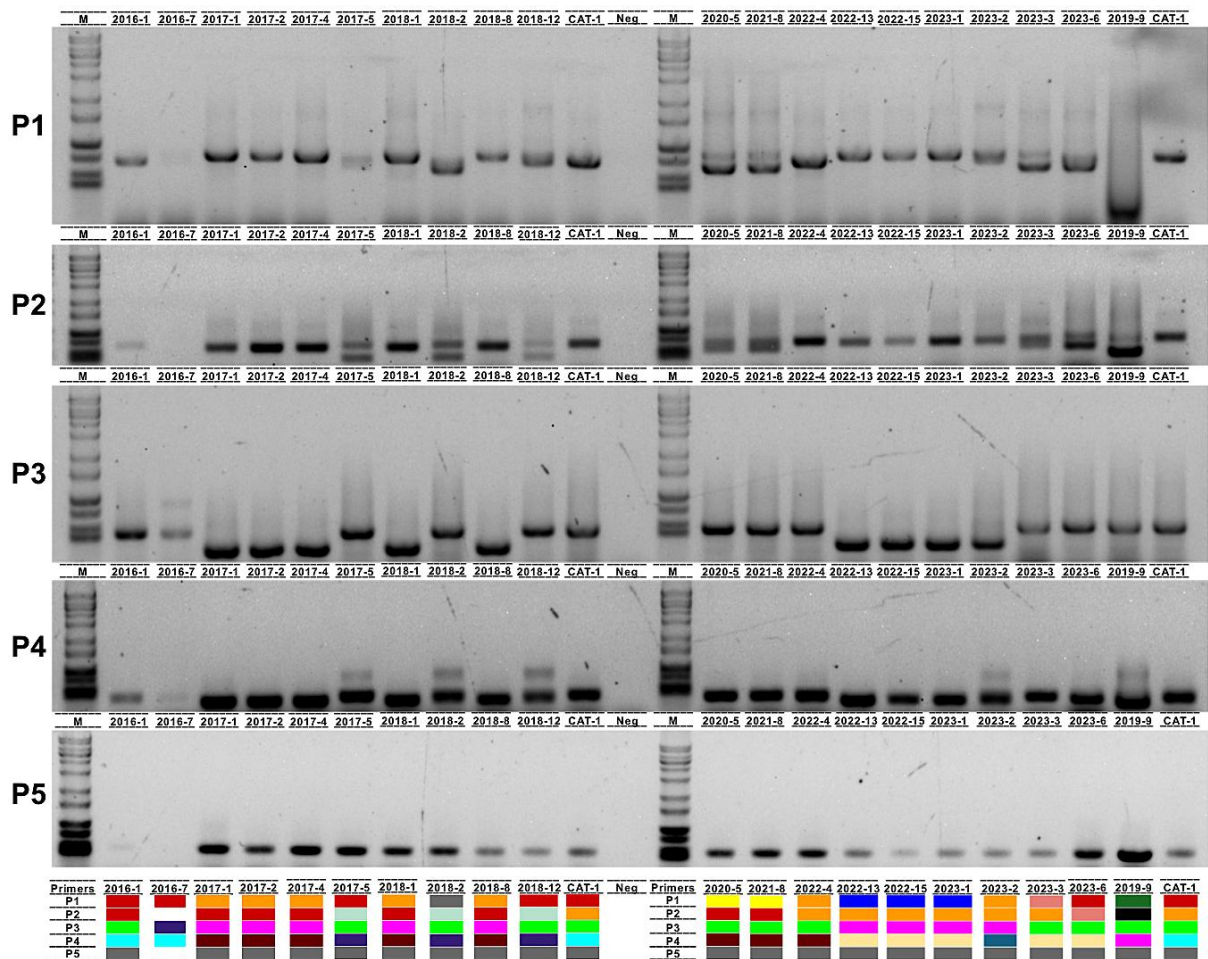
espécie, em concordância com os tamanhos de fragmentos descritos na literatura para *S. cerevisiae* (ŠURANSKÁ; VRÁNOVÁ; OMELKOVÁ, 2016).

A ausência de variação no perfil de bandas entre as amostras é esperada, visto que a região ITS é altamente conservada dentro de uma mesma espécie e, portanto, não permite a distinção entre diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. Essa limitação metodológica é bem documentada, uma vez que o marcador ITS é voltado à identificação interespecies, e não à diferenciação intraespecífica. Assim, para a caracterização genotípica e monitoramento de possíveis variações entre as linhagens isoladas, faz-se necessária a utilização de marcadores polimórficos específicos, como os genes SPA2c, MNN4c, PIR3c, EPL1 e SPAG3, propostos por Carvalho-Netto et al. (2013), que permitem a distinção de cepas industriais de *S. cerevisiae* com base em diferenças estruturais do genoma.

### 4.3. Genotipagem

Com a confirmação das leveduras como *S. cerevisiae* prosseguiu-se para a genotipagem das linhagens por PCR utilizando os marcadores moleculares SPA2c (P1), MNN4c (P2), PIR3c (P3), EPL1 (P4) e SPAG3 (P5), conforme metodologia descrita por Carvalho-Netto et al. (2013). Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo.

A Figura 5 apresenta o conjunto de perfis de amplificação obtidos para os cinco marcadores, dispostos verticalmente (P1 a P5). Cada amostra apresentou um padrão de banda distinto para cada primer, permitindo a diferenciação entre as linhagens analisadas. O tamanho dos amplicons foi estimado com base no marcador de peso molecular High Range DNA Ladder (Cellco), e os valores obtidos, detalhados no **Apêndice C**, foram convertidos em uma matriz de perfis genéticos, posteriormente representada graficamente por uma escala de cores correspondente ao tamanho relativo das bandas.



**Figura 5 – Perfis de amplificação obtidos para os marcadores moleculares SPA2c (P1), MNN4c (P2), PIR3c (P3), EPL1 (P4) e SPAG3 (P5) em isolados de *Saccharomyces cerevisiae***

Os géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo estão dispostos empilhados, correspondendo aos diferentes primers utilizados (P1 ao P5). M – marcador de peso molecular (High Range DNA Ladder, Cellco); CAT 1 – controle positivo; Neg - controle negativo; 2016-1, 2016-7, 2017-1, 2017-2, 2017-4, 2017-5, 2018-1, 2018-2, 2018-8, 2018-12, 2019-9, 2020-5, 2021-8, 2022-4, 2022-13, 2022-15, 2023-1, 2023-2, 2023-6 – amostras de leveduras analisadas. Abaixo dos géis, a representação gráfica em escala de cores indica variação de tamanho relativo dos amplicons para cada marcador. **Fonte:** Elaboração própria.

A partir dessa análise, observou-se que a linhagem CAT 1 apresentou um perfil genotípico único, distinto de todas as demais. Ao todo foram formados quatro grupos de amostras semelhantes de acordo com a genotipagem: Grupo A – 2017-1, 2017-2, 2017-4, 2018-8 e 2018-1; Grupo B – 2017-5 e 2018-12; Grupo C – 2022-13, 2022-15

e 2023-1; e Grupo D – 2020-5 e 2021-8. Todas as demais linhagens exibiram padrões exclusivos de bandas, indicando a presença de variabilidade genética significativa entre os isolados.

A aplicação dos cinco marcadores moleculares propostos por Carvalho-Netto et al. (2013) mostrou-se eficiente para a discriminação intraespecífica de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de processos fermentativos. Diferentemente do marcador ITS, que é altamente conservado dentro da espécie, os loci SPA2c, MNN4c, PIR3c, EPL1 e SPAG3 apresentam polimorfismos estruturais entre linhagens industriais, permitindo a obtenção de perfis de amplificação específicos.

Os resultados obtidos indicam que a CAT 1 possui um genótipo exclusivo, o que reforça sua diferenciação frente às demais amostras e valida seu uso como controle positivo de referência. A formação de grupos de amostras com perfis moleculares idênticos como os descritos, sugere a presença de linhagens geneticamente muito próximas ou possivelmente idênticas, que podem ter origem comum ou representar a mesma cepa reintroduzida em diferentes períodos de fermentação.

A variabilidade observada entre as demais amostras indica a coexistência de diferentes genótipos de *S. cerevisiae* no ambiente fermentativo, fenômeno frequentemente relatado em processos industriais de etanol no Brasil. Essa diversidade pode resultar da adaptação de cepas ao estresse fermentativo, de recontaminações por leveduras selvagens ou ainda da substituição natural de populações dominantes ao longo de ciclos fermentativos sucessivos (CARVALHO-NETTO et al., 2013; BASSO et al., 2008).

Dessa forma, o conjunto de marcadores utilizados demonstrou-se adequado para monitorar a dinâmica populacional de *S. cerevisiae* em sistemas industriais, sendo eficiente para diferenciação e rastreamento genético das linhagens de leveduras.

#### **4.4. Perfil das Curvas De Crescimento em Diferentes Meios**

Apesar da identificação usando ITS e boa caracterização genotípica, a caracterização molecular isolada não é suficiente para definir o potencial biotecnológico das leveduras, uma vez que diferenças genéticas nem sempre se traduzem em diferenças fenotípicas de desempenho fermentativo (FRANCO-

DUARTE et al., 2019). Assim, foram conduzidos ensaios fisiológicos de crescimento em diferentes meios para avaliar a capacidade adaptativa das linhagens frente a distintas fontes de carbono e condições de estresse.

As leituras de densidade óptica (OD<sub>600</sub>) medidas ao longo de 8 horas foram registradas em tabela, para mais detalhes as medidas originais de OD estão apresentadas no **Apêndice B**. Depois foram transformadas em número de gerações celulares (n) segundo a relação  $n = \log_2(OD_t/OD_0)$ . Essa transformação permitiu expressar o crescimento microbiano em unidades biológicas comparáveis, indicando o número de vezes que a população celular duplicou em cada intervalo de tempo. A partir desses valores, foi calculada a área sob a curva de crescimento (AUC, n.h), que integra o desempenho total de crescimento de cada linhagem ao longo do tempo, considerando simultaneamente a taxa e a extensão do crescimento. Com esses valores foi construída a Tabela 3 dos valores da área sob a curva de crescimento (AUC, n.h). Também são apresentados os valores calculados das médias e desvios padrão, que foram usados para calcular o Z-score e o IDT.

