



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
EM MOSTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

JUDIELHO DE MORAIS LIMA

Araras

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
EM MOSTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

JUDIELDO DE MORAIS LIMA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras - SP

2025

Lima, Judieldo de Morais

Leveduras não-Saccharomyces para produção de etanol em mosto de cana-de-açúcar / Judieldo de Morais Lima -- 2025.
87f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Sandra Regina Ceccato Antonini

Banca Examinadora: Reinaldo Gaspar Bastos, Michelle dos Santos Cordeiro Perna

Bibliografia

1. Estresse. 2. Fermentação. 3. Não-Saccharomyces. I. Lima, Judieldo de Morais. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Judieldo de Moraes Lima, realizada em 29/08/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar)

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar)

Profa. Dra. Michelle dos Santos Cordeiro Perna (Crush Dynamics)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo discernimento e por me manter de pé diante de todas as dificuldades encontradas ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais Maria Josinete (Preta) e Damião que sempre me apoiaram e motivaram a buscar sempre o melhor para a minha vida. Agradeço também aos meus tios e tias que direta ou indiretamente participaram dessa jornada.

Aos meus amigos Gabriel Marques, Lucas Radaelli, Bárbara Guimarães, Raimmy Arcanjo, Hugo, Mariana Leite e George Yuri, obrigado por estarem ao meu lado nos momentos de cansaço, pelas palavras de incentivo, pelas conversas que aliviaram a mente e pelo apoio incondicional durante toda essa caminhada. Vocês tornaram este percurso mais leve e significativo, sou grato por cada gesto de amizade e parceria.

À minha orientadora Profa. Dr^a. Sandra Regina Ceccato Antonini, expresse minha profunda gratidão pela orientação, paciência, incentivo constante e pelos valiosos ensinamentos transmitidos ao longo desta jornada, o qual foi fundamental para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e acadêmico, obrigado por acreditar em mim e por caminhar ao meu lado.

À equipe do LAMAM (Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular-UFSCar-Araras), em especial ao Neto, Ana Zullo, Giovanna, Gabriel, Bruna, Bianca, Julienny, Liz Grimaldi e a todos os colegas de laboratório, meu sincero agradecimento pelo apoio técnico, pela disposição em ajudar e pelo ambiente colaborativo, pois cada conversa, troca de experiência e gesto de cooperação contribuíram significativamente para a realização desta pesquisa.

Aos amigos que o vôlei me deu, minha profunda gratidão. Mais do que um esporte, o vôlei foi refúgio, força e alegria em momentos desafiadores da minha trajetória acadêmica. Em cada treino ou conversa no intervalo, encontrei apoio, leveza e amizades verdadeiras que fizeram toda diferença.

À Diretoria do Centro de Ciências Agrárias-CCA-UFSCar, pela concessão da bolsa de extensão que permitiu a minha permanência no curso.

Por fim agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, aos docentes do programa e à UFSCar-CCA por todos os ensinamentos.

GRATIDÃO!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
Objetivo geral.....	4
Objetivos específicos.....	4
REVISÃO DA LITERATURA	5
1. Produção de etanol.....	5
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
3. Leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	7
3.1. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	8
3.2. <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	9
3.3. <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	11
LITERATURA CITADA.....	13
CAPÍTULO 1. TOLERÂNCIA AO ESTRESSE DE LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces</i> E <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, TEMPERATURA, GLICOSE E ETANOL	21
1. Resumo	21
2. Introdução	21
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Microrganismos.....	23
3.2 Testes de tolerância ao estresse das linhagens de leveduras.....	24
3.2.1 Ensaio <i>spot</i>	24
3.2.2 Crescimento em microplacas.....	25
4. Resultados e Discussão	26
5. Conclusões.....	37
6. Literatura citada.....	37
CAPÍTULO 2. EFEITO DOS MOSTOS DE CALDO, MELAÇO E MISTO SOBRE O CRESCIMENTO DE LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces</i> E <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
1. Resumo	41
2. Introdução	41
3. Materiais e Métodos	44
3.1 Microrganismos.....	44
3.2 Preparo dos meios de crescimento.....	44
3.3 Preparação dos inóculos das leveduras	44
3.4 Testes de crescimento das leveduras em mostos de cana-de-açúcar	45
3.5 Análises microbiológicas.....	45

3.6 Análises físico-químicas	45
3.7 Cálculo do rendimento em etanol	46
4. Resultados e Discussão	46
5. Conclusões.....	56
6. Literatura citada.....	56
CAPÍTULO 3. DESEMPENHO FERMENTATIVO E VIABILIDADE DE <i>Meyerozyma guilliermondii</i> E <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA SOB BATELADA ALIMENTADA COM RECICLO CELULAR E TRATAMENTO ÁCIDO ...	
1. Resumo	60
2. Introdução	61
3 Materiais e Métodos	62
3.1 Microrganismos.....	62
3.2 Preparo dos inóculos das leveduras e meios	63
3.3 Padronização dos inóculos	63
3.4 Fermentação em batelada com reciclo celular e tratamento das células.....	63
3.5 Análises microbiológicas.....	65
3.6 Análises físico-químicas	65
3.7 Análise estatística	66
4. Resultados e Discussão	67
4.1 Testes fermentativos com a levedura <i>M. guilliermondii</i>	67
4.2 Testes fermentativos com a levedura <i>S. cerevisiae</i> CAT-1	71
4.3 Análise comparativa dos testes fermentativos com <i>M. guilliermondii</i> e <i>S. cerevisiae</i>	76
5. Conclusões.....	82
6. Literatura citada.....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Capítulo 2

Tabela 1. Variação de crescimento (aumento do número de ciclos log ao final de 24 h) e rendimento em etanol (g etanol/g ART) das leveduras <i>S. cerevisiae</i> (linhagens PE-2 e CAT-1) e das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> crescidas em meio de caldo, melaço e misto, a 30 °C, sob agitação, nos períodos de 12 e 24 h de cultivo.....	48
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da levedura <i>M. guilliermondii</i> em melaço de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).....	69
Tabela 2. Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) com melaço de cana da levedura <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em melaço de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Capítulo 1

Figura 1. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras <i>S. cerevisiae</i> (CAT-1 e PE-2) e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD com valores de pH variando de 1,5 até 6,2, a 30°C, 20 g/L de glicose.....	27
Figura 2. Ensaio <i>spot</i> das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD com pH variando de 1,5 até 6,0, nas concentrações de 10 ⁷ células/mL até 10 ⁴ células/mL, a 30 °C, 20 g/L glicose.....	28
Figura 3. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras <i>S. cerevisiae</i> (CAT-1 e PE-2) e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD com etanol nas concentrações de 0% a 14%, a 30 °C, 20 g/L glicose, pH 6,2.....	30
Figura 4. Ensaio <i>spot</i> das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD com etanol nas concentrações de 0% a 14%, em concentrações de 10 ⁷ células/mL até 10 ⁴ células/mL, a 30 °C, 20 g/L glicose, pH 6,2.....	31
Figura 5. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras <i>S. cerevisiae</i> (CAT-1 e PE-2) e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD com glicose nas concentrações de 20 a 600 g/L, a 30 °C, pH 6,2...	32
Figura 6. Ensaio <i>spot</i> das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD com glicose nas concentrações de 20 a 600 g/L, em concentrações de 10 ⁷ células/mL até 10 ⁴ células/mL, a 30 °C, pH 6,2.....	33
Figura 7. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras <i>S. cerevisiae</i> (CAT-1 e PE-2) e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD, 20 g/L glicose, pH 6,2, em temperaturas variando de 30 a 40 °C...	34
Figura 8. Ensaio <i>spot</i> das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e não- <i>Saccharomyces</i> em meio YPD 20 g/L glicose, pH 6,2, em temperaturas variando de 30 a 40 °C, em concentrações de 10 ⁷ células/mL até 10 ⁴ células/mL.....	35
Figura 9. <i>Heatmaps</i> do padrão de crescimento em (A), e com análise de agrupamento hierárquico (distância euclidiana) em (B), das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e não- <i>Saccharomyces</i> submetidas a diferentes condições de estresse (pH, concentração de glicose e etanol, e temperatura). As figuras foram geradas com base nos resultados da velocidade máxima de crescimento (μ_{max}).....	36

Capítulo 2

- Figura 1.** Log do número de células viáveis/mL da levedura *S. cerevisiae* PE-2, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação..... 47
- Figura 2.** Log do número de células viáveis/mL da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação..... 49
- Figura 3.** Log do número de células viáveis/mL da levedura *S. stipitis*, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação..... 51
- Figura 4.** Log do número de células viáveis/mL da levedura *W. anomalus*, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação..... 52
- Figura 5.** Log do número de células viáveis/mL da levedura *M. guilliermondii*, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação..... 54
- Figura 6.** Log do número de células viáveis/mL das leveduras do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação..... 55

Capítulo 3

- Figura 1.** Perfis de desprendimento de CO₂ (mmol/g de biomassa úmida, A) e velocidade de fermentação (mmol CO₂/g de biomassa úmida/h, B) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada em melaço de cana com a levedura *M. guilliermondii*, com (cor preta) e sem tratamento (cor azul) com ácido sulfúrico..... 68

- Figura 2.** Log do número de células/mL (A), viabilidade celular (%), B) e percentual de brotamento (%), C) da levedura *M. guilliermondii* ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com melão de cana, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba..... 69
- Figura 3.** pH final (A), concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL, B), teor alcoólico (g/100 mL, C) e rendimento (g etanol/g açúcar) D) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com melão de cana com a levedura *M. guilliermondii*, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico..... 70
- Figura 4.** Perfis de desprendimento de CO₂ (mmol/g de biomassa úmida, A) e velocidade de fermentação (mmol CO₂/g de biomassa úmida/h, B) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem CAT-1, com (cor preta) e sem tratamento (cor azul) com ácido sulfúrico..... 72
- Figura 5.** Log do número de células/mL (A), viabilidade celular (%), B) e taxa de brotamento (%), C) da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba..... 74
- Figura 6.** pH final (A), concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL, B), teor alcoólico (g/100 mL, C) e rendimento (g etanol/g açúcar) D) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial CAT-1, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico..... 75
- Figura 7.** *Box plot* da velocidade de fermentação (mmol CO₂/g biomassa úmida/h) das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com ciclo celular em melão de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo..... 77
- Figura 8.** *Box plot* do log do número de células viáveis/mL das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com ciclo celular em melão de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo..... 78

Figura 9. *Box plot* do percentual de brotamento (%) das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo..... 78

Figura 10. *Box plot* da viabilidade (%) das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo..... 79

Figura 11. *Box plot* do pH das fermentações conduzidas pelas leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo..... 80

Figura 12. *Box plot* do rendimento (g etanol/g açúcar) das fermentações conduzidas pelas leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo..... 81

LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL EM MOSTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Autor: JUDIELHO DE MORAIS LIMA

Orientador: Prof^a. Dr^a. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

RESUMO

A principal levedura utilizada no processo industrial de produção de etanol é a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, as leveduras não-*Saccharomyces* podem apresentar algumas vantagens, tais como maior adaptação ao ambiente fermentativo e uma maior diversidade genética. A fermentação alcoólica é uma etapa essencial na produção de etanol combustível, onde fatores como composição do mosto, sistema de condução do processo e forma de tratamento do fermento afetam a eficiência do processo. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial de leveduras não-*Saccharomyces* (*Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Scheffersomyces stipitis*) para produção de etanol a partir de mostos de cana-de-açúcar em comparação com linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1). Inicialmente, avaliou-se a tolerância ao estresse (pH, temperatura, concentração de glicose e etanol) das leveduras em microplacas e ensaio *spot*. Houve diferença entre as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2. Entre as não-*Saccharomyces*, *W. anomalus* e *M. guilliermondii* apresentaram perfis de tolerância mais próximos às industriais, sendo *W. anomalus* semelhante à PE-2 e *M. guilliermondii* à CAT-1. Ambas as não-*Saccharomyces* demonstraram características promissoras para o processo fermentativo de etanol frente aos estresses típicos do ambiente industrial. Em seguida, foram avaliados o crescimento e o rendimento em etanol das leveduras em três diferentes mostos derivados da cana-de-açúcar (melaço, caldo, e misto) na concentração de 40 g/L de açúcar redutor total, sob agitação, a 30 °C. O melaço promoveu o aumento no número de células para *S. cerevisiae* e as não-*Saccharomyces*. A linhagem PE-2 teve maior rendimento em etanol em 12 h, com pouca variação entre os meios, enquanto CAT-1 obteve seu melhor rendimento em caldo após 24 h. Para *S. stipitis* e *W. anomalus*, os melhores rendimentos ocorreram em caldo, sendo que *M. guilliermondii* apresentou maior crescimento em melaço, mas com rendimentos semelhantes em meio de caldo e melaço. Considerando o melaço como meio de propagação de células e fermentação, procedeu-se aos testes fermentativos em sistema de batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos) em melaço, avaliando também o efeito do tratamento das células entre os ciclos fermentativos com ácido sulfúrico. Foram selecionadas as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii*, avaliando-se a viabilidade celular e os parâmetros fermentativos. O reciclo celular reduziu a velocidade fermentativa e a viabilidade em ambas as leveduras. Para *M. guilliermondii*, o tratamento ácido diminuiu a viabilidade, mas manteve o rendimento (50% do teórico), indicando tolerância ao estresse ácido e limitação ligada à sua capacidade fermentativa. Já para a *S. cerevisiae* CAT-1, o tratamento ácido aumentou o rendimento, apesar de reduzir a viabilidade e brotamento. A levedura *M. guilliermondii* não se mostrou competitiva com *S. cerevisiae* no tocante ao rendimento fermentativo, embora tenha demonstrado que mesmo diante do tratamento ácido quanto dos reciclos celulares, consegue manter a viabilidade celular em níveis que não impactam o seu rendimento em etanol, ainda que muito inferior ao demonstrado pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1.

Palavras-chave: Estresse, Etanol, *Saccharomyces*, Não-*Saccharomyces*.

NON-*Saccharomyces* YEASTS FOR ETHANOL PRODUCTION IN SUGAR CANE MUSTS

Author: JUDIELDO DE MORAIS LIMA

Adviser: Prof^a. Dr^a. SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI

ABSTRACT

The main yeast used in the industrial ethanol production process is *Saccharomyces cerevisiae*. However, non-*Saccharomyces* yeasts may offer some advantages, such as greater adaptation to the fermentation environment and greater genetic diversity. Alcoholic fermentation is an essential step in fuel ethanol production, where factors such as must composition, process conduction system, and yeast treatment affect process efficiency. Therefore, this study aimed to evaluate the potential of non-*Saccharomyces* yeasts (*Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii*, and *Scheffersomyces stipitis*) for ethanol production from sugarcane musts compared to industrial strains of *S. cerevisiae* (PE-2 and CAT-1). Initially, the stress tolerance (pH, temperature, glucose, and ethanol concentrations) of the yeasts was evaluated in microplates and spot assays. There was a difference between the yeasts *S. cerevisiae* CAT-1 and PE-2. Among the non-*Saccharomyces*, *W. anomalus* and *M. guilliermondii* presented tolerance profiles closer to the industrial ones, with *W. anomalus* being similar to PE-2 and *M. guilliermondii* to CAT-1. Both non-*Saccharomyces* strains demonstrated promising characteristics for the ethanol fermentation process under typical industrial stresses. Next, the growth and ethanol yield of the yeasts were evaluated in three different sugarcane-derived musts (molasses, broth, and mixed) at a concentration of 40 g/L total reducing sugar, under agitation, at 30 °C. Molasses promoted an increase in cell number for *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains. Strain PE-2 had the highest ethanol yield in 12 h, with little variation between media, while CAT-1 achieved its best yield in broth after 24 h. For *S. stipitis* and *W. anomalus*, the best yields occurred in broth, with *M. guilliermondii* showing the highest growth in molasses, but with similar yields in broth and molasses media. Considering molasses as a medium for cell propagation and fermentation, fermentation tests were performed in a fed-batch system with cell recycling (six cycles) in molasses, also evaluating the effect of treating the cells with sulfuric acid between fermentation cycles. The yeasts *S. cerevisiae* CAT-1 and *M. guilliermondii* were selected, and cell viability and fermentation parameters were evaluated. Cell recycling reduced the fermentation rate and viability of both yeasts. For *M. guilliermondii*, acid treatment decreased viability but maintained yield (50% of theoretical), indicating tolerance to acid stress and a limitation related to its fermentation capacity. For *S. cerevisiae* CAT-1, acid treatment increased yield, despite reducing viability and budding. *M. guilliermondii* was not competitive with *S. cerevisiae* in terms of fermentation yield, although it demonstrated that even with acid treatment and cell recycling, it can maintain cell viability at levels that do not impact its ethanol yield, although much lower than that demonstrated by *S. cerevisiae* CAT-1.

Key-words: Stress, Ethanol, *Saccharomyces*, Non-*Saccharomyces*.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética e as preocupações associadas ao uso de combustíveis fósseis fizeram com que houvesse um estímulo para o desenvolvimento de combustíveis renováveis. Dentre os biocombustíveis, o etanol de cana-de-açúcar, com o avanço das tecnologias, tem se destacado como biocombustível de referência na matriz energética mundial (Eliodório *et al.*, 2019).

Os Estados Unidos lideram a produção mundial de etanol, o qual é produzido a partir do amido de milho (Hawaz *et al.*, 2022). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, com produção de 36,07 bilhões de litros, sendo 13,89 bilhões de litros de etanol anidro e 22,18 bilhões de litros de etanol hidratado na safra 2024/2025, a partir da cana-de-açúcar (Conab, 2025).

O etanol é produzido principalmente pela fermentação de substâncias açucaradas, e dependendo de sua concentração e de suas impurezas, pode ser utilizado em diversos segmentos, como em indústrias farmacêuticas, de bebidas e de automóveis (Santos *et al.*, 2021). É um líquido incolor, inflamável, de odor característico, produzido pela fermentação de açúcar, amido, hemicelulose e materiais lignocelulósicos, de culturas como a cana-de-açúcar, beterraba e sorgo doce (Moreira *et al.*, 2015). Segundo Pereira *et al.* (2019), o etanol produzido por meio da cana-de-açúcar desempenha um papel fundamental no setor de biocombustíveis, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa e promovendo a sustentabilidade energética.

De modo geral, o processo de produção de etanol é formado por uma sequência de operações, as quais envolvem o preparo do mosto, a etapa de fermentação e a destilação. Nas usinas, essas operações geralmente envolvem o processo de recuperação das leveduras, em que as células são separadas do vinho fermentado por centrifugação e tratadas com ácido sulfúrico ou antibiótico. No entanto, essas práticas podem intensificar as condições de estresse das leveduras, como alto teor alcoólico, alta pressão osmótica, baixo pH e altas temperaturas (Amorim *et al.*, 2016; Basso; Basso; Rocha, 2011).

O principal gênero de levedura utilizado em diversos processos industriais é *Saccharomyces*, devido a sua capacidade metabólica e sua vasta diversidade genética, que possibilita tanto a sua utilização na forma de células como de seus metabólitos em processos biotecnológicos. No Brasil, a espécie que apresenta a

melhor adaptação às condições industriais para a fermentação etanólica é *Saccharomyces cerevisiae* (Cerqueira Leite *et al.*, 2009; Cinelli, 2012; Coutinho, 2013).

Segundo Andrietta *et al.* (2007), a levedura *S.cerevisiae* apresenta alta eficiência fermentativa e de metabolização de açúcares, crescimento rápido, habilidade na produção de etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, tolerância a grandes variações de temperatura, e atividade celular em ambientes ácidos, características que são fundamentais em processos industriais (Andrietta *et al.*, 2007; Dien; Cotta; Jeffries, 2003).

A escolha da linhagem apropriada de levedura é um dos passos importantes para assegurar o êxito da fermentação e a produção de etanol, uma vez que uma levedura com alto desempenho fermentativo pode vir a colaborar com o desenvolvimento tecnológico na medida em que pode possuir potencial para a produção de outras biomoléculas (Romo Sánchez *et al.*, 2010).

Analisando a capacidade fermentativa dos morfotipos de leveduras selvagens isoladas do caldo da cana, Barbosa *et al.* (2021) observaram que havia diferença entre os isolados analisados, e que 6 dos 17 isolados apresentaram capacidade fermentativa. A busca de novos isolados, ou leveduras selecionadas/personalizadas pode ser uma alternativa segura e viável para aumentar o número de linhagens de leveduras que apresentem eficiência fermentativa com alto potencial para a produção de etanol.

Embora a espécie *S. cerevisiae* seja a única utilizada atualmente na produção de etanol a partir de mostos de cana-de-açúcar (melaço e caldo de cana), conhecido como etanol de primeira geração (1G), as leveduras não-*Saccharomyces* podem apresentar algumas vantagens em relação à espécie *S. cerevisiae*, como maior adaptação ao ambiente local e maior diversidade genética, o que pode resultar em uma melhor eficiência da fermentação (Almeida; Nascimento, 2021; Molinet; Cubillos, 2020).

Dentre as principais espécies de leveduras reconhecidas nesse contexto, destacam-se *Pichia stipitis*, *Pichia anomala*, *Candida shehatae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pachysolen tannophilus* e *Spathaspora arborariae*, especialmente na utilização de biomassa celulósica visando a produção de etanol de segunda geração-2G (Menezes; Castro; Rocha, 2022; Perna, 2023).

A espécie *Scheffersomyces stipitis* (anteriormente denominada *Pichia stipitis*)

apresenta grande potencial para a fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica, entretanto deve-se considerar vários fatores como tipo de substrato e concentração de açúcares, pH e aeração (Yucel; Aksu, 2015). É um dos poucos microrganismos de ocorrência natural que tem a capacidade de fermentar açúcares como glicose, xilose, manose, galactose e celobiose, com alta produtividade de etanol. Devido a essas características, essa espécie de levedura é amplamente estudada para utilização em processos de produção de etanol 2G (Ruyters, 2015).

Outra espécie de levedura não-*Saccharomyces* que possui capacidade de metabolizar uma vasta gama de açúcares como hexoses, pentoses, dissacarídeos, polissacarídeos, bem como alguns álcoois, ácidos orgânicos, ácidos graxos e hidrocarbonetos aromáticos é *Wickerhamomyces anomalus* (Walker, 2011), anteriormente denominada *Pichia anomala*.

Levedura não convencional amplamente difundida no meio ambiente, a espécie *M. guilliermondii* apresenta características de interesse para a biotecnologia, como produção de riboflavina, etanol, enzimas industriais, metabólitos e xilitol (Papon *et al.*, 2013), além da biodegradação de micotoxinas e uso no controle biológico (Fu *et al.*, 2021; Knob *et al.*, 2020). Essa levedura apresenta ainda capacidade de assimilar e fermentar um amplo espectro de substratos, bem como capacidade de sintetizar numerosos produtos químicos.

Portanto, ampliar os estudos sobre leveduras não-*Saccharomyces* é estratégico, pois sua diversidade genética, adaptação a diferentes condições e capacidade de metabolizar variados açúcares podem otimizar a fermentação, viabilizar a produção de etanol e fortalecer a sustentabilidade da matriz energética.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial de leveduras não-*Saccharomyces* em mostos de cana-de-açúcar para produção de etanol em comparação com linhagens de *S. cerevisiae* industriais.

Objetivos específicos

- Avaliar a resposta ao estresse (concentração de açúcar, temperatura, pH, etanol) de três leveduras não-*Saccharomyces* (*W. anomalus*, *M. guilliermondii* e *S. stipitis*) em comparação com duas linhagens de *S. cerevisiae* industriais (PE-2, CAT-1);
- Avaliar o crescimento e o rendimento em etanol das leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* em meio de caldo de cana-de-açúcar, melaço e misto (caldo e melaço 1:1);
- Avaliar o desempenho fermentativo e viabilidade das leveduras *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae* CAT-1 em processo em batelada alimentada em melaço com reciclo celular com e sem tratamento ácido.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Produção de etanol

O etanol 1G é obtido a partir da fermentação alcoólica dos açúcares hexoses (C6) provenientes de culturas como a cana-de-açúcar, o milho e outros grãos. Os Estados Unidos são responsáveis por 54,3% do volume global na produção desse biocombustível, obtido a partir da hidrólise do amido, seguido do Brasil, que contribui com 29,5% da produção total, obtido a partir dos açúcares da cana-de-açúcar (Silva; Mascarinha; Batistote, 2023).

Conforme relatado por Câmara e Guimarães (2024), a produção anual de etanol nas usinas brasileiras varia de acordo com a demanda do mercado, significando um aumento na destinação do caldo para a fabricação do açúcar quando a remuneração deste produto no mercado internacional é mais vantajosa. Dessa forma, para atender as demandas da sociedade, tornam-se necessários estudos que aumentem a eficiência do processo de fermentação alcoólica, garantindo volumes maiores deste combustível de interesse.

A procura por alternativas energéticas menos poluentes aumenta a importância e a demanda comercial pelos biocombustíveis, com foco notável para a produção de etanol (Ribeiro; Schirmer, 2017). O etanol que é produzido a partir da cana, por sua natureza biorrenovável, torna-se uma alternativa importante no contexto dos combustíveis (Cruz *et al.*, 2014).

O processo de produção do etanol na indústria consiste em etapas, em que o caldo é extraído da cana-de-açúcar e filtrado em peneiras para a retirada de impurezas advindas do campo, e posteriormente, esse caldo segue por bombeamento até os aquecedores, com temperatura elevada para 105°C (Dias *et al.*, 2015). Após essa etapa é adicionado leite de cal (suspensão de hidróxido de cálcio em água) para correção do pH na faixa entre 5,8 e 6,2, e segue para a etapa de decantação, em que são adicionados polímeros que aceleram a sedimentação das impurezas, causando aglomeração na forma de flocos, em seguida esse líquido é filtrado, originando o caldo clarificado e a torta de filtro (Castro *et al.*, 2019).

O caldo clarificado é resfriado em trocadores de calor de placas até a temperatura de 30°C, que pode ser combinado com o melaço na etapa de preparação do mosto, o qual apresenta uma concentração de açúcares entre 18% e

22%. O mosto é transferido para as dornas, onde é misturado com a levedura, dando início ao processo de fermentação alcoólica, que geralmente dura de 8 a 12 horas (De Souza *et al.*, 2015). O resultado desta fermentação é o vinho levedurado, que possui um teor alcoólico que varia de 7% a 12% em volume e contém, em média, de 10% a 12% de células de levedura.