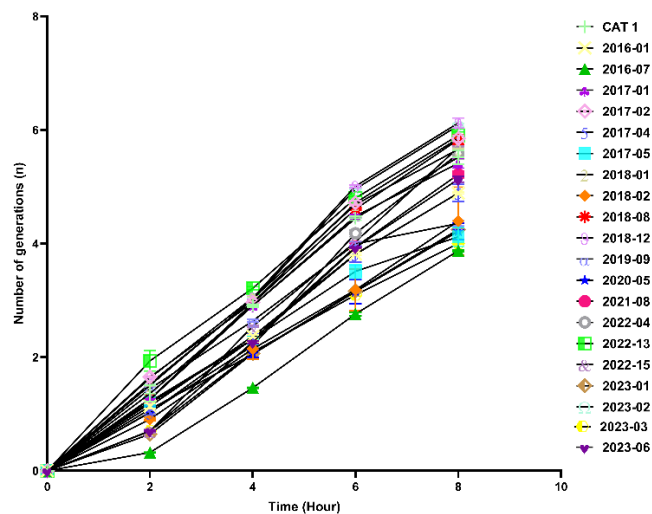
**Tabela 3 – Valores de área sob a curva de crescimento (AUC, n.h), médias, desvios padrão, escores padronizados (Z-score) e Índice de Desempenho Total (IDT) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* nos diferentes meios de cultivo**

Amostras	YPD 4%			Média YPD	YPD 2% / Sacrose 10%			Média Sacrose	YPD 4% / Ethanol 12%			Média Ethanol	Z-score			IDT	
	I	II	III		I	II	III		I	II	III		YPD 4%	Sucrose 10%	Ethanol 12%		
CAT-1	22,56	23,24	23,05	23,05	26,26	25,5	26,08	26,08	1,875	1,895	1,479	1,875	0,7260	1,1813	-0,3052	0,7019	
2016-01	19,38	19,58	19,65	19,58	18,66	18,58	19,56	18,66	1,399	1,121	1,227	1,227	-0,2467	-0,7037	-0,9778	-0,5757	
2016-07	12,91	12,91	13,08	12,91	11,97	12,32	12,41	12,32	1,005	0,996	0,877	0,996	-2,1163	-2,3144	-1,2176	-2,0158	
2017-01	22,75	22,53	22,85	22,75	23,42	23,36	23,35	23,36	3,677	3,575	3,695	3,677	0,6419	0,4903	1,5654	0,7660	
2017-02	24,34	24,5	24,71	24,5	24,07	24,29	24,35	24,29	2,45	2,4	2,506	2,45	1,1324	0,7266	0,2917	0,8019	
2017-04	18,46	19,47	19,69	19,47	20,09	19,58	19,46	19,58	1,927	1,811	1,793	1,811	-0,2775	-0,4700	-0,3716	-0,3733	
2017-05	18,52	17,54	18,59	18,52	21,18	21,37	21,26	21,26	2,015	2,099	2,137	2,099	-0,5438	-0,0432	-0,0727	-0,2493	
2018-01	24,2	24,06	24,07	24,07	25,17	25,15	26,01	25,17	1,909	2,267	2,122	2,122	1,0119	0,9501	-0,0488	0,7750	
2018-02	17,32	14,98	18,33	17,32	14,86	15,29	15,62	15,29	2,03	0,7001	0,4686	0,7001	-0,8801	-1,5598	-1,5248	-1,2810	
2018-08	23,49	23,51	23,47	23,49	25,05	25,45	25,03	25,05	3,374	3,423	3,533	3,423	0,8493	0,9196	1,3017	0,9679	
2018-12	25,61	25,31	25,58	25,58	26,89	26,86	26,95	26,89	2,583	2,432	2,194	2,432	1,4351	1,3871	0,2730	1,1835	
2019-09	20,36	20,49	20,68	20,49	20,81	21,03	21,46	21,03	4,118	3,773	3,758	3,773	0,0084	-0,1016	1,6650	0,2957	
2020-05	17,44	16,68	16,27	16,68	17,18	17,44	17,3	17,3	1,768	1,612	2,6	1,768	-1,0595	-1,0492	-0,4163	-0,9267	
2021-08	19,82	20,15	20,3	20,15	21,43	20,77	21,26	21,26	1,828	1,611	1,529	1,611	-0,0869	-0,0432	-0,5792	-0,1679	
2022-04	20,21	20,37	20,63	20,37	21,79	21,34	21,59	21,59	3,593	3,772	3,759	3,759	-0,0252	0,0406	1,6505	0,3363	
2022-13	25,47	26,01	25,93	25,93	26,25	26,35	26,47	26,35	1,296	1,782	0,664	1,296	1,5332	1,2499	-0,9062	0,9320	
2022-15	20,16	20,23	20,32	20,23	21,59	21,63	21,67	21,63	2,966	2,075	2,186	2,186	-0,0645	0,0508	0,0176	-0,0019	
2023-01	16,06	15,9	16,02	16,02	17,07	17,43	17,31	17,31	1,266	1,227	1,21	1,227	-1,2445	-1,0467	-0,9778	-1,1120	
2023-02	24,96	25,13	25,19	25,13	26,71	26,45	26,62	26,62	1,89	1,807	1,784	1,807	1,3090	1,3185	-0,3758	0,9758	
2023-03	15,82	15,83	15,66	15,82	18,85	18,8	19,06	18,85	1,579	1,031	0,893	1,031	-1,3006	-0,6554	-1,1813	-1,0187	
2023-06	19,06	18,92	18,82	18,92	19,5	19,56	19,77	19,56	3,596	3,19	3,51	3,51	-0,4317	-0,4751	1,3920	-0,0843	
Médias Gerais	20,46				21,43				2,169								
Desvio padrão	3,567616768				3,936288457				0,9633487675								

Valores de área sob a curva de crescimento (AUC, n.h) obtidos a partir das curvas em número de gerações celulares (n) das triplicatas experimentais. Para cada meio de cultivo (YPD 4%, YPD 2% / Sacarose 10% e YPD 4% / Etanol 12%) foram calculadas as médias, os desvios padrão e os escores

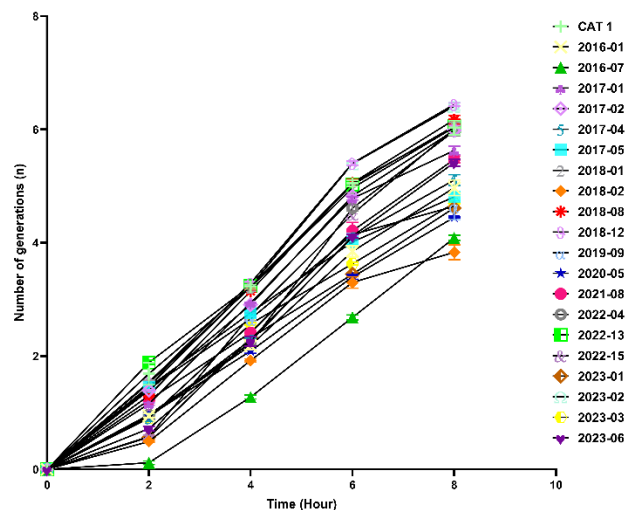
padronizados (Z-score). O Índice de Desempenho Total (IDT) foi determinado a partir da média ponderada dos Z-scores de cada meio, representando o desempenho global de crescimento de cada linhagem. **Fonte:** Elaboração própria.

As figuras 6, 7 e 8 mostram a variação do crescimento (em número de gerações) nas diferentes condições: YPD 4% (controle rico em glicose), YPD 2% / Sacarose 10% (simulando um substrato industrial) e YPD 4% / Etanol 12% (condição de estresse etanólico).



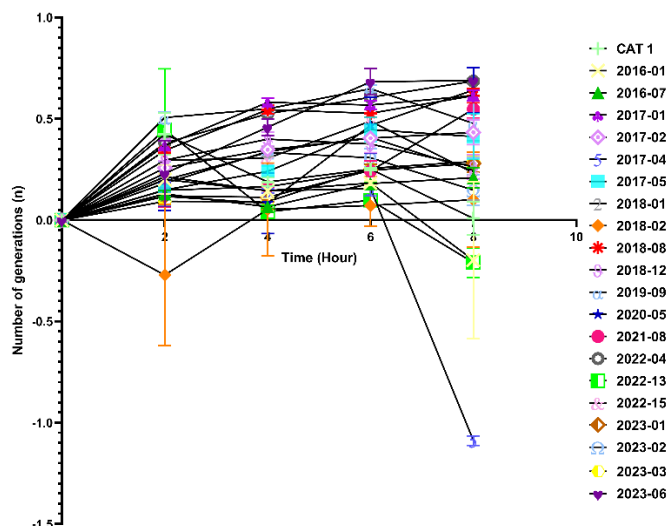
**Figura 6 – Perfil de crescimento das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPD 4% expressa em número de gerações celulares (n).**

**Fonte:** Elaboração própria.



**Figura 7 – Perfil de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* em meio YPD 2% / Sacarose 10% expressa em número de gerações celulares (n).**

**Fonte:** Elaboração própria.



**Figura 8 – Perfil de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* em meio YPD 4% / Etanol 12% expressa em número de gerações celulares (n).**

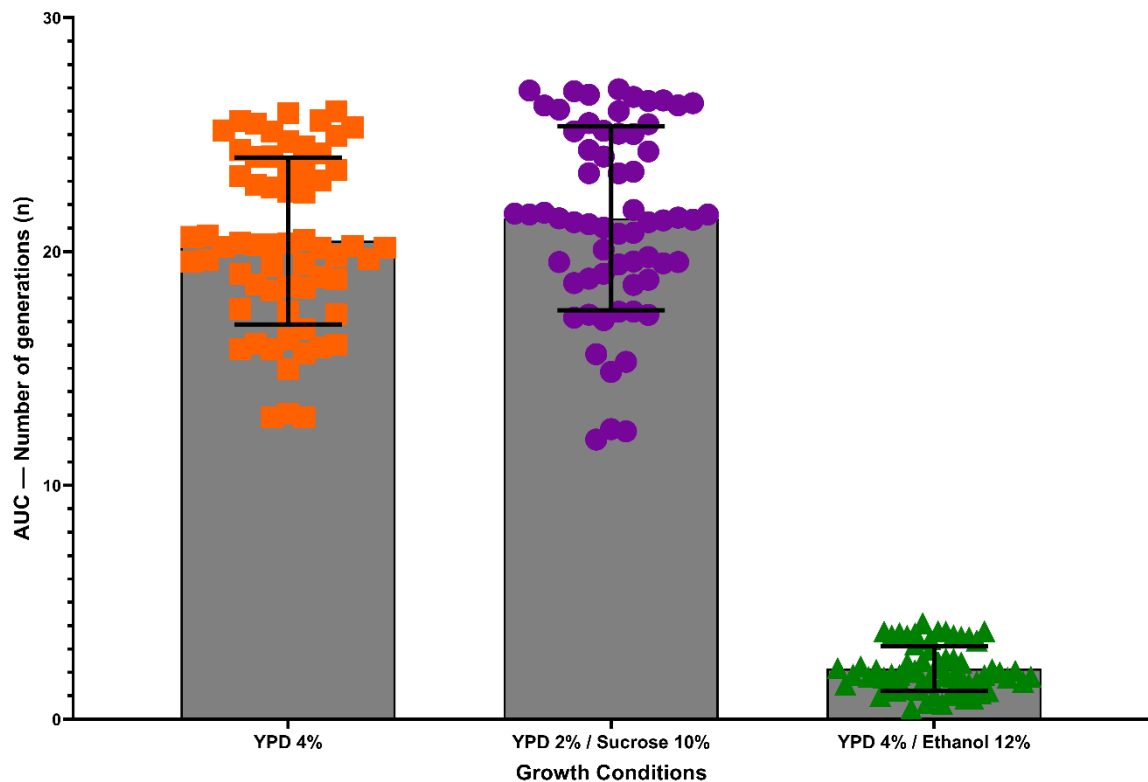
Fonte: Elaboração própria.