O vinho obtido é centrifugado e direcionado ao setor de destilação, cujo objetivo é separar o etanol da mistura hidroalcoólica. Em seguida, o centrifugado de levedura, que possui concentração superior a 65%, passa por tratamento ácido em cubas e retorna ao processo para dar início ao novo ciclo (Câmara; Guimarães, 2024). Esses autores ressaltam a importância da qualidade da matéria-prima, o preparo adequado do mosto, a manutenção do processo fermentativo sob condições controladas e o tratamento das leveduras, sendo estes fatores determinantes para maximizar a conversão dos açúcares em energia e etanol. Outro aspecto importante a ser considerado é a adaptação das leveduras ao processo (Ceccato-Antonini, 2018).

Os fatores que podem influenciar na capacidade fermentativa das leveduras têm sido cada vez mais estudados, a fim de evitar a baixa eficiência do processo, sendo que os principais parâmetros analisados são temperatura, pH, contaminação pela presença de outros microrganismos, tempo de fermentação e teor alcoólico (Cruz, 2021). Oliveira *et al.* (2020) relatam que esses fatores podem ser monitorados através de análises laboratoriais e atividades realizadas na operação, favorecendo a redução de perdas industriais e auxiliando na manutenção da qualidade do processo.

Os trabalhos e pesquisas desenvolvidos na seleção e adaptação de cepas de levedura são fundamentais para atender às necessidades específicas dos processos industriais, melhorando não só a eficiência e o rendimento da produção, mas também contribui para a sustentabilidade da indústria (Câmara; Guimarães, 2024).

2. *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras *S. cerevisiae* são as mais utilizadas no mundo para a produção de etanol em escala industrial e em uma série de outros processos biotecnológicos, como, por exemplo, a fabricação de pão e a produção de bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho (Behera *et al.*, 2010; Hirasawa *et al.*, 2010; Lin; Tanaka, 2006). São

tradicionalmente utilizadas devido à sua alta produção e sua resistência ao etanol, são tolerantes a baixos valores de pH e oxigênio e altas concentrações de açúcares (Lima *et al.*, 2001).

Dentre as vantagens de utilizar *S. cerevisiae*, destacam-se a sua tolerância aos compostos formados durante a fermentação, que podem causar inibição a alguns microrganismos, e à capacidade de suportar concentrações mais elevadas de etanol. Enquanto a maioria das leveduras fermentativas deixa de crescer ou de fermentar a partir de 6% (v/v), *S. cerevisiae* produz etanol em concentrações de até 17% (v/v) ou superior, mantendo ainda a viabilidade celular (Santos *et al.*, 2010).

As linhagens industriais de grande importância para a produção de etanol no Brasil são PE-2 (Usina da Pedra), CAT-1 (Usina Catanduva), FT858L e Fermel (Fermentec), BG-1 (Usina Barra Grande) e SA-1 (Usina Santa Adélia). A complexidade do genoma das linhagens industriais representa uma nova oportunidade para selecionar variantes com combinações infinitas de genes em diferentes processos de fermentação (Lopes *et al.*, 2016).

3. Leveduras não-*Saccharomyces*

Em processos de fermentação industriais, as populações microbianas costumam ser bastante dinâmicas, constituídas de bactérias contaminantes e de leveduras selvagens e/ou nativas (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*), ou seja, aquelas não inoculadas no processo. Durante a produção de etanol pode ocorrer a substituição da levedura do processo por leveduras nativas, tanto de linhagens da própria espécie como de outras espécies. Isso porque o processo de batelada alimentada com o reciclo de células favorece a proliferação de alguns gêneros contaminantes, e a reciclagem de células exerce uma pressão seletiva, levando à cepas com maior tolerância às condições estressantes da fermentação (Basso *et al.*, 2008; Ceccato-Antonini, 2010; Oliva-Neto; Yokoya, 1994).

No Brasil, o processo fermentativo exige leveduras resistentes a tratamento ácido, reciclagem celular, altas temperaturas e estresse osmótico. Originalmente, leveduras de panificação eram usadas, mas estas foram substituídas por cepas selvagens de *S. cerevisiae* ao longo de uma safra. Cepas selvagens de *S. cerevisiae*, como SA-1, BG-1, CAT-1, VR-1 e PE-2, adaptadas em destilarias de cana-de-açúcar, tornaram-se predominantes devido à sua robustez (Fernandes *et al.*, 2020).

Estudos filogenéticos indicam origem comum entre essas cepas e as utilizadas na produção de cachaça, sugerindo sua pré-adaptação à fermentação alcoólica. Evidências indicam que as leveduras atualmente empregadas na produção de bioetanol de cana-de-açúcar possivelmente derivam de cepas adaptadas à fermentação. No entanto, leveduras selvagens ainda podem colonizar o sistema e, devido ao seu rápido crescimento, tornam-se predominantes ao longo dos ciclos de reciclagem. (Jacobus *et al.*, 2021; Rego-Costa *et al.*, 2023).

As leveduras não-*Saccharomyces* são estudadas e aplicadas em diferentes setores industriais, como pesquisas biomédicas, produção heteróloga de proteínas, produção de fármacos, biorremediação, vacinas, entre outros (Johnson, 2013), destacando-se dentre elas as espécies *S. stipitis*, *M. guilliermondii* e *W. anomalus*, cujas principais características descritas a seguir as tornam interessantes para serem avaliadas no contexto do etanol 1G, ou seja, para fermentação de mostos de cana-de-açúcar.

3.1. *Scheffersomyces stipitis*

Dentre os microrganismos fermentadores de pentoses, *S. stipitis* é uma levedura predominantemente haploide, relacionada à *Candida shehatae* e a outras espécies de leveduras do Phylum Ascomycota (Kurtzman, 1990). Apresenta característica de fermentar xilose e hexoses a etanol a partir do hidrolisado da biomassa lignocelulósica, sendo condições como pH, temperatura, oxigênio, agitação e composição do meio fatores importantes no processo de bioconversão (Agbogbo *et al.*, 2008).

Em geral, a fermentação costuma ser lenta e de baixo rendimento, fator este que pode estar relacionado à baixa resistência a altas concentrações de etanol, além de gerar vários co-produtos (Ruyters, 2015). Diferente de *S. cerevisiae* que é capaz de produzir etanol em meios com baixas concentrações de açúcares, sob condições aeróbias, *S. stipitis* é uma levedura do trato respiratório que produz etanol em resposta à limitação de oxigênio (Kinner *et al.*, 2005).

No contexto do etanol 2G, *S. stipitis* é uma levedura interessante devido a sua capacidade de fermentar glicose, xilose, manose, galactose e celbiose, que são açúcares já presentes na biomassa lignocelulósica sacarificada (Ruyters, 2015). No entanto, há necessidade de selecionar linhagens de leveduras que

sejam termotolerantes, tolerantes ao etanol, resistentes aos inibidores liberados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico e capazes de utilizar um amplo espectro de substratos, com alto rendimento em etanol (Gutierrez-Rivera *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2019).

De acordo com Hughes *et al.* (2012), quando cultivadas em meio contendo xilose, *S. stipitis* (NRRL Y-7124) e *Spathaspora passalidarum* (NRRL Y-27907) apresentam maior produção de etanol em comparação ao crescimento em glicose, no entanto o rendimento celular é baixo. Biazi *et al.* (2022), aplicaram uma estratégia de adaptação para a linhagem de *S. stipitis* NRRL Y-7124 e observaram um aumento da tolerância ao ácido acético, o mais importante inibidor do hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar. Estudos recentes destacam a capacidade dessa linhagem em fermentar xilose de maneira eficiente em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, alcançando rendimentos próximos de 0,49 g de etanol por g de xilose, com produtividade de até 0,17 g/L.h (Bolzico *et al.*, 2024). A linhagem NRRL Y-7124 de *S. stipitis* foi selecionada para o presente trabalho, com o objetivo de avaliar seu desempenho em mostos de cana-de-açúcar para produção de etanol 1G.

3.2. *Wickerhamomyces anomalus*

A levedura *W. anomalus* já foi isolada de muitos habitats diferentes e mostra uma notável robustez fisiológica a estresses como pH extremo e baixa atividade de água (Kuchen *et al.*, 2023). Esta levedura pode ser encontrada amplamente no ambiente natural, como solo, superfícies de frutas e vegetais, poluentes industriais, corpo humano e até mesmo no mosquito da malária (Ceccarini *et al.*, 2019). Segundo Passoth *et al.* (2011), quando comparada com outras espécies de levedura, *W. anomalus* é altamente competitiva em termos de crescimento e pode também inibir o crescimento celular de outros microrganismos.

Essa espécie apresenta capacidade de multiplicação em situações de estresse como ausência de oxigênio, ampla faixa de temperatura (entre 3 - 37 °C) condições extremas de pH (2,0 – 12,4), além de algumas cepas tolerarem concentrações de etanol até 12,5% (v/v) (Padilla; Gil; Manzanares, 2018). Seu metabolismo central de carbono é regulado pela disponibilidade de oxigênio e não pela concentração de glicose, aumentando assim a velocidade da oxidação de açúcares pela via glicolítica sob restrição de oxigênio (Passoth *et al.*, 2006; Walker,

2011).

Devido às suas características fisiológicas e metabólicas distintas, *W. anomalus* é conhecida por sua adaptabilidade a condições ambientais adversas, incluindo estresse oxidativo e osmótico, mudanças de pH e diferentes condições de temperatura, permitindo o seu uso em uma variedade de aplicações industriais (Ceccarini *et al.*, 2019; Fredlund *et al.*, 2002), incluindo aplicações em alimentos e bebidas (como probióticos, fermentações de massas, aromas voláteis em vinho), biorremediação ambiental (produção de biossurfactantes), biofármacos (produção de ácido aminobutírico) e biocombustíveis (produção de etanol e isobutanol) (Sehnm *et al.*, 2017; Walker, 2011).

Padilla, Gil e Manzanares (2018) relataram que *W. anomalus* contribui positivamente na fermentação de vinhos e agrega características únicas de aroma e sabor amadeirado. Essas leveduras também apresentam potencial de redução do teor alcoólico final e o controle de microrganismos deteriorantes. Segundo Sehnm *et al.* (2020), essa espécie é capaz de produzir etanol a partir de hidrolisados ácidos diluídos, mesmo na presença de compostos inibidores como furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Avaliando a viabilidade da fermentação etanólica por diferentes leveduras a partir de hidrolisados hemicelulósicos, Codato-Zumpano (2022) observou que para uma linhagem de *W. anomalus* isolada de madeira em decomposição (linhagem T1), a velocidade específica máxima de crescimento foi maior quando comparada com *S. cerevisiae*. No mesmo estudo foi observado que essa linhagem demonstrou capacidade de crescimento na presença de diferentes carboidratos tais como glicose, xilose, arabinose e celobiose. Mostrou-se também tolerante a até 5% de etanol e a concentrações de até 1,2% de ácido acético. A linhagem T1 de *W. anomalus* foi selecionada para o presente trabalho, com o objetivo de avaliar seu desempenho em mostos de cana-de-açúcar para produção de etanol 1G.

Estudando leveduras isoladas de madeira em decomposição, Souza (2015), observou que das oito leveduras isoladas, foram selecionadas duas linhagens (T1 e R2) que apresentaram maior produção de etanol a partir de glicose, xilose e arabinose em meio sintético. A mesma observou que, em meio sintético com mistura de pentose e glicose e em hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar, as linhagens T1 e R2 produziram menos etanol quando comparadas com a linhagem

311 (*M. guilliermondii*). Dentre as leveduras isoladas, a linhagem T1 foi a que apresentou resultados mais próximos à levedura de comparação.

3.3. *Meyerozyma guilliermondii*

M. guilliermondii é uma levedura ascomicética conhecida como *Pichia guilliermondii* até 2010 (Kurtzman; Suzuki, 2010). Apresenta semelhanças com outras leveduras do gênero *Candida*, destacando-se pela sua ampla capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e de crescer em condições adversas, o que confere a esta espécie propriedades bioquímicas únicas (Maguire *et al.*, 2013).

Essa levedura vem sendo bastante utilizada na produção de etanol a partir de material lignocelulósico e outros resíduos agroindustriais (Martini *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2020). Uma das características interessantes dessa espécie é a capacidade de resistir aos principais inibidores que podem ser encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, como o ácido acético, e crescer mesmo em concentrações elevadas de HMF e furfural, sendo esta uma característica de resistência desejada para microrganismos que podem ser aplicados em processos de bioconversão industrial (Perna; Bastos; Ceccato-Antonini, 2018).

Matos *et al.* (2014) avaliaram o potencial biotecnológico de uma linhagem de *M. guilliermondii* isolada de cupins da Amazônia utilizando hidrolisado de bagaço de cana. Os autores observaram que essa levedura apresentou capacidade de crescer em D-xilose, termotolerância e sacarificação do substrato, além da neutralização do pH do meio. De acordo com Agbogbo *et al.* (2006), diversas leveduras são capazes de fermentar hexoses, mas apenas algumas espécies podem produzir etanol a partir de D-xilose com viabilidade econômica comparável à fermentação de hexose. A levedura *M. guilliermondii* tem sido objeto de pesquisas com a finalidade principalmente de produção de etanol e xilitol a partir de resíduos vegetais de diversas origens agroindustriais.