A Figura 9 apresenta a distribuição dos valores de AUC (n.h) obtidos a partir dos perfis de crescimento expressos em número de gerações celulares (n) das linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas nos três meios testados. Observa-se que as maiores áreas sob a curva foram registradas nos meios YPD 4% e YPD 2% / Sacarose 10%, enquanto o meio YPD 4% / Etanol 12% apresentou valores significativamente inferiores.

A análise One-way ANOVA aplicada aos valores de AUC médios revelou diferenças altamente significativas entre os três meios de cultivo ( $p < 0,0001$ ). O teste de Tukey confirmou que todos os meios diferiram estatisticamente entre si. As médias de AUC foram maiores em YPD 2% / Sacarose 10% (21,43) e YPD 4% (20,46), sem grande diferença biológica entre ambos, enquanto o meio YPD 4% / Etanol 12% (2,17) apresentou valores substancialmente inferiores.

Esses resultados evidenciam que a presença de etanol a 12% exerce forte estresse sobre a multiplicação celular de *S. cerevisiae*, reduzindo o número de gerações e a taxa de crescimento, conforme também descrito por Basso et al. (2008) e Stanley et al. (2010) que destacam o impacto inibitório do etanol sobre a integridade da membrana plasmática e a atividade enzimática, resultando em menor acúmulo de biomassa sob condições de estresse alcoólico. Por outro lado, a semelhança entre YPD 4% e YPD 2% / Sacarose 10% sugere que a substituição parcial da glicose por

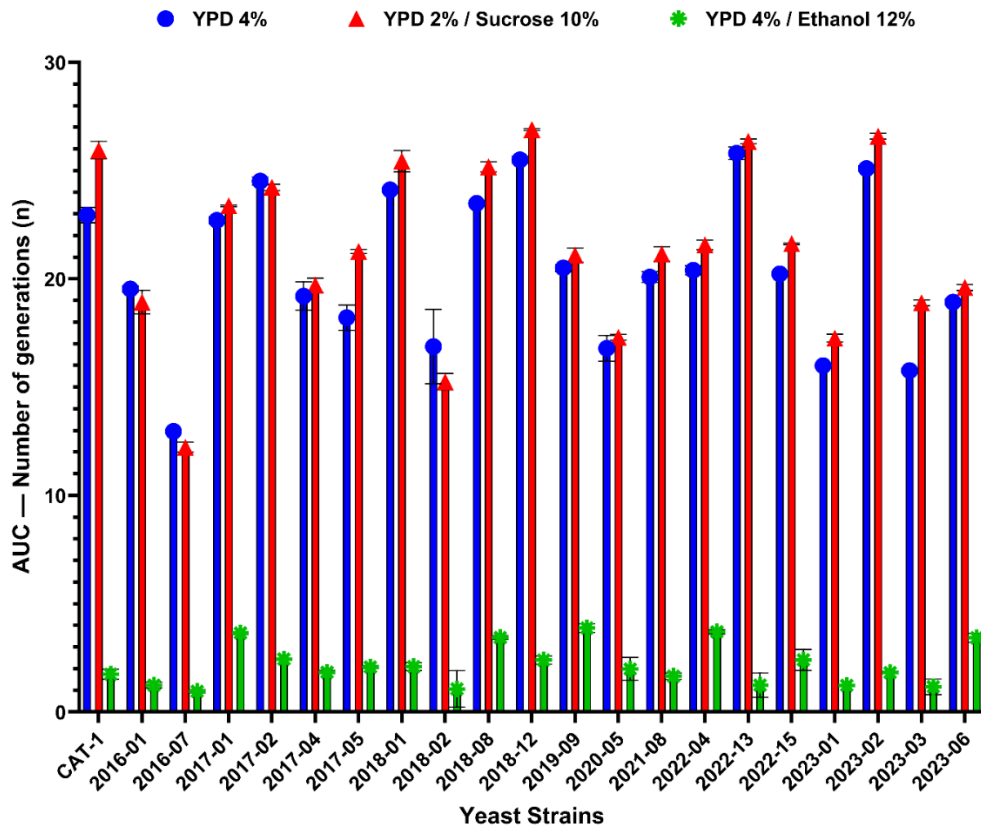
sacarose não compromete o desempenho das linhagens, demonstrando boa capacidade de utilização da sacarose como fonte de carbono.



**Figura 9 – Distribuição dos valores de AUC (n.h) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* nos três meios de cultivo**

Cada ponto representa o valor de AUC (n.h) obtido para uma linhagem de *S. cerevisiae* em um dos três meios de cultivo: YPD 4%, YPD 2% / Sacarose 10% e YPD 4% / Etanol 12%. As barras indicam as médias das AUCs para cada meio, e as linhas verticais representam o desvio padrão das triplicatas biológicas, refletindo a variação do desempenho de crescimento sob cada condição. **Fonte:** Elaboração própria.

A Figura 10 apresenta o desempenho de crescimento das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* expressos em valores de AUC (n.h) nos três meios de cultivo avaliados. De modo geral, observou-se que as linhagens apresentaram maior crescimento nos meios YPD 4% e YPD 2% / Sacarose 10%, enquanto o meio YPD 4% / Etanol 12% resultou em valores consideravelmente menores de AUC para todas as amostras.



**Figura 10 – Desempenho de crescimento das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* nos diferentes meios de cultivo**

As barras representam as médias dos valores de AUC (n.h) das linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas nos três meios avaliados: YPD 4% (azul), YPD 2% / Sacarose 10% (vermelho) e YPD 4% / Etanol 12% (verde). As linhas verticais indicam o desvio padrão das triplicatas biológicas. O gráfico evidencia diferenças significativas entre os meios e entre as linhagens, conforme indicado pela análise Two-way ANOVA ( $p < 0,0001$ ). **Fonte:** Elaboração própria.

A análise estatística Two-way ANOVA aplicada aos valores de AUC revelou efeitos altamente significativos tanto para o fator meio de cultivo quanto para o fator linhagem analisada, além de uma interação significativa entre ambos ( $p < 0,0001$ ).

O fator meio de cultivo foi responsável por 89,14% da variação total, indicando que as condições nutricionais e de estresse químico exercem influência predominante sobre o desempenho das leveduras.

O fator linhagem analisada respondeu por 7,50% da variação, refletindo diferenças intrínsecas no potencial fisiológico entre as cepas.

A interação meio x linhagem representou 3,26% da variação total, sugerindo que algumas linhagens apresentam respostas distintas conforme o ambiente de cultivo.

Esses resultados indicam que, embora existam diferenças genéticas entre as leveduras, o tipo de meio é o principal determinante do crescimento, o que reforça a importância da adaptação fisiológica às condições fermentativas. Resultados semelhantes foram relatados por Carvalho-Netto et al. (2018) e Qiu et al. (2019), que observaram forte influência das condições ambientais sobre o desempenho de cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae*.

Em particular, observou-se que algumas linhagens — como 2018-12, 2023-02 e 2022-13 — mantiveram valores elevados de AUC mesmo em condições de maior restrição nutricional, sugerindo maior robustez metabólica. Por outro lado, linhagens como 2016-07 e 2018-02 apresentaram desempenho inferior, especialmente sob alta concentração de etanol, refletindo menor tolerância ao estresse fermentativo.

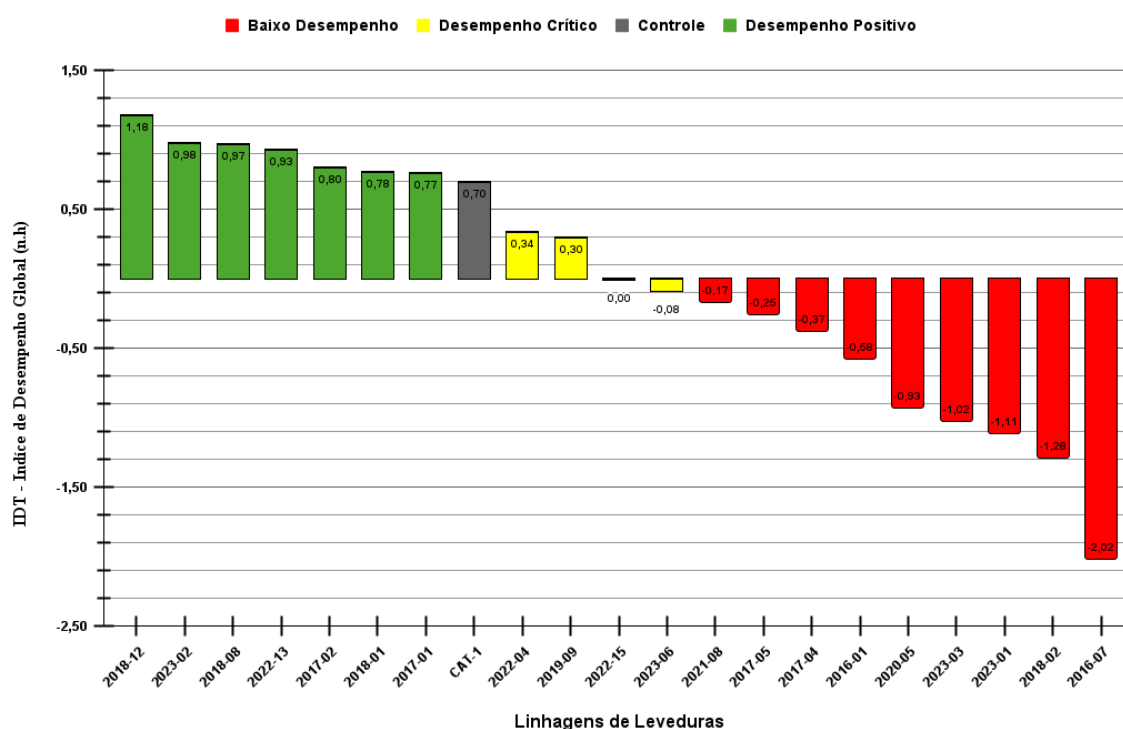
Resultados semelhantes foram descritos por Basso et al. (2008) e Carvalho-Netto et al. (2018), que associam o melhor desempenho fermentativo a mecanismos fisiológicos de resistência ao etanol, manutenção da integridade da membrana e eficiência no metabolismo de açúcares.

Observa-se que, de forma geral, as linhagens apresentaram maior crescimento nos meios YPD 4% e YPD 2%/Sacarose 10%, refletindo condições nutricionais favoráveis, enquanto o meio YPD 4%/Etanol 12% resultou em menores valores de AUC, evidenciando o efeito inibitório do etanol sobre o crescimento celular. Essa tendência reforça a importância da tolerância ao etanol como parâmetro seletivo para a escolha de linhagens industriais e reforça as linhagens como potenciais para produção de etanol brasileiro, visto que o crescimento em sacarose foi positivo.

Com base nos valores de AUC padronizados (Z-score) e ponderados de acordo com a relevância fisiológica dos meios de cultivo, foi calculado o Índice de Desempenho Total (IDT) para cada linhagem de *S. cerevisiae*. Esse índice representa uma medida integrada do crescimento global em todas as condições avaliadas.

A Figura 11 apresenta o ranking de desempenho global (IDT) das 21 linhagens testadas e a Figura 12 apresenta as placas de dropout nessa mesma ordem. A linhagem CAT-1 foi adotada como controle, por se tratar de uma cepa industrial amplamente utilizada na produção de etanol combustível. As categorias de desempenho foram definidas com base na comparação com esse controle:

Desempenho Positivo (verde): linhagens com IDT superior à CAT-1; Controle (cinza): linhagem CAT-1; Desempenho Crítico (amarelo): linhagens com IDT inferior à CAT-1, mas superior à linhagem 2023-06, atualmente empregada na usina de origem das amostras; Baixo Desempenho (vermelho): linhagens com IDT abaixo da 2023-06.

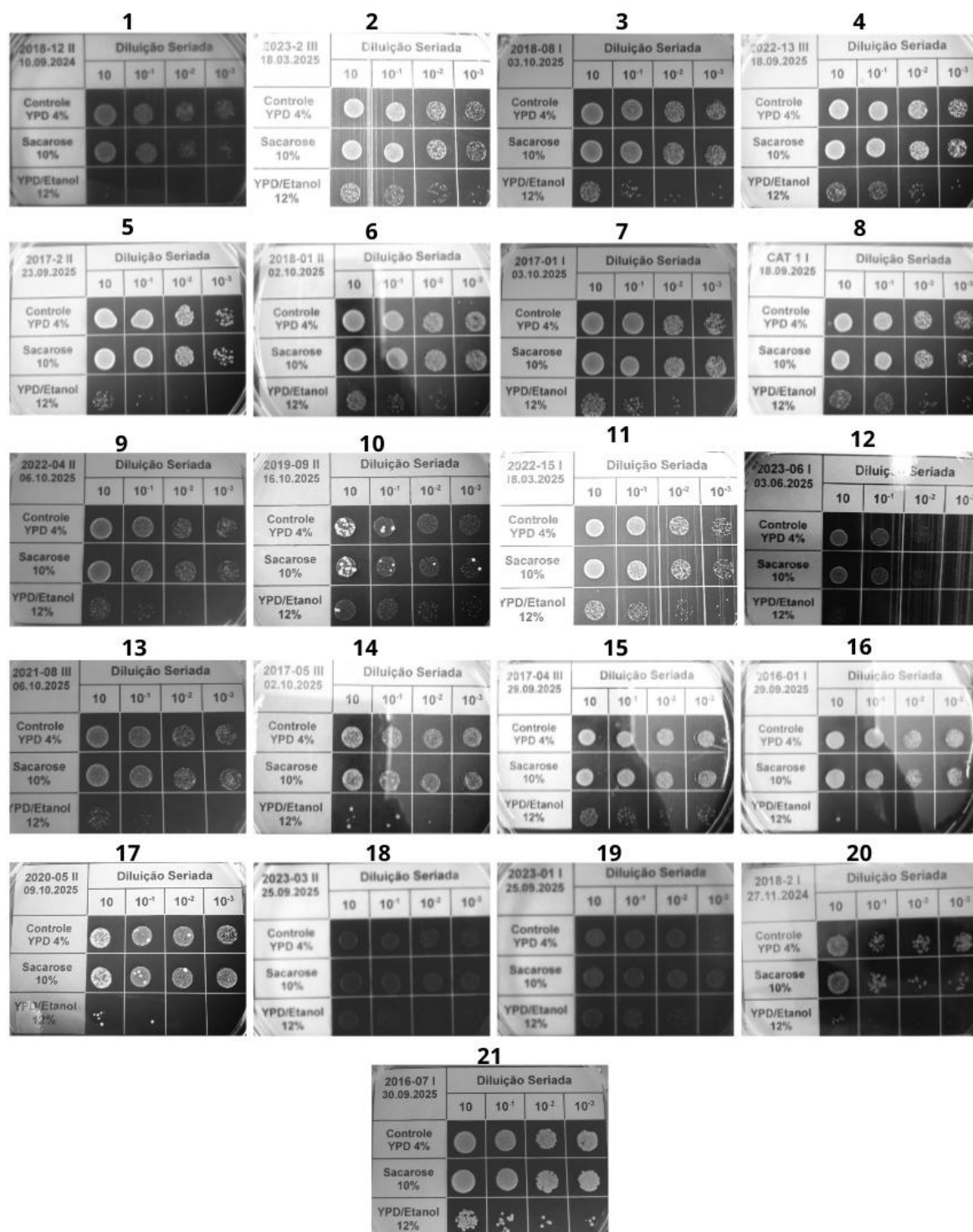


**Figura 11 – Índice de Desempenho Total (IDT) ponderado das linhagens de *S. cerevisiae* nos três meios de cultivo.**

O índice foi calculado a partir dos valores padronizados de AUC (Z-score), ponderados de acordo com a relevância fisiológica de cada meio (peso 2 para YPD 4%, peso 2 para YPD 2% / Sacarose 10% e peso 1 para YPD 4% / Etanol 12%). As categorias foram definidas em relação à linhagem controle CAT-1: verde – desempenho positivo (IDT > CAT-1); amarelo – desempenho crítico (entre CAT-1 e 2023-06); vermelho – baixo desempenho (IDT < 2023-06); cinza – controle (CAT-1). **Fonte:** Elaboração própria.

As linhagens 2018-12, 2023-02, 2018-08, 2022-13, 2017-02, 2018-01 e 2017-01 apresentaram desempenho positivo, com IDTs entre 0,77 e 1,18, indicando elevado potencial adaptativo e robustez fisiológica frente às diferentes condições de cultivo.

Em contraste, linhagens como 2018-02, 2023-01 e 2016-07 exibiram baixo desempenho, com valores negativos expressivos de IDT, refletindo menor eficiência de crescimento.



**Figura 12 – Avaliação da viabilidade celular das linhagens de leveduras por plaqueamento dropout após crescimento em diferentes meios de cultivo**

As linhagens estão organizadas da esquerda para a direita e de cima para baixo em ordem decrescente do Índice de Desempenho Total (IDT). Cada linha em uma mesma placa corresponde a um meio de cultivo, e cada ponto representa uma diluição seriada decimal ( $10$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). As placas foram incubadas a  $30\text{ °C}$  por 16–18 horas, exceto quando indicado. **Fonte:** Elaboração própria.

Após a caracterização do crescimento das 21 linhagens em três meios distintos e o cálculo do Índice de Desempenho Total (IDT), a viabilidade celular foi avaliada por

meio de plaqueamento pelo método de dropout, utilizando diluições seriadas decimais ( $10$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Cada linhagem foi representada por uma placa de Petri, contendo três linhas correspondentes aos diferentes meios de cultivo (YPD 4%, YPD 2% suplementado com sacarose 10% e YPD 4% suplementado com etanol 12%).

As placas foram organizadas da linhagem 1 à 21, em ordem decrescente de IDT. A placa 8 corresponde à linhagem controle comercial CAT-1, amplamente utilizada em processos industriais. Até essa placa, observou-se crescimento visível nas três condições de cultivo, embora no meio suplementado com etanol o crescimento tenha sido consistentemente menor, conforme esperado, uma vez que essa condição impõe estresse fisiológico severo às células, favorecendo a sobrevivência em detrimento da proliferação (CECCATO-ANTONINI, 2012).

Apesar da linhagem representada na placa 1, 2018-12, apresentar o maior valor de IDT, observou-se crescimento reduzido no ensaio de dropout, com ausência de crescimento detectável na condição contendo etanol. Esse resultado sugere que, embora a linhagem apresente elevado desempenho global de crescimento, sua tolerância à condição etanólica pode ser limitada quando avaliada sob a perspectiva de viabilidade celular.

As placas 9, 10 e 11 (2022-04, 2019-09 e 2022-15) apresentaram padrões de crescimento semelhantes aos observados nas linhagens de maior desempenho, porém com intensidade ligeiramente inferior. Destaca-se que essas linhagens precedem a placa 12, correspondente à linhagem atualmente utilizada em aplicação industrial (2023-06), indicando desempenho comparável ou superior em termos de viabilidade celular. A linhagem representada na placa 11 (2022-15) apresentou crescimento mais robusto dentro desse conjunto, sugerindo maior tolerância às condições avaliadas.

As demais linhagens apresentaram crescimento progressivamente reduzido, compatível com seus menores valores de IDT. As placas 18 e 19 (2023-03 e 2023-01) exibiram crescimento de baixa densidade em cada ponto do plaqueamento, porém ainda detectável nos três meios, indicando sobrevivência celular apesar da limitada capacidade de crescimento.

A placa 21, correspondente à linhagem com menor IDT, 2016-7, apresentou crescimento aparentemente mais denso; entretanto, esse resultado é atribuído ao maior tempo de incubação (aproximadamente 48 horas), em comparação às demais placas, incubadas por 16–18 horas, não refletindo maior desempenho fisiológico.

De forma geral, os resultados do plaqueamento por dropout corroboram os dados quantitativos obtidos a partir das curvas de crescimento e do cálculo do IDT, reforçando a distinção entre linhagens mais robustas e aquelas com menor capacidade adaptativa frente às diferentes condições de cultivo.

Esses resultados permitem identificar as linhagens com maior potencial para uso em processos fermentativos industriais, destacando-se especialmente 2018-12, 2023-02, 2018-08 e 2022-13 como candidatas promissoras para futuras etapas de caracterização fisiológica e fermentativa, considerando apenas perfil de crescimento.

#### **4.5. Avaliação da Tolerância após Tratamento Ácido**

A exposição de leveduras a condições de baixo pH representa um importante desafio fisiológico para a fermentação industrial, sendo o tratamento ácido amplamente utilizado como estratégia de controle microbiano nas usinas de etanol (BASSO ET AL., 2008; STANLEY ET AL., 2010).

Além das influências diretas após cinco ciclos do tratamento ácido sobre viabilidade e crescimento, variações no comportamento de floculação entre as linhagens também foram observadas.

Nesses casos, foi empregada uma diluição alternativa utilizando solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), devido à sua capacidade de quelar íons divalentes, especialmente cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que participam da formação de pontes iônicas entre as células durante o processo de floculação (SOARES & MOTA, 1997; STRATFORD, 1989). A adição de EDTA promove a desestabilização dessas pontes, facilitando a dispersão das células agregadas.

As amostras 2023-06 e 2022-15 foram diluídas 1:1 em EDTA, o que foi suficiente para desfazer os aglomerados e permitir a contagem celular. No entanto, as linhagens 2023-02 e 2019-09 apresentaram forte tendência à floculação, não sendo possível dispersá-las mesmo com diluições maiores.

A floculação em *Saccharomyces cerevisiae* é uma resposta fisiológica complexa modulada por fatores ambientais, incluindo pH e estresse celular (SOARES & MOTA, 1997; STRATFORD, 1989). Condições de pH baixo podem alterar a carga superficial e promover a expressão de flocculinas (FLO), aumentando a agregação de células em flocos.

Assim, é plausível que as exposições repetidas ao pH 2 tenham contribuído para a maior tendência à floculação observada em algumas linhagens, dificultando a dispersão das células durante a preparação de suspensões para contagem.

Esse efeito parece ser variável entre linhagens, indicando que a resposta ao estresse ácido envolve tanto mecanismos de sobrevivência quanto alterações fenotípicas na superfície celular (SOARES & MOTA, 1997; STRATFORD, 1989).