Estudando uma linhagem de *M. guilliermondii* CCT7783 isolada de caldo de cana-de-açúcar, Martini *et al.* (2016) observaram a redução da concentração de ácido acético e a fermentação de pentoses em meios sintéticos e hidrolisado de bagaço em pH 5,5. Observaram também que a detoxificação do hidrolisado e a suplementação com extrato de levedura aumentaram a produção de biomassa, também favorecendo maiores produções de etanol e xilitol. A xilose foi consumida

preferencialmente, seguida da arabinose após esgotamento da glicose, evidenciando o potencial da linhagem para a fermentação de pentoses em processos de etanol 2G. A linhagem CCT7783 de *M. guilliermondii* foi selecionada para o presente trabalho, com o objetivo de avaliar seu desempenho em mostos de cana-de-açúcar para produção de etanol 1G.

A exploração de novas linhagens de leveduras permite potencializar características benéficas e minimizar limitações, contudo, estudos adicionais são necessários para avaliar a viabilidade de celular dessas linhagens em diferentes tipos de mostos, considerando a dinâmica e o comportamento dessas espécies durante a fermentação.

LITERATURA CITADA

- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 2333-2336, 2006.
- ALMEIDA, C. S.; NASCIMENTO, D. D.. Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 11, n. 1, p. 99-119, 2021.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- BARBOSA, P. M. G.; SANTOS, M. S. M.; SANTOS, E. G.; BATISTOTE, M.; LEITE, R. S. R. Leveduras selvagens isoladas do caldo com perfil para a produção de enzimas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 2, p. 1-8, 2019.
- BASSO L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L.; Yeast selection for fuel ethanol production *in* Brazil. **FEMS Yeast Reserach**, v. 8, p. 1155–116, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M. A. **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croatia: Intech, 2011, p. 85-100.
- BEHERA, S.; KAR, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Comparative study of bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar ágar and Ca-alginate matrices. **Applied Energy**, v. 87, p. 96-100, 2010.
- BIAZI, L. E. *et al.* Adaptation strategy to increase the tolerance of *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 to inhibitors of sugacane bagasse hemicelulosic hydrolysate throlyate through comparative studies of proteomics and fermentation. **BioEnergy Research**, v. 15 , p. 479–492, 2022.

- BOLZICO, B. C *et al.* Exploring xylose metabolism in non-conventional yeasts: kinetic characterization and product accumulation under different aeration conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 51, Kuae023, 2024.
- CÂMARA, C. N.; GUIMARÃES, C. C. Fermentação alcoólica: um estudo de caso sobre as ações adotadas para a otimização deste processo. **Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 1, e16102, 2024.
- CASTRO, R. E. N. de et al. Assessment of sugarcane-based ethanol production. *In*: BASSO, T. P.; BASSO, L. C. (org.). **Fuel ethanol production from sugarcane**. [S. l.]: INTECHopen, 2019. p. 3–22.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. Coleção UAB-UFSCar, 2010. 105 p.
- CERQUEIRA LEITE, R. C.; LEAL, M. R.; CORTEZ, I. A.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?. **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.
- CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- CODATO-ZUMPANO, C. B. C. **Fermentação etanólica de hidrolisados ácidos e extratos de cultivo em estado sólido a partir de material lignocelulósico**. 2022. 139 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Cana-de-açúcar tem produção estimada em 663,4,2 milhões de toneladas na safra de 2025/26. Disponível em: <<https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cana-de-acucar/arquivos-boletins/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acessado em: 09 Agosto 2025.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2018.

- COUTINHO, F. S.; MARQUEZ, D. R.; DIAS, D. S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A.; GONÇALVES, D. B.; GALDINO, A. S. Cassava starch-degrading profile of *Saccharomyces cerevisiae* expressing an amylase from *Cryptococcus flavus*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 15-21, 2013.
- CRUZ, H. R. **Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1**. 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.
- CRUZ, M. L.; RAMINHO, M. L. F.; CASTRO, A. L. M.; GUIDINI, C. Z.; RESENDE, M. M. de; RIBEIRO, E. J. Estudo da influência da temperatura na resistência ao etanol da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904. *In*: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20., Centro Sul, Florianópolis - SC. Processos Biotecnológicos. v. 1, n. 2, 2014. p. 2260-2265.
- DE SOUZA, C. C. **Isolamento de leveduras de madeira em decomposição para fermentação de pentoses**. Monografia (Graduação). 34p. Araras, 2015.
- DE SOUZA, R. B. et al. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209–222, 2015.
- DIAS, M. O. S et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.
- DIEN, B.; COTTA, M.; JEFFRIES, T. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 258–266, 2003.
- ELIODÓRIO, K. P.; CUNHA, G. C. G.; MULLER, C.; LUCARONI, A. C.; GIUDICI, R.; WALKER, G. M.; ALVES Jr., S. L.; BASSO, T. O. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. **Advances in Applied Microbiology**, v. 109, p. 61–119, 2019.
- FERNANDES, A. M. O.; GARCIA, N. F. L.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R.; PAZ, M. F. Evaluation of the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and BB9 strains and *Pichia kudriavzevii* BB2 at simulated industrial conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 494–504, 2020.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINDSTEN, K. J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 395-402, 2002.

- FU, Y.; YANG, Q.; SOLAIRAJ, D.; GODANA, E. A.; ROUTLEDGE, M. N.; ZHANG, H. Biodegradation of mycotoxin patulin by the yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biological Control**, v. 160, 104692, 2021.
- GUTIÉRREZ-RIVERA, B.; WALISZEWSKI-KUBIAK, K.; CARVAJAL-ZARRABAL, O.; AGUILAR USCANGA, M. G. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 263–270, 2012.
- HAWAZ, E.; TAFESSE, M.; TESFAY, A.; BEYENE, D.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DEGEFE, A.; DEGU, S.; GROENEWALTH, M.; MULETA, D. Isolation and characterization of bioethanol producing wild yeasts from bio-wastes and co-products of sugar factories. **Annals of Microbiology**, v. 72, n. 39, p. 1-16, 2022.
- HIRASAWA, T. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 391-400. 2010.
- HU, Y.; PIAO, C.; CHEN, Y.; ZHOU, Y.; WANG, D.; YU, H.; XU, B. Soybean residue (okara) fermentation with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Food Bioscience**, v. 31, 100439. 2019.
- HUGHES, S. R. *et al.* Random UV-C mutagenesis of *Scheffersomyces* (formerly *Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 to improve anaerobic growth on lignocellulosic sugars. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 163-173, 1 jan. 2012.
- JACOBUS A. P. *et al.* A genômica comparativa sustenta que o bioetanol brasileiro *Saccharomyces cerevisiae* compõe um grupo unificado de cepas domesticadas relacionadas às leveduras de aguardente de cachaça. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, n. 644089, 2021.
- JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts - The ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 503–517, 2013.
- KLINNER, U.; FLUTHGRAF, S.; FREESE, S.; PASSOT, V. Aerobic induction of respirefermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory

- yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 247-253, 2005.
- KNOB, A.; IZIDRO, S. C.; LACERDA, L. T.; RODRIGUES, A.; DE LIMA, V. A. A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii* : efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, 101565, 2020.
- KREGIEL, D.; PAWLIKOWSKA, E.; ANTOLAK, H. Non-conventional yeasts in fermentation processes: potentialities and limitations. *In*: LUCAS, C.; PAIS, C. (Ed.) **Old yeasts - new questions**. Croatia: Intech, 2017, p. 87-116.
- KUCHEN, B.; PAROLDI, E. H.; AZCONA, M. S.; GROFF, M. C.; PERA, L.; VAZQUEZ, F. Evaluation of the application of *Wickerhamomyces anomalus* supernatant for the control of relevant spoilage yeasts in wines. **OENO One**, v. 57, p. 279-288, 2023.
- KURTZMAN, C. P. *Candida shehatae* – genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 57, p. 215-222, 1990.
- KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2–14, 2010.
- LIMA, U. de A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. *In*: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (org). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. v. 3, p. 1-43, 2001.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006.
- LOPES, L.; PAULILLO, S. C. DE. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIN NETO, H. B.; AMORIN, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.
- MAGUIRE, S. L. et al. Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 6, p. 1281–1291, 2013.

- MARTINI, C. *et al.* A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 1–9, 2016.
- MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; MEDEIROS GALVÃO, R. S.; NUNES-SILVA, C. G.; ASTOLFI FILHO, S. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with Amazonian termites able to ferment D-xylose. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 260-266, 2014.
- MENEZES, L. H. Q.; CASTRO, R. B. R.; ROCHA, E. M. F. Identificação de leveduras selvagens de um fermento de levedura industrial durante a produção de etanol – um biocombustível renovável. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 5260- 5267, 2022.
- MOLINET, J.; CUBILLOS, F. A. Wild yeast for the future: exploring the use of wild strains for wine and beer fermentation. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 1–8, 2020.
- MOREIRA, C. S.; SANTOS, M. do S. M.; BAROOPS, N. S.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTA, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 4, p. 55-63, 2015.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 697-699, 1994.
- OLIVEIRA, G. M.; SILVA, T. F.; NETO, J. I. H. T. Estudo dos impactos provocados por microrganismos no rendimento da fermentação alcoólica. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 30434-30448, 2020.
- PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking. **Fermentation**, Basel, v. 4, n. 3, art. 68, 2018.
- PAPON, N.; SAVINI, V.; LANOUE, A.; SIMIKIN, A. J.; CRECHE, J.; GIGLIOLI-GUIVARCH, N.; CLASTRE. M.; COURDAVAULT, V.; SIBIRNY, A. A. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 73-90, 2013.

- PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. A.; SCHNURER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 3–13, 2006.
- PASSOTH, V.; OLSTORPE, M.; SCHNURER J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p.121-125. 2011.
- PEREIRA, I. Z.; SANTOS, I. F. S.; CASTRO e SILVA, H. L. de; BARROS, R. M. Uma breve revisão sobre a indústria sucroalcooleira no Brasil com enfoque no potencial de geração de energia. **Revista Brasileira de Energia**, v. 25, n. 2, p.111-130, 2019.
- PERNA, M. S. C. **Avaliação da produção de etanol 2G, xilitol e biomassa celular em meios sintéticos e hidrolisados lignocelulósicos pela levedura *Meyerozyma guilliermondii***. 2023. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, 2023.
- PERNA, M. S. C.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **3 Biotech**, v. 8, 119, 2018.
- REGO-COSTA A. *et al.* Yeast population dynamics in Brazilian bioethanol production. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 13, n. 7, artigo jkad104, 2023.
- RIBEIRO, C. B.; SCHIRMER, W. N. Panorama dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil e as emissões gasosas decorrentes do uso da gasolina/etanol. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 16-22, 2017.
- ROMO-SÁNCHEZ, S.; ALVES-BAFFI, H.; ARÉVALO-VILLENA, H.; UBEDA-IRANZO, J.; BRIONES-PÉREZ, U. M. A. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. **Food Microbiology**, v. 27, p. 487-492, 2010.
- RUYTERS, S.; MUKHERJEE, V.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M.; WILLEMS, K. A.; LIEVENS, B. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, p. 39–48, 2015.
- SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. p. 92.

- Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.
- SANTOS, M. C. S.; ALBUQUERQUE, A. A.; SOLETTI, J. I.; MENEGHETTI, S. M. P. Principais tecnologias para produção de etanol anidro no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 6, p. 1228-1240, 2021.
- SEHNEM, N. T.; HICKERT, L. R.; DA CUNHA-PEREIRA, F.; DE MORAIS, M. A. & AYUB, M. A. Z. Bioconversion of soybean and rice hull hydrolysates into ethanol and xylitol by furaldehyde-tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, and their co-fermentations. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 7, p. 199-206, 2017.
- SEHNEM, N. T.; MACHADO, A. S.; MATTE, C. R.; de MORAIS-JUNIOR, M.; AYUB, M. A. Second-generation ethanol production by *Wickerhamomyces anomalus* strain adapted to furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), and high osmotic pressure. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 92 (suppl 2) 2020.
- SILVA, R. F.; MASCARENHA, M. do S.; BATSTOTE, MARGARETH. Technological Advances in Ethanol Production: The Role of Sugarcane, Corn and Yeast Lineages. **Revista CEREUS**. v. 15, n. 4, 2023.
- WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25–34, 2011.
- YUCEL, H. G.; AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. **Fuel**, v. 158, p. 793- 799, 2015.