Em ambiente industrial, além do uso de agentes quelantes, podem ser empregadas alternativas enzimáticas, como a papaína, que atua rompendo ligações peptídicas das proteínas de superfície associadas à adesão celular, promovendo a dispersão de flocos mais resistentes (MARGARITIS & STEWART, 1984). Essa solução seria uma alternativa para viabilizar a contagem de células nas linhagens 2023-02 e 2019-09, porém não foi possível repetir o experimento para essas duas linhagens. Todos os valores para as demais linhagens foram anotados na tabela 4.

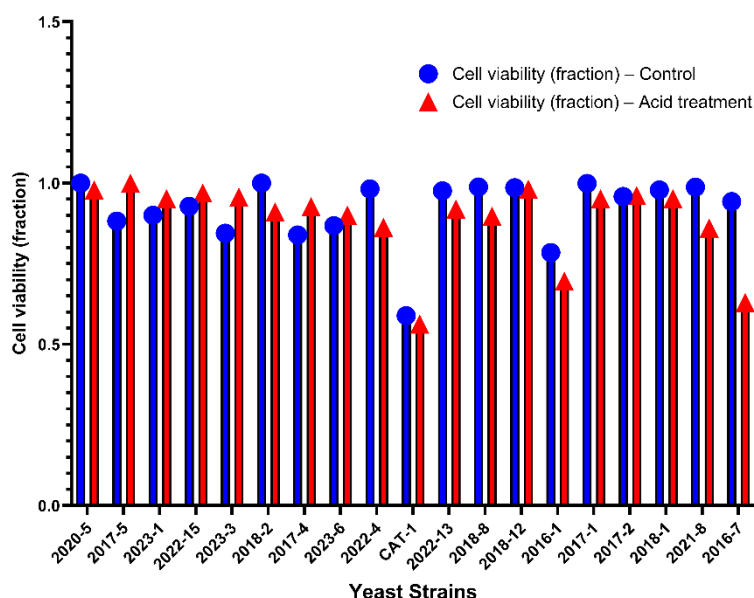
**Tabela 4 – Viabilidade e total de células e Índice de Tolerância ao Ácido (ITA) das linhagens de *S. cerevisiae* após exposição ao ácido.**

Amostras	Viabilidade (fração)		Total de Células (cel/mL)		ITA	Classificação (ITA)
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento		
2020-5	1,0000	0,9788	4,24E+06	1,70E+07	3,92	Muito Resistente (ITA > 2,0)
2017-5	0,8823	0,9993	5,44E+06	1,07E+07	2,23	Muito Resistente (ITA > 2,0)
2023-1	0,9000	0,9512	1,20E+07	2,46E+07	2,17	Muito Resistente (ITA > 2,0)
2022-15	0,9280	0,9695	1,39E+07	2,54E+07	1,91	Resistente (1,06 < ITA ≤ 2,0)
2023-3	0,8445	0,9565	1,48E+07	2,07E+07	1,58	Resistente (1,06 < ITA ≤ 2,0)
2018-2	1,0000	0,9103	8,96E+06	1,45E+07	1,47	Resistente (1,06 < ITA ≤ 2,0)
2017-4	0,8389	0,9269	1,49E+07	1,78E+07	1,32	Resistente (1,06 < ITA ≤ 2,0)
2023-6	0,8682	0,9009	1,67E+07	2,02E+07	1,26	Resistente (1,06 < ITA ≤ 2,0)
2022-4	0,9818	0,8626	1,54E+07	2,17E+07	1,24	Resistente (1,06 < ITA ≤ 2,0)
CAT-1	0,5887	0,5630	1,07E+07	1,19E+07	1,06	Estável (0,95 ≤ ITA ≤ 1,06)
2022-13	0,9757	0,9195	1,73E+07	1,94E+07	1,06	Estável (0,95 ≤ ITA ≤ 1,06)
2018-8	0,9877	0,8970	1,96E+07	2,06E+07	0,95	Estável (0,95 ≤ ITA ≤ 1,06)
2018-12	0,9855	0,9806	1,38E+07	1,24E+07	0,89	Sensível (ITA < 0,95)
2016-1	0,7844	0,6956	1,16E+07	1,15E+07	0,88	Sensível (ITA < 0,95)
2017-1	0,9989	0,9508	1,97E+07	1,75E+07	0,85	Sensível (ITA < 0,95)
2017-2	0,9583	0,9613	2,88E+07	2,28E+07	0,79	Sensível (ITA < 0,95)
2018-1	0,9787	0,9513	1,88E+07	1,48E+07	0,77	Sensível (ITA < 0,95)
2021-8	0,9872	0,8606	1,88E+07	1,45E+07	0,67	Sensível (ITA < 0,95)
2016-7	0,9425	0,6296	8,70E+06	8,10E+06	0,62	Sensível (ITA < 0,95)

Valores de viabilidade e total de células obtidos para as linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas em condições controle e sob tratamento com ácido sulfúrico. O Índice de Tolerância ao Ácido (ITA) foi calculado segundo a relação:  $ITA = (Viabilidade_{Trat}/Viabilidade_{Contr}) \times (Células_{Trat}/Células_{Contr})$ . A

classificação das linhagens foi atribuída conforme o valor de ITA:  $ITA < 1,0$  = sensível para linhagens abaixo da levedura 2023-06 que está em uso na usina;  $1,0 \leq ITA < 1,5$  = estável para as leveduras semelhantes a CAT 1;  $1,5 \leq ITA < 2,0$  = resistente;  $ITA \geq 2,0$  = muito resistente. **Fonte:** Elaboração própria.

A análise de variância (Two-way ANOVA) aplicada aos valores de viabilidade celular (Figura 13) não indicou efeito significativo do tratamento ácido ( $p = 0,2132$ ), demonstrando que a exposição ao pH 2 por 30 min não reduziu significativamente a viabilidade média das linhagens testadas, sendo responsável por apenas 1,79% da variação total. Por outro lado, observou-se efeito significativo do fator “linhagem” ( $p = 0,0023$ ), indicando que há diferenças intrínsecas entre as cepas quanto à sua capacidade de sobrevivência, nesse caso 78,82% da variação total é explicada pela diferença entre as linhagens, o que significa que algumas leveduras naturalmente tem maior viabilidade que outras. As médias preditas de viabilidade foram 0,9174 para o grupo controle e 0,8876 para o grupo tratado, sem diferença estatística relevante entre os grupos.

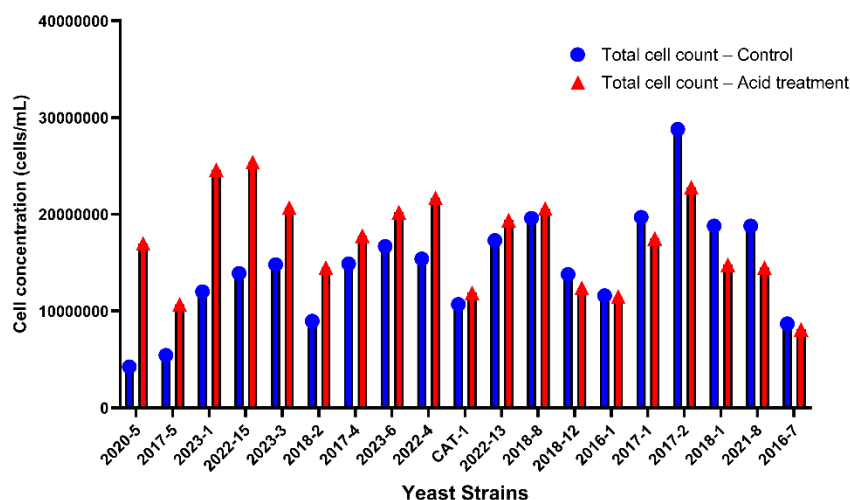


**Figura 13 – Efeito do tratamento ácido (pH 2,0 por 30 min) sobre a viabilidade celular de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***

A viabilidade foi expressa como a razão entre células viáveis e o total de células. A análise estatística por Two-way ANOVA indicou ausência de efeito significativo do tratamento ácido ( $p = 0,2132$ ), enquanto o fator linhagem apresentou efeito significativo ( $p = 0,0023$ ), evidenciando diferenças intrínsecas de viabilidade entre as cepas avaliadas. **Fonte:** Elaboração própria.

A análise Two-way ANOVA aplicada aos valores de densidade celular (Figura 14) revelou efeito significativo tanto para o fator “linhagem” ( $p = 0,0191$ ) com 68,6% de representação da variação total, quanto para o fator “tratamento ácido” ( $p = 0,0448$ ) com 6,45% da variação total. Portanto as linhagens diferem significativamente entre

si na densidade celular, independentemente do tratamento, porém este também tem efeito significativo sobre o número total de células.



**Figura 14 – Efeito do tratamento ácido (pH 2,0 por 30 min) sobre a concentração celular de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***

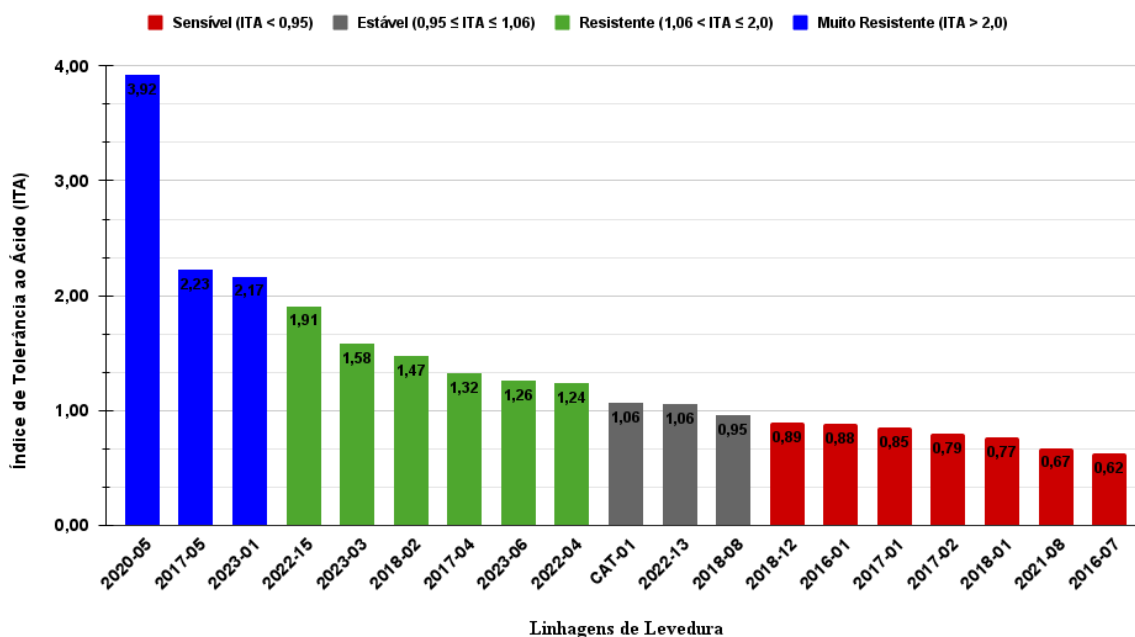
A concentração celular foi expressa como número total de células (células/mL). A análise estatística por Two-way ANOVA indicou efeito significativo tanto do fator linhagem ( $p = 0,0191$ ) quanto do tratamento ácido ( $p = 0,0448$ ), evidenciando diferenças intrínsecas entre as cepas e aumento significativo da concentração celular após o tratamento ácido. **Fonte:** Elaboração própria.

As médias preditas indicaram  $1,44 \times 10^7$  células/mL no grupo controle e  $1,72 \times 10^7$  células/mL no grupo tratado, com diferença significativa entre as condições. Esse resultado sugere que, embora o estresse ácido não tenha reduzido a viabilidade celular, ele promoveu leve aumento no total de células detectadas, o que pode refletir um processo adaptativo de recuperação populacional após exposição sucessiva ao pH 2 (BASSO ET AL., 2008; STANLEY ET AL., 2010).

A literatura descreve que *S. cerevisiae* ativa uma série de respostas adaptativas em resposta ao estresse ácido, incluindo mecanismos de manutenção da homeostase intracelular, modulação de transporte de íons e ativação de vias de resposta geral ao estresse, que podem auxiliar as células sobreviventes a recuperar o crescimento quando retornam a condições favoráveis (por exemplo, meio rico sem estresse) após a exposição (GUO & OLSSON, 2014; MOLLAPOUR & PIPER, 2021).

A partir desses dados foi calculado o Índice de Tolerância ao Ácido (ITA), que sintetiza o desempenho relativo das linhagens sob estresse. As maiores tolerâncias

foram observadas para 2020-05, 2017-05, 2023-01 e 2022-15, enquanto 2016-07 e 2021-08 apresentaram os menores valores (Tabela 4; Figura 15).



**Figura 15 – Índice de Tolerância ao Tratamento Ácido (ITA) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* após cinco ciclos de exposição ao pH 2**

O Índice de Tolerância ao Ácido (ITA) foi determinado com base nos valores de viabilidade celular e total de células obtidas após o quinto ciclo de exposição ao pH 2, normalizados em relação à linhagem controle CAT-1. As linhagens foram classificadas em quatro categorias de tolerância: Muito resistentes ( $ITA > 2,0$ , barras azuis), Resistentes ( $1,06 < ITA \leq 2,0$ , barras verdes), Estáveis ( $0,95 \leq ITA \leq 1,06$ , barras cinzas, desempenho semelhante à CAT-1) e Sensíveis ( $ITA < 0,95$ , barras vermelhas). Valores mais altos indicam maior tolerância e recuperação celular após o estresse ácido. As linhagens 2020-05, 2017-05 e 2023-01 apresentaram os maiores índices de tolerância, enquanto 2021-08 e 2016-07 demonstraram menor resistência às condições ácidas. **Fonte:** Elaboração própria.

Esses resultados indicam que a exposição sucessiva ao pH 2 promoveu uma resposta adaptativa em algumas linhagens, possivelmente associada a mecanismos de resistência. Estudos anteriores também observaram que leveduras industriais podem desenvolver tolerância a baixos pH após ciclos repetidos de exposição, com manutenção da viabilidade e recuperação da biomassa (BASSO ET AL., 2008; STANLEY ET AL., 2010).

Embora algumas linhagens tenham apresentado valores mais baixos de viabilidade após o tratamento ácido, observou-se que, ao serem plaqueadas em meio

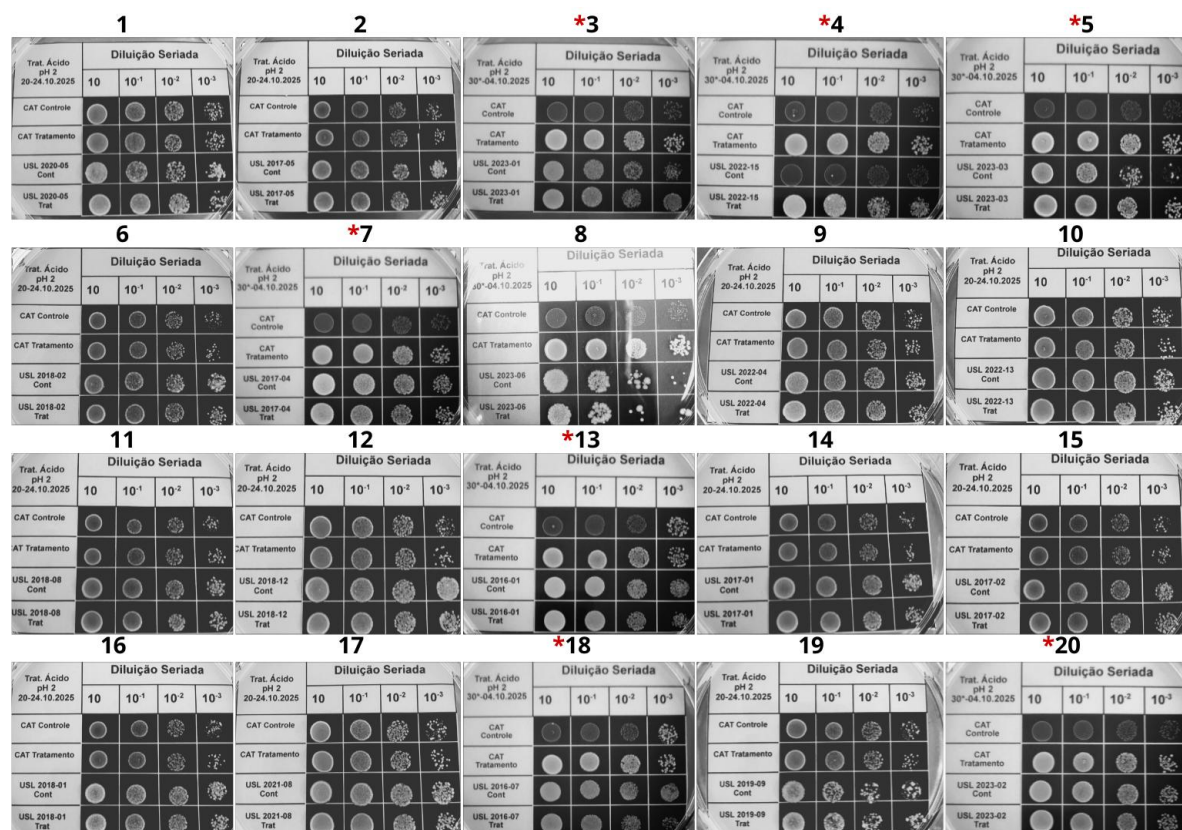
YPD 2% sólido (ágar 2%)(Figura 16), várias delas demonstraram crescimento vigoroso, inclusive as classificadas com menor tolerância pelo ITA.

Nenhuma das linhagens testadas apresentou crescimento visivelmente inferior à CAT-1, utilizada como controle positivo. Pelo contrário, várias leveduras mostraram crescimento comparável ou superior, destacando-se as linhagens 2022-13, 2017-02, 2017-01, 2018-12, 2021-08 e 2018-01, que exibiram maior densidade de colônias nas diluições correspondente à  $10^{-3}$ . Vale lembrar que a linhagem 2018-12 apresentou baixa densidade de crescimento no plaqueamento do perfil de crescimento, mas aqui ela se mostrou promissora após o tratamento ácido.

Esses resultados sugerem que o tratamento ácido, embora severo, não comprometeu a capacidade de regeneração celular da maioria das amostras, corroborando os dados quantitativos de viabilidade e total de células.

As inconsistências observadas em algumas placas (indicadas por asterisco na Figura 16) resultaram de variações de diluição do controle CAT-1, realizadas na primeira semana experimental. No entanto, essas discrepâncias não comprometem a análise comparativa, uma vez que o controle apresentou padrão de crescimento estável nas demais repetições.

O fato de várias linhagens exibirem desempenho igual ou superior à CAT-1, especialmente após múltiplos ciclos de estresse ácido, indica potencial adaptativo elevado e reforça sua viabilidade para uso industrial em condições de pH baixo. Essa adaptação pode estar relacionada à ativação de respostas de estresse que preservam a integridade celular e promovem recuperação populacional, conforme descrito por Guo e Olsson (2014) e Mollapour e Piper (2021).



**Figura 16 – Painel comparativo do crescimento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento ácido (pH 2)**

Painel de placas de Petri com crescimento em YPD 2% sólido (ágar 2%) obtidas após cinco ciclos de exposição ao pH 2, seguidos de recuperação em YPD 4% e plaqueamento por gotejamento (dropout). As amostras estão organizadas segundo o ranking do Índice de Tolerância ao Ácido (ITA), da linhagem mais tolerante (1 - 2020-05) à menos tolerante (18 - 2016-07). A linhagem comercial CAT-1 foi incluída em todas as placas como controle de referência. As placas identificadas com asterisco (3, 4, 5, 7, 8, 13, 18 e 20) apresentaram inconsistências no plaqueamento do controle, resultantes de erro de diluição, porém as comparações permanecem válidas considerando o desempenho da CAT-1 nas demais placas. As imagens foram obtidas após incubação a 30°C por 16 - 18 h. Visualmente, nenhuma das amostras apresentou crescimento inferior à CAT-1; as linhagens 10 (2022-13), 15 (2017-02), 14 (2017-01), 12 (2018-12), 17 (2021-08) e 16 (2018-01) exibiram crescimento visivelmente superior. **Fonte:** Elaboração própria.

Assim, o desempenho observado nas placas de dropout complementa os resultados obtidos nas curvas de crescimento em diferentes meios, reforçando o potencial fermentativo de algumas linhagens mesmo após exposição a condições adversas.

A partir da integração dos resultados genéticos e fisiológicos, observou-se que as linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* analisadas apresentam ampla

variabilidade em termos de crescimento, tolerância ao estresse e prevalência histórica na Usina São Luís.

As análises moleculares (Figura 5) confirmaram a existência de diferentes perfis genotípicos (grupos A–D), consistentes com a diversidade esperada em ambientes fermentativos contínuos. Dentro desses grupos, alguns padrões se destacaram: no Grupo A, as linhagens 2017-1, 2017-2 e 2018-1 apresentaram desempenho semelhante (mesmo que baixo) tanto em crescimento quanto em tolerância ao tratamento ácido, enquanto as linhagens 2017-4 e 2018-8 mostraram perfis distintos entre si e do grupo em geral. No Grupo B, a linhagem 2017-5 apresentou alta tolerância ao tratamento ácido, enquanto 2018-12 exibiu o comportamento oposto, embora esta última tenha alcançado o melhor desempenho de crescimento (IDT). As linhagens do Grupo C (2022-13 e 2022-15) apresentaram resultados contrastantes: uma com melhor desempenho de crescimento e outra com maior tolerância ao ácido. No Grupo D, a levedura 2020-5 exibiu o melhor ITA, embora tanto ela quanto a 2021-8 tenham apresentado baixo desempenho de crescimento, sendo esta última particularmente sensível ao ácido.

A integração dos índices de desempenho (IDT) na figura 11 e de tolerância ao ácido (ITA) (Tabelas 4 e figura 15) permitiu identificar três perfis fisiológicos distintos e promissores entre as linhagens avaliadas, apresentados na Tabela 5.

As linhagens 2018-12, 2018-08 e 2023-02 (Ambas apresentaram perfil genético diferentes entre si) foram classificadas como de alta performance e baixa tolerância ao ácido, apresentando os maiores valores de IDT, o que indica maior eficiência de crescimento e adaptação aos meios fermentativos. Contudo, exibiram baixa resistência ao estresse ácido, o que limita sua aplicação em processos com pH extremo, mas dado positivo é a recuperação após inoculação em meio rico em nutrientes (Figura 16). Além disso, a linhagem 2023-02 requer reavaliação quantitativa, podendo se confirmar como uma das mais promissoras após nova validação experimental.