APÍTULO 1. TOLERÂNCIA AO ESTRESSE DE LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* E *Saccharomyces cerevisiae* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, TEMPERATURA, GLICOSE E ETANOL

1. Resumo

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar desempenha um papel fundamental no setor de biocombustíveis, contribuindo para a redução das emissões de gases e promovendo a sustentabilidade energética. A principal levedura utilizada nesse processo industrial é a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, as leveduras não-*Saccharomyces* podem apresentar algumas vantagens, como maior adaptação ao ambiente fermentativo e uma maior diversidade genética, resultando em uma melhor eficiência da fermentação. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância ao estresse de leveduras não-*Saccharomyces* (*Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Scheffersomyces stipitis*) quanto ao pH, temperatura, concentração de glicose e etanol em comparação com linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) extensivamente utilizadas na produção de bioetanol industrial. Os testes de tolerância foram realizados em microplacas e ensaio *spot*, avaliando diferentes condições: pH (6,2; 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5, 2,0 e 1,5), etanol (0; 4; 6; 8; 10; 12 e 14% v/v), glicose (100, 200, 300, 400, 500 e 600 g/L) e temperatura (30, 36 e 40°C). Entre as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 foram identificadas diferenças no perfil de tolerância aos estresses de pH, temperatura, glicose e etanol. Dentre as leveduras não-*Saccharomyces*, aquelas que apresentaram maior similaridade com as leveduras industriais quanto à tolerância aos estresses de pH, etanol, glicose e temperatura, foram as espécies *W. anomalus* e *M. guilliermondii*. Considerando-se que há diferença entre as linhagens industriais quanto à tolerância, *W. anomalus* foi mais semelhante à PE-2 enquanto *M. guilliermondii* assemelhou-se mais à CAT-1. De qualquer forma, são linhagens de espécies com características muito apropriadas para o processo fermentativo para produção de etanol 1G, no sentido de tolerarem ambiente ácido, variação de temperatura, altas concentrações de glicose e etanol, condições comumente encontradas no ambiente industrial.

Palavra-chave: Estresse, Etanol, *Saccharomyces*, Não-*Saccharomyces*.

2. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é a principal matéria-prima utilizada na produção de etanol no Brasil, destacando-se pela sua versatilidade e elevado rendimento energético. É rica em sacarose, um dissacarídeo que pode ser

convertido em etanol e dióxido de carbono por meio da fermentação alcoólica conduzida por leveduras (Góes-Favoni *et al.*, 2018). Além da produção de etanol, a cultura da cana permite a geração de eletricidade por meio da cogeração, utilizando resíduos do próprio processo produtivo, como o bagaço, bem como a obtenção de diversos subprodutos, incluindo melaço, açúcar e cachaça (Silva *et al.*, 2021).

A produção de etanol no Brasil é um processo biotecnológico consolidado. A eficiência e viabilidade econômica desse processo dependem de três parâmetros fundamentais: a eficiência na extração do caldo da cana-de-açúcar, a capacidade do microrganismo em converter os açúcares em etanol e a adequação do sistema industrial, incluindo equipamentos e condições que favoreçam a atividade microbiana (Góes-Favoni *et al.*, 2018; Milanez *et al.*, 2012). Dentre esses fatores, a fermentação alcoólica conduzida por leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, representa uma etapa crítica do processo, sendo diretamente influenciada por variáveis físico-químicas e microbiológicas (Câmara; Guimarães, 2024).

O metabolismo celular das leveduras envolve uma série de reações enzimáticas complexas, cuja eficiência pode ser afetada por condições ambientais adversas. Fatores como temperatura, pH, presença de nutrientes, inibidores, concentração celular, pressão osmótica, oxigenação e contaminações microbianas exercem influência direta sobre a taxa de crescimento e a capacidade fermentativa dos microrganismos, impactando a conversão de açúcares em etanol. Assim, o estudo sistemático desses parâmetros é essencial para a otimização do rendimento alcoólico em escala industrial (Reis; Ribeiro, 2009; Câmara; Guimarães, 2024).

No Brasil, a produção de bioetanol é predominantemente realizada por meio do sistema de fermentação em batelada alimentada, caracterizado pela adição progressiva do substrato ao longo do processo (Veloso *et al.*, 2023). Embora amplamente utilizada, essa abordagem apresenta desafios operacionais, como variações temporais nas condições do processo, alta complexidade na gestão da cinética fermentativa e sensibilidade à composição do mosto (Niaze *et al.*, 2023). A oscilação dessas variáveis pode afetar significativamente o desempenho das leveduras, comprometendo a estabilidade e a qualidade do produto final (Almeida *et al.*, 2021; Mohan *et al.*, 2022).

Para enfrentar esses desafios, diferentes linhagens industriais de *S. cerevisiae* adaptadas às condições específicas das usinas brasileiras foram

isoladas. Dentre elas, destacam-se as cepas CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), G-1 (Usina Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciúmal), AS-1 (Usina Santa Adélia) e CL (Usina Clealco), selecionadas por apresentarem maior resistência a estresses ambientais e melhor desempenho fermentativo (Lopes *et al.*, 2016). No entanto, cada unidade industrial possui características particulares, relacionadas principalmente à variação da matéria-prima processada e às condições operacionais, exigindo uma abordagem personalizada na escolha e no manejo das leveduras (Câmara; Guimarães, 2024).

O processo de seleção depende de certas características do processo de fermentação, considerando não apenas os rendimentos de etanol exibidos pelas cepas de levedura, mas também características que permitem a sobrevivência das cepas em condições de estresse (Ceccato-Antonini; Covre, 2020). Além disso, a busca por novas linhagens, incluindo leveduras não-*Saccharomyces*, tem ganhado destaque devido à sua potencial resistência a estresses ambientais e à capacidade de complementar ou superar o desempenho de *S. cerevisiae* em determinadas condições (Almeida; Nascimento, 2021).

O estudo da tolerância de leveduras a fatores físico-químicos é essencial para a otimização dos processos fermentativos, contribuindo diretamente para o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de três leveduras não-*Saccharomyces* (*Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Scheffersomyces stipitis*) a diferentes condições de estresse (concentração de glicose, temperatura, pH e etanol), em comparação com duas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e CAT-1), a fim de prospectar o potencial dessas leveduras no contexto da produção de etanol.

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas três cepas de leveduras não-*Saccharomyces*, sendo elas: *S. stipitis* (linhagem cedida pela Profa. Dr^a. Inês Conceição Roberto, USP-Lorena, NRRL Y-7124), *W. anomalus* (isolada de madeira em decomposição, linhagem T1, Souza, 2015), e *M. guilliermondii* (isolada de caldo de cana, linhagem 311-CCT7783, Martini *et al.*, 2016). Para efeitos de comparação foram utilizadas duas

linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1). Todas as linhagens de leveduras estão depositadas no banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar-Campus de Araras, mantidas em *slants* em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 20 g/L peptona e 20 g/L agar, em água destilada), a 4°C.

3.2 Testes de tolerância ao estresse das linhagens de leveduras

Foram utilizados dois testes para verificar o crescimento das leveduras em diferentes situações de estresse: o ensaio *spot* (*spot assay*), na qual avaliou-se a capacidade de desenvolver colônias em meio sólido sob diferentes condições de estresse em diferentes concentrações da levedura; e o teste de crescimento em microplacas para obtenção das curvas de crescimento nas diferentes condições de estresse.

3.2.1 Ensaio *spot*

Para os testes de tolerância ao pH, as leveduras foram cultivadas em meio líquido YPD, *overnight* a 30°C com agitação, padronizadas a 1×10^7 células/mL e mantidas em solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida, foram preparadas diluições seriadas para obtenção das concentrações de 1×10^6 células/mL, 1×10^5 células/mL e 1×10^4 células/mL. Para cada concentração de células, foram retirados 10 µL e adicionados na superfície do meio YPD em placas de Petri ajustado para os seguintes valores de pH: 6,2; 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0, com solução de ácido sulfúrico 1N.

O meio de cultura foi preparado sem a adição de ágar, ajustado o pH respectivo e esterilizado em autoclave. A solução de ágar foi esterilizada separadamente. Antes de verter nas placas, as duas soluções foram misturadas. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 30°C por 7 dias, em seguida foi avaliada a presença ou ausência de colônias nos diferentes tratamentos e diluições. As placas foram fotografadas para registro do crescimento nos diferentes valores de pH do meio de cultura.

Para os testes de tolerância ao etanol, foram realizados os mesmos procedimentos que para o pH, utilizando as concentrações finais de etanol de 0; 4; 6; 8; 10; 12 e 14% (v/v). Para o preparo do meio, o etanol foi adicionado no momento de verter o meio já esterilizado nas placas de Petri. As placas inoculadas foram embrulhadas em filme plástico para evitar a evaporação do etanol.

Para os testes de tolerância às diferentes concentrações de glicose, foram realizados os mesmos procedimentos que para o pH, utilizando as concentrações finais de glicose de 20, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 g/L. A glicose foi adicionada ao meio YPD antes da esterilização do mesmo.

Para os testes de tolerância à temperatura, foi realizado o mesmo procedimento que para o pH, utilizando-se o meio YPD e incubando as placas nas temperaturas de 30, 36 e 40°C por 7 dias.

3.2.2 Crescimento em microplacas

As leveduras foram cultivadas em meio líquido YPD *overnight* a 30°C com agitação, padronizadas a 1×10^7 células/mL e mantidas em solução salina. Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno Corning® Costar de 96 poços estéreis com fundo plano transparente. Foram pipetados 20 μ L do inóculo padronizado e 180 μ L de meio líquido YPD estéril aos poços das microplacas, sendo realizados os mesmos procedimentos de preparo dos meios descritos anteriormente em relação ao pH, glicose, etanol e temperatura, porém sem a adição de ágar.

O controle foi determinado a partir do meio YPD com 20 g/L de glicose, pH 6–7, 0% de etanol, 30°C. Os ensaios foram realizados em triplicata, e o crescimento da levedura foi monitorado medindo a absorbância a 600 nm a cada 15 min usando um leitor de microplacas (Tecan Infinite M200, Mannedorf, Suíça), com agitação, por um período de 24 h.

As curvas de crescimento foram plotadas a partir dos resultados de absorbância (densidade óptica) nas diferentes condições de pH, etanol, concentração de glicose e temperatura avaliadas ao longo do tempo de cultivo. Os dados foram transformados em $\ln(X)$, a fase exponencial de crescimento foi determinada e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max} , h^{-1}) foi determinada em cada condição de cultivo considerando-se a regressão dos dados na região linear das curvas (fase exponencial de crescimento). Foi também determinada a duração da fase *lag* de crescimento (em h) para cada curva de crescimento.

Foram gerados dois tipos de *heatmaps* a partir dos resultados da velocidade específica máxima de crescimento das leveduras nas diferentes condições de cultivo (estresse). O *heatmap*, ou mapa de calor, é uma forma de visualização de

dados que associamos à intensidade da variável mostrada, no caso, a velocidade específica máxima de crescimento, permitindo avaliar o efeito das diferentes condições de estresse sobre cada levedura de forma mais visual e comparativa. Dessa forma, quanto maior a velocidade, maior a intensidade da cor.

Alternativamente, foi gerado também um *heatmap* com os mesmos dados, mas agregando o agrupamento hierárquico (*hierarchical clustering*). Nesse formato, é criado um dendrograma que ilustra o arranjo dos dados em grupos, permitindo visualizar quais leveduras mais se assemelham quanto à resposta às situações de estresse. O cálculo das distâncias para o agrupamento das leveduras foi baseado na Distância Euclidiana (*Euclidean distance*), que calcula as distâncias aos pares entre as condições de cultivo (estresse) e leveduras. Foi utilizado o método de ligação completa (*complete linkage*) para o agrupamento hierárquico, que se baseia na máxima dissimilaridade dos pares entre os pontos de dados. Valores positivos na escala (*z-score*) indicam valores acima da média; valores negativos indicam valores abaixo da média.

Os *heatmaps* foram gerados no aplicativo *SRPlot*, disponível no endereço <https://www.bioinformatics.com.cn/en> (Tang *et al.*, 2023).