As linhagens 2022-15 e 2023-06 diferentes na genotipagem, foram classificadas como de alta tolerância ao ácido e desempenho moderado, demonstraram elevada resistência ao tratamento ácido, mantendo a viabilidade celular superior à média. A

linhagem 2022-15 destacou-se com tolerância substancialmente maior, indicando robustez fisiológica em condições de acidificação.

As linhagens 2022-13 e 2022-04, que apresentaram equilíbrio entre desempenho e tolerância, mostraram resistência ao ácido semelhante à linhagem controle CAT-1. Entretanto, 2022-13 apresentou desempenho de crescimento superior a 2022-04 e à CAT-1, sendo considerada a candidata mais equilibrada entre as avaliadas. Ambas evidenciam adaptação balanceada entre vigor fermentativo e resistência ao estresse, configurando-se como potenciais candidatas a testes de fermentação controlada em escala industrial.

**Tabela 5 – Classificação das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* quanto ao desempenho global (IDT) e tolerância ao estresse ácido (ITA).**

<b>Categoria para Linhagens Promissoras</b>	<b>Linhagem</b>	<b>IDT</b>	<b>ITA</b>
<b>Linhagem Controle</b>	CAT 1	0,7	1,06
<b>Alta Performance de Crescimento e Baixa Tolerância ao Ácido</b>	2018-12	1,18	0,89
	2018-08	0,97	0,95
	2023-02	0,98	Qualitativo
<b>Alta Tolerância ao Ácido e Performance de Crescimento Moderado</b>	2022-15	-0,0019	1,91
	2023-06	-0,08	1,26
<b>Equilíbrio entre Performance de Crescimento e Tolerância ao Ácido</b>	2022-13	0,93	1,06
	2022-04	0,34	1,24

A CAT 1 é o controle e as linhagens foram agrupadas conforme o desempenho de crescimento (IDT) e a tolerância ao tratamento ácido (ITA). Valores de IDT maiores indicam maior desempenho fermentativo global. Linhagens com alta performance, tolerância e equilíbrio fisiológico foram destacadas conforme os resultados quantitativos e observações semi-quantitativas das placas de dropout para a linhagem 2023-02 foi usada para colocá-la como linhagem promissora. **Fonte:** Elaboração própria.

## 5. CONCLUSÃO

A integração das análises moleculares e fisiológicas demonstrou que as linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* avaliadas apresentam elevada variabilidade genética e fisiológica, refletindo os processos adaptativos esperados em ambientes fermentativos industriais contínuos. As análises moleculares confirmaram a existência de diferentes perfis genotípicos entre as linhagens, evidenciando a diversidade populacional presente na Usina São Luís.

A utilização dos índices de desempenho de crescimento total (IDT) e de tolerância ao tratamento ácido (ITA) permitiu classificar as linhagens em três perfis fisiológicos distintos: (i) linhagens com alta performance de crescimento e baixa tolerância ao estresse ácido; (ii) linhagens com elevada tolerância ao ácido e desempenho fermentativo moderado; e (iii) linhagens que apresentaram equilíbrio entre crescimento e tolerância ao estresse.

Nesse contexto, as linhagens 2022-13 e 2022-04 destacaram-se por apresentarem desempenho equilibrado entre eficiência de crescimento e resistência ao tratamento ácido, com tolerância comparável ou superior à linhagem controle CAT-1. Em especial, a linhagem 2022-13 apresentou desempenho de crescimento superior, configurando-se como a candidata mais equilibrada entre as avaliadas.

Os resultados evidenciaram elevada diversidade genotípica e fenotípica entre as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Embora a genotipagem tenha identificado quatro grupos genéticos (A–D) com padrões de bandas semelhantes, a análise fisiológica não revelou perfis de desempenho equivalentes dentro desses grupos. Esses achados indicam que a similaridade genotípica nem sempre se reflete em comportamento fisiológico semelhante, reforçando a importância da integração entre análises moleculares e fisiológicas na seleção de linhagens industriais. De forma geral, os resultados obtidos evidenciam que a combinação de abordagens genotípicas e fenotípicas, aliada à utilização de índices integrativos como IDT e ITA, constitui uma estratégia eficiente para a triagem e seleção de linhagens industriais promissoras de *S. cerevisiae*, com potencial aplicação em processos de produção de etanol e em ensaios fermentativos controlados em escala laboratorial e industrial.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, recomenda-se a realização de ensaios fermentativos em escala laboratorial e piloto com as linhagens selecionadas, especialmente 2022-13, 2022-15 e 2023-02, a fim de validar o desempenho observado em condições controladas de produção de etanol. Além disso, a análise quantitativa complementar do tratamento ácido para a linhagem 2023-02 poderá confirmar sua classificação como candidata de alta performance.

Estudos adicionais também poderão investigar a expressão de genes relacionados à tolerância ao etanol, pH e temperatura, bem como a quantificação de metabólitos secundários (glicerol, ácidos orgânicos e subprodutos). A aplicação de abordagens de genômica comparativa e transcriptômica permitirá compreender os mecanismos moleculares responsáveis pela robustez fisiológica observada e pela variação fenotípica observada entre as linhagens.

Por fim, recomenda-se a avaliação combinada das linhagens selecionadas em co-cultivo ou sob condições de reciclo celular, simulando o ambiente industrial real, para investigar possíveis sinergias adaptativas e potenciais de estabilidade ao longo de ciclos fermentativos sucessivos.

## 7. REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. et al. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- ANDRION, A. **Aspectos bioquímicos e moleculares da fermentação alcoólica por leveduras.** 2022. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.
- ANVISA (BRASIL). **Farmacopeia Brasileira.** 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- ARBEFEVILLE, S.; HARRIS, A.; FERRIERI, P. **Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 140, p. 40–46, 2017.
- ATTFIELD, Paul V. et al. **Perspectives on current and future yeast technologies for ethanol-based biofuels and bioproducts.** *FEMS Yeast Research*, v. 25, 2025, efoaf044. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf044>
- BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review.** *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 858–875, 2011.
- BASÍLIO, A. C. M. et al. **The influence of yeast strain on the quality of beer.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 114, p. 52–57, 2008.
- BASSO, L. C. et al. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.** *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation.** In: BERNARDES, M. A. S. (org.). *Biofuel Production – Recent Developments and Prospects*. London: IntechOpen, 2011.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. **Application of fed-batch fermentation to fuel alcohol production.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, p. 1–12, 2007.
- BNDES; CGEE. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil.** Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- BOTSTEIN, D.; CHERVITZ, S. A.; CHERRY, J. M. **Yeast as a model organism.** *Science*, v. 277, n. 5330, p. 1259–1260, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3039837/>. Acesso em: 30 de Dezembro de 2025.
- CARVALHO-NETTO, O. V. et al. **Monitoring yeast populations in bioethanol production using molecular markers.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 2305–2316, 2013.

- CARVALHO-NETTO, O. V. et al. **Industrial yeast selection and population dynamics in Brazilian ethanol plants.** *FEMS Yeast Research*, v. 18, 2018.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 32, p. 1–9, 2012.
- DA SILVA FERNANDES, P. M. et al. **Yeast biodiversity and dynamics in Brazilian ethanol production.** *Yeast*, v. 39, p. 45–60, 2022.
- DE DEKEN, R. H. **The Crabtree effect: a regulatory system in yeast.** *Journal of General Microbiology*, v. 44, p. 149–156, 1966.
- ESTEVE-ZARZOSO, B. et al. **Identification of yeast species by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 329–337, 1999.
- FONSECA, G. G. **Identificação molecular de leveduras de interesse industrial.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
- FRANCO-DUARTE, R. et al. **Advances in molecular tools for yeast identification and characterization.** *Trends in Biotechnology*, v. 37, p. 118–132, 2019.
- GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. **Normalization of gene expression data.** *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 26, p. 381–385, 2012.
- GOLDEMBERG, J. **The Brazilian biofuels industry.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 1, n. 6, 2008.
- GUO, Z. P.; OLSSON, L. **Physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to industrial stress.** *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 130–144, 2014.
- GUTHRIE, C.; FINK, G. R. **Guide to yeast genetics and molecular biology.** San Diego: Academic Press, 2002.
- JOSEPA, J. et al. **Molecular identification of wine yeasts.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 76–84, 2000.
- LEE, S. et al. **Advances in ethanol fermentation technology.** *Renewable Energy*, v. 205, p. 124–135, 2023.
- LIMA, U. A. et al. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms.** 16. ed. New York: Pearson, 2021.
- MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H. **Fungal stress responses.** *Molecular Microbiology*, v. 85, p. 389–400, 2012.
- MARGARITIS, A.; STEWART, R. J. **Ethanol inhibition and adaptation in yeast.** *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 1, p. 339–362, 1984.

- MOLLAPOUR, M.; PIPER, P. W. **Targeting stress tolerance in yeast.** *Microbial Cell*, v. 8, p. 25–40, 2021.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry.** 8. ed. New York: W. H. Freeman, 2019.
- NETTO, C. B.; DESTRUHAUT, A.; GOMA, G. **Ethanol fermentation by flocculent yeast: dependence of performance and stability on a critical fermentation rate.** *Biotechnology Letters*, v. 7, p. 355–360, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01030287>
- PARAPOULI, M. et al. **Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications.** *Microorganisms*, v. 8, n. 9, 2020.
- PRADO, M. R. **Caracterização molecular de leveduras industriais.** 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.
- QIU, X.; ZHANG, J.; ZHOU, J. et al. **Stress tolerance phenotype of industrial yeast: industrial cases, cellular changes, and improvement strategies.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 6449–6462, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09993-8>
- REN21. **Renewables 2016 Global Status Report.** Paris: REN21 Secretariat, 2016. Disponível em: [https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/REN21\\_GSR2016\\_FullReport\\_en\\_11.pdf](https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/REN21_GSR2016_FullReport_en_11.pdf). Acesso em: 01 de Janeiro de 2026.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: basic concepts.** 3. ed. Boston: Pearson, 2017.
- SMART, K. A. et al. **Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality.** *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 57, n. 1, p. 18–23, 1999.
- SOARES, E. V.; MOTA, M. **Quantification of yeast flocculation.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 103, p. 93–98, 1997.
- STANLEY, D. et al. **Stress tolerance of Saccharomyces cerevisiae in bioethanol production.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 1195–1206, 2010.
- STEWART, G. G. **Brewing and fermentation yeast.** *FEMS Yeast Research*, v. 16, 2016.
- STRATFORD, M. **Yeast flocculation: a new perspective.** *Yeast*, v. 5, p. 493–500, 1989.
- ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMELKOVÁ, J. **Isolation, identification and characterization of regional indigenous Saccharomyces cerevisiae strains using molecular approaches.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 181–190, 2016. Disponível em: <https://www.elsevier.es/en-revista-brazilian-journal-microbiology-490-articulo-isolation-identification-characterization-regional-indigenous-S1517838215000118>. Acesso em: 30 de Dezembro de 2025.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2000.

WHEALS, A. E. et al. **The bioethanol industry**. *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 482–487, 1999.