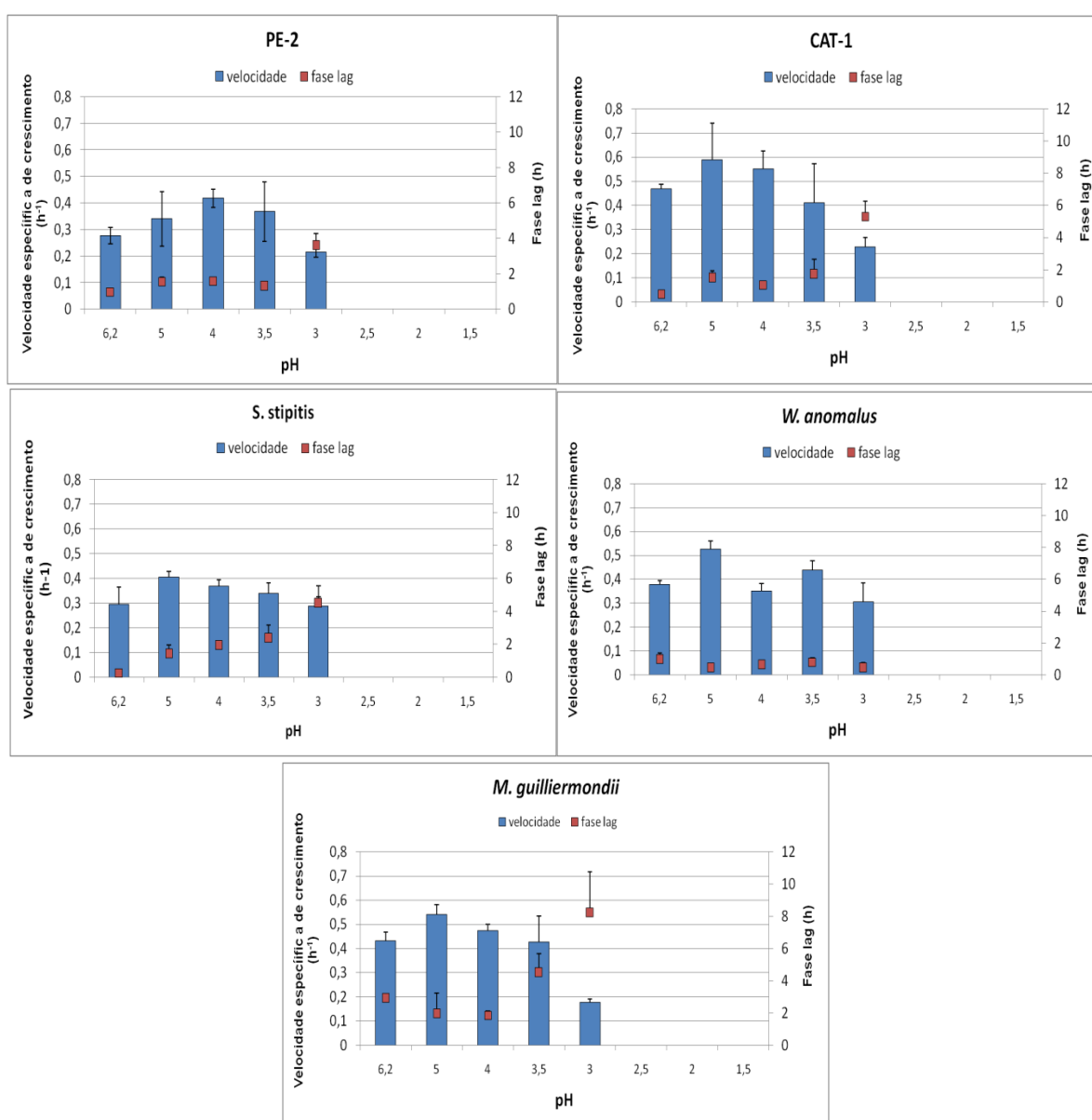
4. Resultados e Discussão

Para as linhagens industriais, foi possível observar que para a levedura *S. cerevisiae* PE-2, a maior velocidade de crescimento foi observada no pH 4, enquanto que para a *S. cerevisiae* CAT-1 a maior velocidade foi observada no pH 5, sendo que a fase lag da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi bem menor quando comparada com a *S. cerevisiae* PE-2. Para as não-*Saccharomyces*, as três leveduras tiveram maior velocidade de crescimento no pH 5. Para a levedura *S. stipitis*, em pH mais baixo, o tempo da fase lag é maior; para a levedura *W. anomalus* observou-se uma variação na fase lag, sendo que do pH 5,0 ao 3,5 a duração da fase lag é maior e no pH 3,0 a duração dessa fase diminui. Para a levedura *M. guilliermondii*, o menor tempo da fase lag foi no pH 4,0 e o maior tempo foi no pH 3,0 (Figura 1).

O pH da fermentação alcoólica tem grande influência no processo. Para a multiplicação das leveduras, o ideal está entre 4,5 e 5,5, o qual foi possível observar nos experimentos (Câmara; Guimarães; 2024). Em relação ao pH 3,

houve redução na velocidade de crescimento para todas as leveduras, no entanto, as mais sensíveis foram *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii*. A tolerância ao pH 3,0 é uma característica comum entre as cepas industriais utilizadas na indústria do bioetanol e atua como uma importante pressão seletiva (Beato *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2017).

Figura 1. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2) e não-*Saccharomyces* em meio YPD com valores de pH variando de 1,5 até 6,2, a 30°C, 20 g/L de glicose.

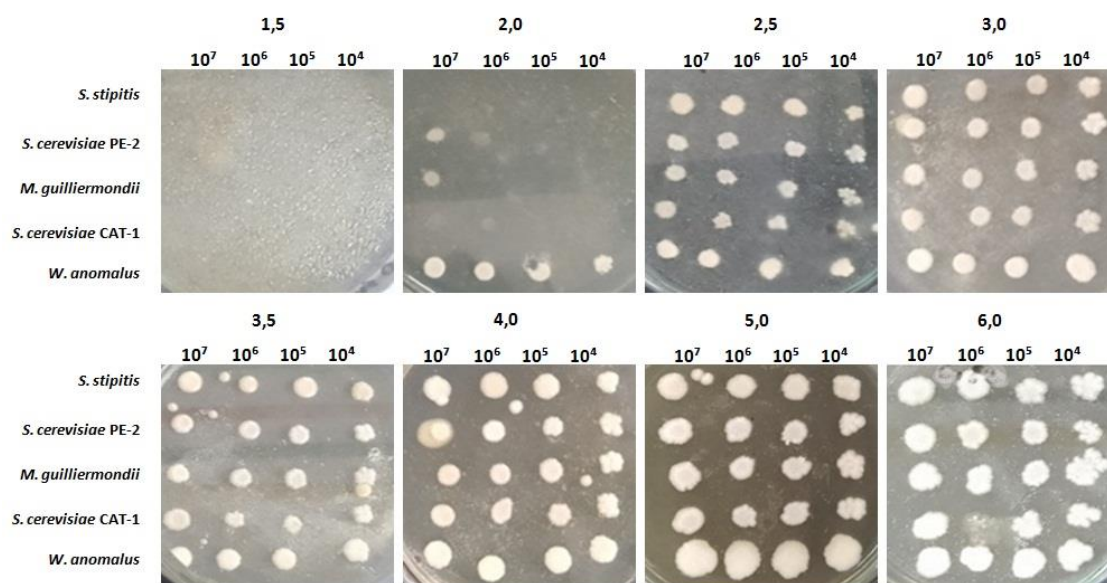


Para valores de pH igual e/ou abaixo de 2,5, não houve crescimento das leveduras (Figura 1). Segundo Costa, Cerri, Ceccato-Antonini (2018), o baixo pH ajuda a controlar a contaminação bacteriana e a floculação, no entanto, a multiplicação das células de levedura é inibida pelo pH mais baixo, o qual foi possível observar.

Os resultados do ensaio *spot* mostram o crescimento de todas as leveduras nos meios com pH entre 6,2 e 2,5, porém, quando comparado ao crescimento no meio sem estresse, há redução no tamanho do *spot*. Para o meio com pH 2,0 é possível ver apenas o crescimento da *S. cerevisiae* PE-2 nas diluições de 10^7 células/mL, 10^6 células/mL e 10^5 células/mL. Com *M. guilliermondii* observa-se crescimento nas diluições de 10^7 células/mL e 10^6 células/mL, e com *W. anomalus* pode-se observar a formação dos *spot* mesmo que em tamanho reduzido, porém no pH 1,5 não houve formação do *spot* (Figura 2).

Ceccato-Antonini (2010) destaca que os limites de tolerância ao pH para as leveduras estão entre pH 2,2 e 8,0. As leveduras preferem meios ácidos, com pH em torno de 4,5. De acordo com Diógenes e Carmo (2021), para uma boa eficiência no processo de fermentação, o pH deve se encontrar entre 5,0 e 6,2, valor ideal para o crescimento da levedura.

Figura 2. Ensaio *spot* das leveduras *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* em meio YPD com pH variando de 1,5 até 6,0, nas concentrações de 10^7 células/mL até 10^4 células/mL, a 30 °C, 20 g/L glicose.



Referente ao etanol, a mais sensível (diminuição da velocidade de crescimento e aumento da fase lag) foi a levedura *S. stipitis*, sendo que as outras leveduras apresentaram tolerância nas concentrações testadas, apesar do aumento na duração da fase lag com o aumento da concentração de etanol (Figura 3), também confirmada pelos ensaios *spot* (Figura 4). Uma baixa tolerância ao etanol é encontrada em *S. stipitis* além de uma tendência a assimilar etanol mesmo quando o açúcar está presente. Outra desvantagem dessa espécie de levedura é a incapacidade de crescer em condições anaeróbias. Apesar dessas características, *S. stipitis* é um dos microrganismos mais eficientes para fermentação de xilose, notavelmente etanol 2G (Ruchala *et al.*, 2020).

Em relação à adição de 14% de etanol (v/v), as leveduras *W. anomalus* e *M. guilliermondii* apresentaram maior taxa de tolerância quando comparadas com as linhagens de *S. cerevisiae* (Figura 3). Mukherjee *et al.* (2017) verificaram que as leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Pichia kudriavzevii* conseguiram tolerar 13% v/v de álcool, e *Dekkera bruxellensis* cresceu quando exposta a 12% v/v. Com esse estudo os autores concluíram que as leveduras não-*Saccharomyces* podem apresentar eficiência igual ou superior a *S. cerevisiae* na presença de certas condições estressantes.

Nos ensaios *spot*, as leveduras *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) cresceram em todas as concentrações de etanol, e em todas as diluições testadas. Para as leveduras não *Saccharomyces*, foi possível observar que apenas as leveduras *M. guilliermondii* e *W. anomalus* cresceram, havendo uma redução no tamanho do *spot* na diluição de 10^4 células/mL para todas as leveduras. Pelos resultados observa-se que *S. stipitis* teve menor crescimento em concentrações de etanol acima de 10% de etanol (Figura 4).

Figura 3. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2) e não-*Saccharomyces* em meio YPD com etanol nas concentrações de 0% a 14%, a 30 °C, 20 g/L glicose, pH 6,2.

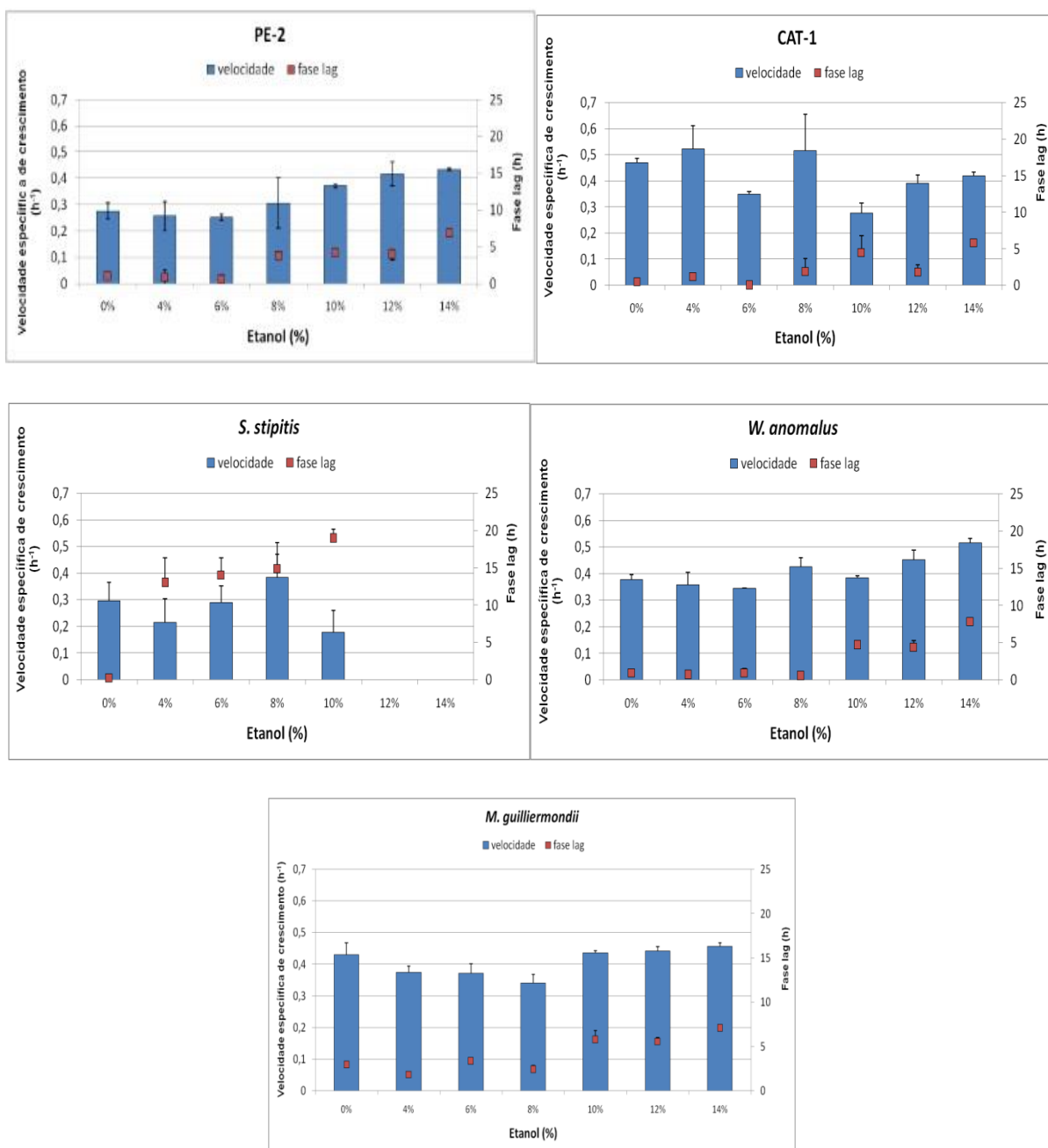
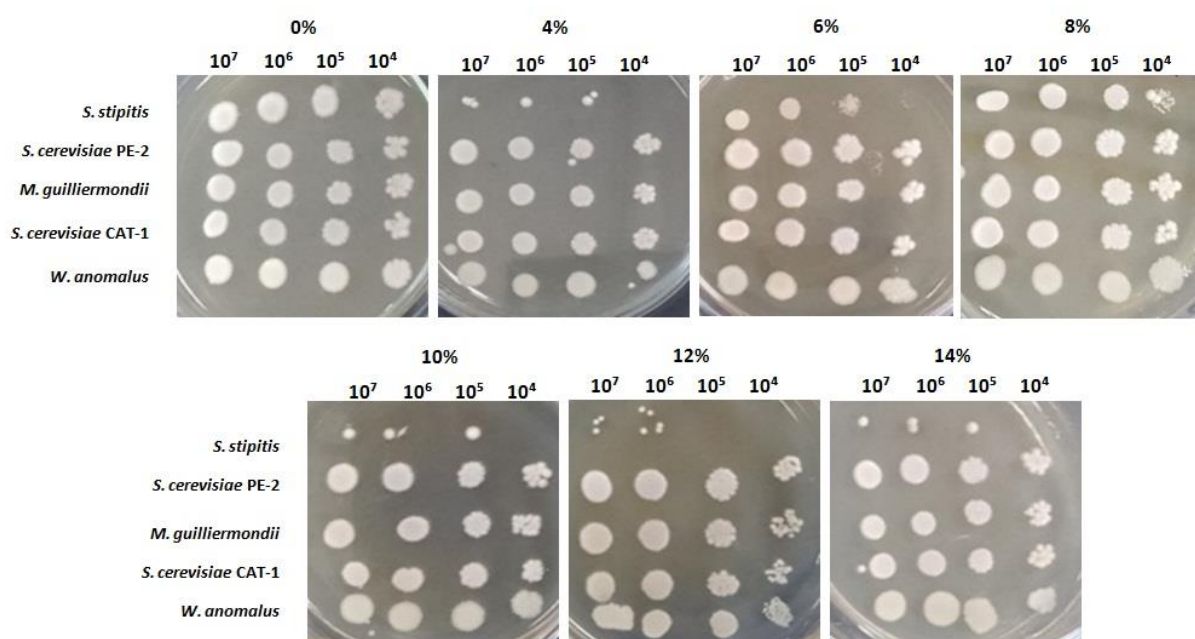


Figura 4. Ensaio *spot* das leveduras *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* em meio YPD com etanol nas concentrações de 0% a 14%, em concentrações de 10^7 células/mL até 10^4 células/mL, a 30 °C, 20 g/L glicose, pH 6,2.

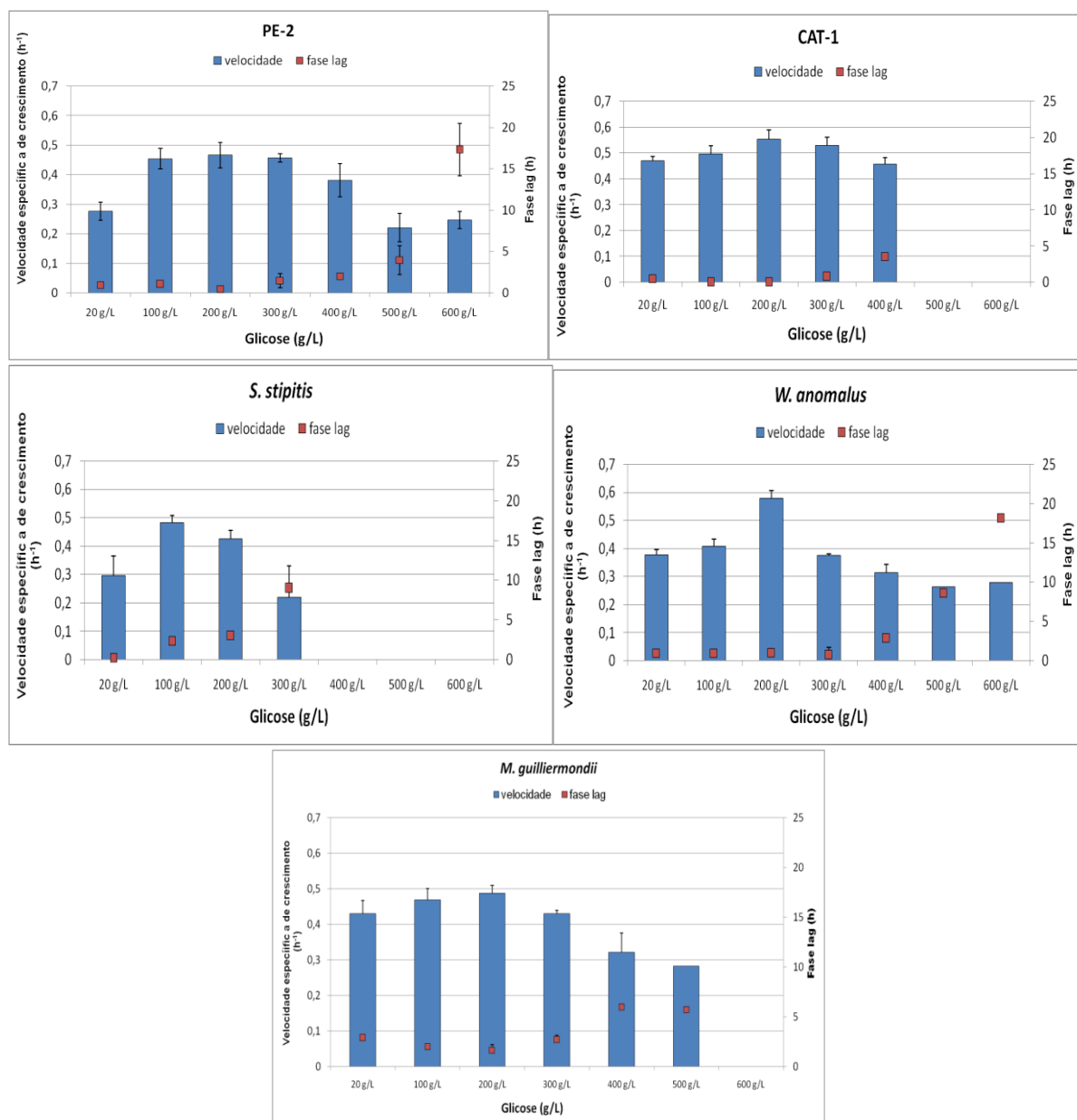


Nas diferentes concentrações de glicose testadas, foi possível observar que as leveduras *S. cerevisiae* PE-2 e *W. anomalus* apresentaram maior tolerância. Para a levedura *M. guilliermondii* na concentração de 600 g/L não houve crescimento; para *S. cerevisiae* CAT-1 não houve crescimento nas concentrações de 500 g/L e 600 g/L, e para *S. stipitis* não houve crescimento a partir da concentração de 500 g/L (Figura 5).

A maior velocidade de crescimento para esta última levedura foi observada na concentração de 100 g/L de glicose e a menor em 300 g/L. Para as demais leveduras, a maior velocidade de crescimento foi na concentração de 200 g/L, para *S. cerevisiae* CAT-1 a menor velocidade de crescimento foi na concentração de 400 g/L, e para *S. cerevisiae* PE-2, *W. anomalus* e *M. guilliermondii* foi na concentração de 500 g/L (Figura 5).

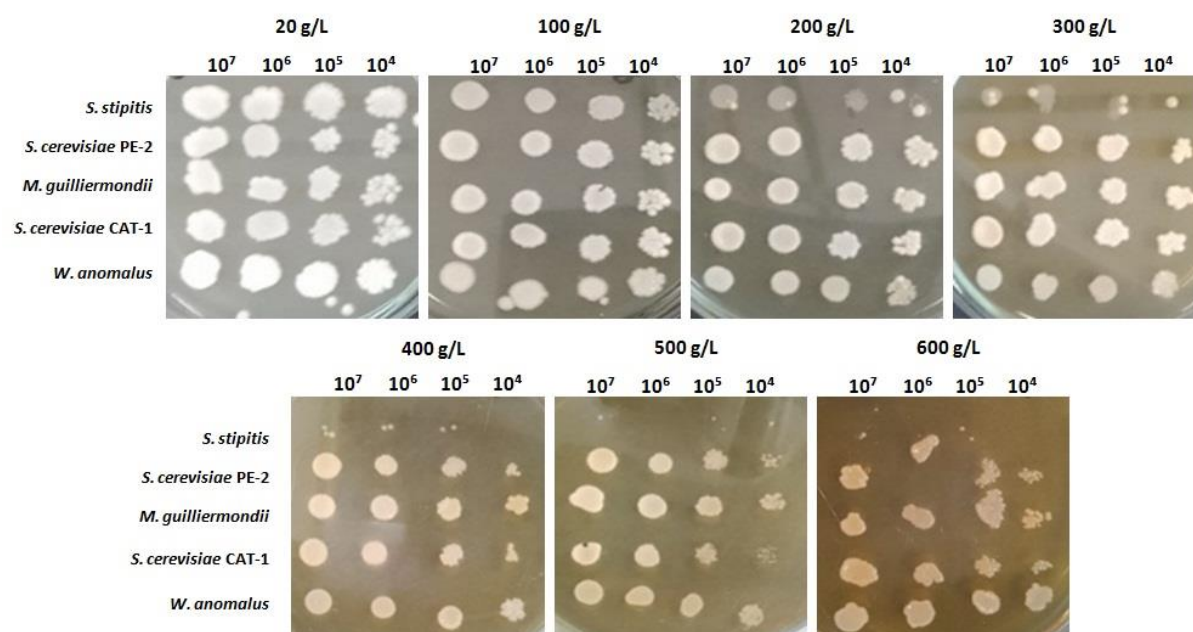
É possível observar que a fase lag aumenta de acordo com a quantidade de glicose presente no meio, pois para PE-2 a maior fase lag foi observada na concentração de 600 g/L, e para a CAT-1 foi na concentração de 400 g/L. De uma forma geral, as leveduras não *Saccharomyces* apresentaram maior fase lag quando comparadas com as *S. cerevisiae* (Figura 5).

Figura 5. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2) e não-*Saccharomyces* em meio YPD com glicose nas concentrações de 20 a 600 g/L, a 30 °C, pH 6,2.



Os resultados do ensaio *spot* mostraram que as leveduras *S. cerevisiae*, *W. anomalus* e *M. guilliermondii* cresceram nas concentrações de glicose testadas. A levedura *S. stipitis* só cresceu nas concentrações de 20 g/L, 100 g/L, 200 g/L, e na concentração de 300 g/L só foi possível observar o *spot* nas diluições de 10⁷ células/mL e 10⁶ células/mL (Figura 6).

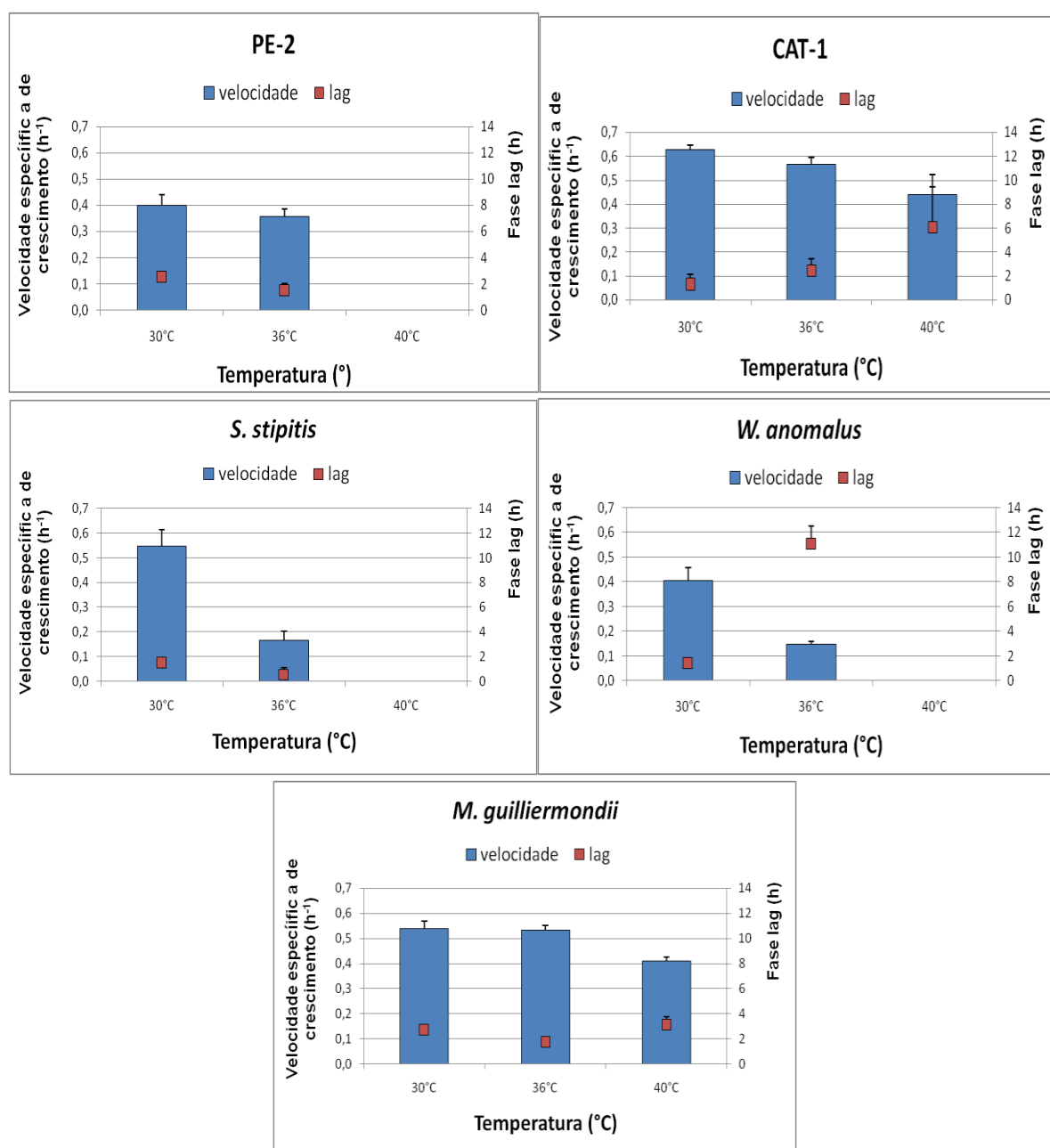
Figura 6. Ensaio *spot* das leveduras *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* em meio YPD com glicose nas concentrações de 20 a 600 g/L, em concentrações de 10^7 células/mL até 10^4 células/mL, a 30 °C, pH 6,2.