## 8. APÊNDICES

## APÊNDICE A - Formulação dos Meios de Cultura Usados para os Experimentos

Meio YPD 2%	Volume do Meio			
Reagentes	200 mL	400 mL	800 mL	1000 mL
# Dextrose (2%)	4 g	8 g	16 g	20 g
# Peptona (2%)	4 g	8 g	16 g	20 g
# Extrato (1%)	2 g	4 g	8 g	10 g
Incluir ágar (2%) para meio sólido	2 g	4 g	8 g	10 g
Diluir massa de Sacarose no volume do meio para obter YPD 2% / Sacarose 10%				
Meio YPD 4%	Volume do Meio			
Reagentes	200 mL	400 mL	800 mL	1000 mL
# Dextrose (4%)	8 g	16 g	32 g	40 g
# Peptona (2%)	4 g	8 g	16 g	20 g
# Extrato (1%)	2 g	4 g	8 g	10 g
Meio YPD 8% 2X	Volume do Meio			
Reagentes	200 mL	400 mL	800 mL	1000 mL
# Dextrose (8%)	16 g	32 g	64 g	80 g
# Peptona (4%)	8 g	16 g	32 g	40 g
# Extrato (2%)	4 g	8 g	16 g	20 g
Diluir em mesmo Volume de Etanol 24% para obter YPD 4% / Etanol 12%				

APÊNDICE B - Tabela com as Medidas em de OD<sub>600</sub> Lidas no Espectrofotômetro

Time(hour)	YPD 4%			Sucrose 10%			Ethanol 12%			YPD 4%			Sucrose 10%			Ethanol 12%		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	2016-1									2019-09								
	0,096	0,096	0,096	0,078	0,078	0,078	0,069	0,069	0,069	0,089	0,089	0,089	0,071	0,071	0,071	0,077	0,077	0,077
2	0,205	0,212	0,217	0,151	0,146	0,154	0,084	0,077	0,077	0,236	0,243	0,248	0,191	0,188	0,195	0,110	0,107	0,111
4	0,491	0,505	0,492	0,347	0,343	0,376	0,077	0,074	0,078	0,546	0,555	0,563	0,440	0,440	0,462	0,114	0,113	0,111
6	1,340	1,340	1,380	1,072	1,084	1,220	0,078	0,078	0,079	1,428	1,380	1,448	1,268	1,228	1,268	0,121	0,119	0,122
8	2,810	2,870	2,850	2,300	2,330	2,730	0,052	0,082	0,051	1,760	1,880	1,820	1,470	1,890	2,010	0,121	0,106	0,096
Time /hour	2016-7									2020-05								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,110	0,110	0,110	0,087	0,087	0,087	0,100	0,100	0,100	0,112	0,112	0,112	0,097	0,097	0,097	0,074	0,074	0,074
2	0,137	0,138	0,138	0,092	0,095	0,096	0,110	0,110	0,108	0,236	0,246	0,231	0,179	0,194	0,187	0,082	0,076	0,083
4	0,301	0,303	0,305	0,206	0,210	0,216	0,104	0,105	0,105	0,482	0,443	0,470	0,399	0,423	0,416	0,076	0,072	0,088
6	0,739	0,734	0,764	0,541	0,562	0,573	0,113	0,114	0,113	1,142	1,012	0,854	1,054	1,004	1,002	0,092	0,105	0,111
8	1,620	1,592	1,628	1,440	1,532	1,452	0,120	0,115	0,112	2,320	1,910	2,030	2,110	2,110	2,140	0,126	0,109	0,112
Time /hour	2017-01									2021-08								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,099	0,099	0,099	0,079	0,079	0,079	0,094	0,094	0,094	0,097	0,097	0,097	0,079	0,079	0,079	0,080	0,080	0,080
2	0,238	0,236	0,236	0,175	0,179	0,174	0,123	0,119	0,122	0,218	0,224	0,221	0,184	0,182	0,186	0,094	0,084	0,088

4	0,75 1	0,73 3	0,74 6	0,60 8	0,60 8	0,60 0	0,14 3	0,14 0	0,13 9	0,47 4	0,47 4	0,49 3	0,42 4	0,42 2	0,41 6	0,08 9	0,091	0,08 9
6	2,24 4	2,15 6	2,24 0	2,21 6	2,16 0	2,13 6	0,13 7	0,14 0	0,14 1	1,42 0	1,52 4	1,52 7	1,60 8	1,31 2	1,48 0	0,09 7	0,096	0,09 1
8	4,10 0	4,05 0	4,53 0	3,87 0	3,74 0	4,14 0	0,14 3	0,14 2	0,14 7	3,47 0	3,58 0	3,77 0	3,45 0	3,39 0	3,67 0	0,11 3	0,119	0,11 9
Time /hour	2017-02									2022-04								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,11 3	0,11 3	0,11 3	0,09 2	0,09 2	0,09 2	0,13 1	0,13 1	0,13 1	0,10 7	0,10 7	0,10 7	0,08 2	0,08 2	0,08 2	0,10 4	0,104	0,10 4
2	0,35 2	0,35 4	0,36 0	0,24 0	0,24 0	0,24 5	0,15 3	0,15 7	0,16 0	0,21 9	0,21 5	0,22 2	0,16 2	0,15 8	0,16 0	0,13 3	0,136	0,13 7
4	0,87 7	0,87 2	0,89 0	0,68 5	0,69 4	0,69 0	0,16 6	0,16 7	0,16 7	0,49 5	0,48 6	0,49 6	0,39 1	0,38 3	0,37 7	0,14 9	0,150	0,15 0
6	2,88 0	3,01 6	3,02 8	2,58 4	2,64 0	2,60 8	0,17 4	0,17 3	0,17 3	1,85 2	2,00 0	1,97 2	2,08 0	1,93 2	2,00 4	0,15 6	0,160	0,15 9
8	6,32 0	6,45 0	6,82 0	5,46 0	5,91 0	6,14 0	0,18 5	0,17 0	0,17 6	4,85 0	5,00 0	5,54 0	5,21 0	4,83 0	5,40 0	0,16 6	0,169	0,16 7
Time /hour	2017-04									2022-13								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,09 6	0,09 6	0,09 6	0,07 6	0,07 6	0,07 6	0,07 3	0,07 3	0,07 3	0,09 0	0,09 0	0,09 0	0,08 0	0,08 0	0,08 0	0,10 4	0,104	0,10 4
2	0,19 0	0,20 2	0,19 4	0,15 0	0,14 3	0,13 7	0,08 6	0,08 5	0,08 3	0,30 0	0,38 1	0,35 6	0,30 4	0,28 8	0,29 5	0,13 9	0,176	0,11 6
4	0,45 0	0,48 7	0,50 7	0,37 7	0,37 2	0,36 4	0,08 1	0,08 0	0,08 1	0,82 1	0,85 0	0,83 4	0,74 3	0,76 0	0,76 7	0,10 9	106,00 0	0,10 6
6	1,21 2	1,38 4	1,45 6	1,35 2	1,28 4	1,27 6	0,08 3	0,08 2	0,07 9	2,56 4	2,44 8	2,50 8	2,56 0	2,65 2	2,59 6	0,11 1	0,111	0,11 2
8	2,53 0	2,95 0	3,09 0	2,80 0	2,45 0	2,61 0	0,03 4	0,03 5	0,03 4	5,56 0	5,14 0	5,50 0	5,02 0	5,33 0	5,66 0	0,08 6	0,095	0,08 9
Time /hour	2017-05									2022-15								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,10 8	0,10 8	0,10 8	0,08 4	0,08 4	0,08 4	0,08 8	0,08 8	0,08 8	0,11 1	0,11 1	0,11 1	0,08 7	0,08 7	0,08 7	0,08 7	0,087	0,08 7
2	0,25 5	0,24 3	0,25 7	0,22 8	0,22 7	0,23 4	0,09 5	0,09 4	0,10 4	0,17 6	0,18 0	0,18 4	0,12 8	0,13 3	0,12 9	0,11 7	0,102	0,10 2
4	0,55 2	0,51 3	0,55 2	0,56 1	0,58 6	0,56 6	0,10 4	0,10 6	0,10 2	0,64 4	0,65 5	0,64 4	0,59 0	0,55 5	0,57 6	0,11 3	0,100	0,11 0
6	1,24 8	1,12 4	1,32 8	1,31 2	1,40 4	1,36 0	0,11 5	0,12 5	0,12 0	1,83 0	1,79 6	1,81 8	1,98 0	1,98 0	1,98 0	0,12 5	0,123	0,11 8
8	2,09 0	1,66 0	1,91 0	2,49 0	2,29 0	2,29 0	0,12 8	0,11 3	0,11 1	5,63 0	5,71 0	5,85 0	5,31 0	5,74 0	5,83 0	0,10 8	0,101	0,09 8
Time /hour	2018-01									2023-01								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,10 3	0,10 3	0,10 3	0,07 5	0,07 5	0,07 5	0,09 7	0,09 7	0,09 7	0,08 0	0,08 0	0,08 0	0,07 0	0,07 0	0,07 0	0,07 0	0,070	0,07 0
2	0,29 3	0,29 0	0,29 3	0,21 2	0,20 9	0,22 4	0,11 0	0,10 9	0,11 1	0,12 6	0,12 4	0,12 5	0,10 1	0,10 5	0,10 5	0,07 6	0,076	0,07 6
4	0,86 8	0,83 4	0,82 7	0,67 7	0,67 5	0,74 1	0,12 1	0,12 5	0,12 2	0,33 7	0,32 8	0,33 9	0,34 2	0,36 1	0,34 4	0,07 7	0,075	0,07 5
6	2,65 6	2,66 0	2,65 2	2,28 0	2,27 2	2,49 2	0,12 9	0,12 9	0,12 8	0,72 7	0,71 6	0,70 8	0,74 8	0,76 8	0,77 0	0,08 1	0,084	0,08 4
8	5,18 0	5,21 0	5,26 0	4,69 0	4,83 0	5,27 0	0,10 3	0,12 6	0,11 7	1,50 0	1,50 8	1,54 8	1,70 0	1,71 2	1,73 6	0,08 8	0,084	0,08 3
Time /hour	2018-02									2023-2								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,10 1	0,10 1	0,10 1	0,10 0	0,10 0	0,10 0	0,09 4	0,09 4	0,09 4	0,09 6	0,09 6	0,09 6	0,07 3	0,07 3	0,07 3	0,10 1	0,101	0,10 1
2	0,19 3	0,18 6	0,19 0	0,13 9	0,14 1	0,14 2	0,05 9	0,08 8	0,09 1	0,26 7	0,28 3	0,28 6	0,19 9	0,20 3	0,20 2	0,12 0	0,120	0,10 8
4	0,46 7	0,38 9	0,49 3	0,37 1	0,38 1	0,38 5	0,09 4	0,11 6	0,08 5	0,77 8	0,76 4	0,77 6	0,70 7	0,67 9	0,67 3	0,12 9	0,126	0,12 7
6	0,97 0	0,69 8	1,14 4	0,93 6	0,95 4	1,06 6	0,10 6	0,09 2	0,09 9	3,00 0	2,99 5	2,98 0	3,11 5	3,01 0	3,09 0	0,12 5	0,121	0,12 9