Os testes de temperatura mostraram que a 30°C as leveduras que tiveram maior velocidade de crescimento foram CAT-1, *S. stipitis* e *M. guilliermondii*. As leveduras com menor velocidade de crescimento foram PE-2 e *W. anomalus*. A fase lag das leveduras PE-2 e *M. guilliermondii* foram maiores quando comparadas com as demais leveduras, e a menor fase lag foi observada para *W. anomalus* (Figura 7).

Para a temperatura de 36°C, observou-se que as leveduras industriais PE-2 e CAT-1 tiveram a taxa de crescimento pouco afetada, sendo que as leveduras *S. stipitis* e *W. anomalus* apresentaram taxa de crescimento mais baixa, comparando-se com a temperatura de 30 °C. A levedura *M. guilliermondii* apresentou a maior termotolerância entre as leveduras testadas, sem que a taxa de crescimento fosse afetada pelo estresse térmico. A maior fase lag observada para esta temperatura foi a da levedura *W. anomalus*, e a menor fase lag foi observada na levedura industrial CAT-1 (Figura 7).

Figura 7. Velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag das leveduras *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2) e não-*Saccharomyces* em meio YPD, 20 g/L glicose, pH 6,2, em temperaturas variando de 30 a 40 °C.



As temperaturas ideais para o processo de produção industrial de etanol encontram-se entre 26 a 35°C (Pereira; Macri; Gimenez, 2020). De acordo com Dias *et al.* (2015), temperaturas abaixo de 28°C desaceleram o metabolismo da levedura, resultando em uma fermentação mais lenta e, conseqüentemente, uma menor produção de etanol (Lima; Basso; Amorim, 2001; Pereira; Vieira; Gimenez, 2020).

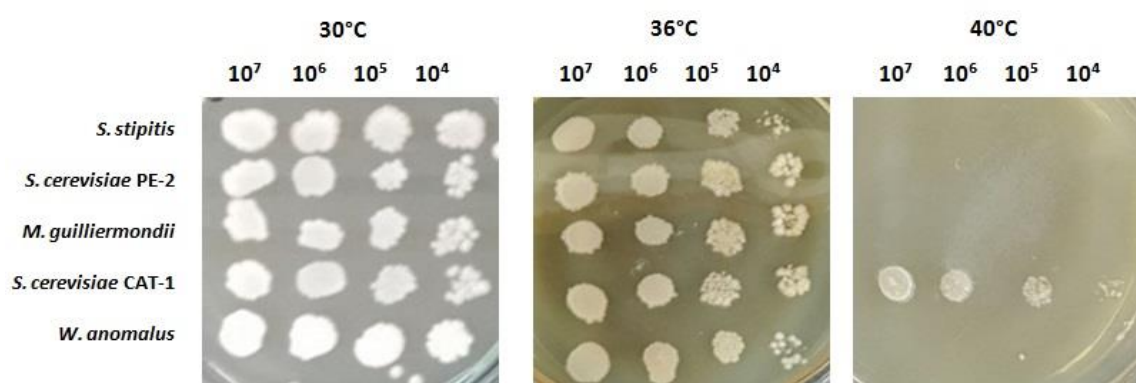
Em condições de estresse de temperatura a 40°C, foi possível observar que

as leveduras *S. stipitis* e *W. anomalus* e a levedura industrial PE-2 não cresceram (Figura 7). Abdel-Banat *et al.* (2010) relatam que linhagens de *S. cerevisiae* não são capazes de crescer em temperaturas maiores que 40°C, ressaltando que à medida que a temperatura vai aumentando, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol.

Foi possível observar que para essa condição de temperatura apenas as leveduras CAT-1 e a *M. guilliermondii* cresceram. Para a levedura *M. guilliermondii* é descrita uma temperatura máxima tolerada de 42°C (Yan *et al.*, 2021). Quando comparada a fase lag das duas leveduras, pode-se observar que o tempo de adaptação da levedura *M. guilliermondii* foi menor com o aumento da temperatura (Figura 7).

No ensaio *spot*, na temperatura de 30°C observa-se que todas as leveduras cresceram nas quatro concentrações de células, e à medida que a concentração era menor, o tamanho do *spot* também diminuía. Na temperatura de 36°C, observa-se uma redução no tamanho do *spot* para todas as leveduras (Figura 8). Nessa temperatura, as leveduras *S. stipitis* e *W. anomalus* nas concentrações de 10^5 e 10^4 células/mL foram as que tiveram maior redução no crescimento. Para a temperatura de 40°C somente a levedura industrial CAT-1 cresceu, com *spot* menor quando comparado com as temperaturas de 30°C e 36°C (Figura 8).

Figura 8. Ensaio *spot* das leveduras *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* em meio YPD 20 g/L glicose, pH 6,2, em temperaturas variando de 30 a 40 °C, em concentrações de 10^7 células/mL até 10^4 células/mL.



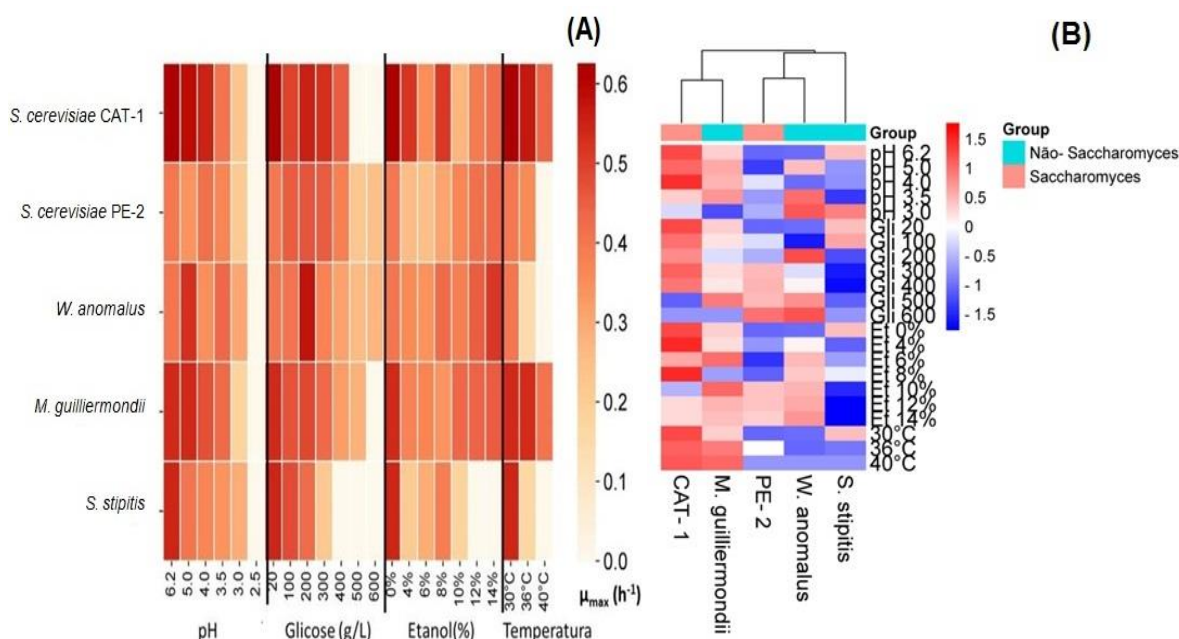
Em um ambiente industrial, onde o resfriamento do fermentador não é suficientemente eficiente na remoção de calor, e as temperaturas podem chegar a 40°C (Della-Bianca; Gombert, 2013), especialmente no verão, essa capacidade de

criar em altas temperaturas é uma característica importante para os processos de produção de etanol.

Os dados referentes aos testes de tolerância das leveduras aos diferentes estresses foram representados por meio de *heatmaps*, em que a intensidade da cor indica maior velocidade de crescimento (μ_{max}). Na Figura 9(A), é possível observar que as leveduras que se destacam são *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii*, ou seja, maiores valores de velocidade de crescimento em todas as condições de estresse.

Na Figura 9(B), o dendrograma revela como elas se organizam em grupos com base em suas similaridades quanto à resposta aos estresses, com base na velocidade de crescimento (μ_{max}). Verifica-se que as linhagens de *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 não pertencem ao mesmo grupo. Assim, as leveduras CAT-1 e *M. guilliermondii* formaram um grupo, enquanto PE-2 e *W. anomalus* formaram outro. A levedura *S. stipitis* foi a levedura que apresentou menor similaridades na resposta ao estresse em relação às demais.

Figura 9. *Heatmaps* do padrão de crescimento em (A), e com análise de agrupamento hierárquico (distância euclidiana) em (B), das leveduras *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* submetidas a diferentes condições de estresse (pH, concentração de glicose e etanol, e temperatura). As figuras foram geradas com base nos resultados da velocidade máxima de crescimento (μ_{max}).



Pode-se concluir que dentre as leveduras não-*Saccharomyces*, aquelas que apresentaram maior similaridade com as leveduras *S. cerevisiae* industriais quanto à tolerância aos estresses de pH, etanol, glicose e temperatura, foram as espécies *W. anomalus* e *M. guilliermondii*. Considerando-se que há diferença entre as linhagens industriais quanto à tolerância, *W. anomalus* foi mais semelhante à PE-2 enquanto *M. guilliermondii* assemelhou-se mais à CAT-1. De qualquer forma, são linhagens de espécies com características muito apropriadas para o processo fermentativo para produção de etanol 1G.

5. Conclusões

Entre as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 foram identificadas diferenças no perfil de tolerância aos estresses de pH, temperatura, glicose e etanol. Dentre as leveduras não-*Saccharomyces*, aquelas que apresentaram maior similaridade com as leveduras industriais quanto à tolerância aos estresses de pH, etanol, glicose e temperatura, foram as espécies *W. anomalus* e *M. guilliermondii*. Considerando-se que há diferença entre as linhagens industriais quanto à tolerância, *W. anomalus* foi mais semelhante à PE-2 enquanto *M. guilliermondii* assemelhou-se mais à CAT-1. De qualquer forma, são linhagens de espécies com características muito apropriadas para o processo fermentativo para produção de etanol 1G em relação à tolerância aos estresses comumente encontrados no ambiente industrial.

6. Literatura citada

- ABDEL-BANAT, B. M.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-7, 2010.
- ALMEIDA, C. S.; NASCIMENTO, D. D.. Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 11, n. 1, p. 99-119, 2021.
- ALMEIDA, L. P.; SILVA, C. R.; MARTINS, T. B.; PEREIRA, R. D.; ESPERANÇA, M. N.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Heat transfer evaluation for conventional and

- extractive ethanol fermentations: saving cooling water. **Journal of Cleaner Production**, v. 304, 127063, 2021.
- BEATO, F. B., BERGDAHL, B., ROSA, C. A., FORSTER, J., GOMBERT, A. K. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS Yeast Research**. v. 16. n. 7, fow076. 2016.
- CÂMARA, C. N.; GUIMARÃES, C. C. Fermentação alcoólica: um estudo de caso sobre as ações adotadas para a otimização deste processo. **Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 1, e16102, 2024.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. Coleção UAB-UFSCar, 2010.105 p.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; COVRE, E. A. From baker's yeast to genetically modified budding yeasts: the scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. **FEMS Yeast Research**, v. 20, 8, 2020.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2018.
- DELLA-BIANCA, B. E., GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1083-1095, 2013.
- DIAS, M. O. S et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.
- DIÓGENES, B. C.; CARMO, S. K. S. Desempenho de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse ácido no processo de fermentação alcoólica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e232101018716, 2021.
- GÓES-FAVONI, S. P.; MONTEIRO, A. C. C.; DORTA, C.; CRIPPA, M. G.; SHIGEMATSU, E.. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.4, p.285-296, 2018.
- LIMA, U. de A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (org). **Biotecnologia**

- industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. v. 3, p. 1-43, 2001.
- LOPES, L.; PAULILLO, S. C. DE. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIN NETO, H. B.; AMORIN, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.
- MARTINI, C.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CODATO, C. B.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, 80, 2016.
- MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; CARGIA, J. L. F.; REIS, B. L. S. F. S. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **BNDES Setorial**, v. 35, p. 277-302, 2012.
- MOHAN, V.; PACHAURI, N.; PAMJWANI, B.; KAMATH, D. V. A novel cascaded fractional fuzzy approach for control of fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 357, p. 127377, 2022.
- MUKHERJEE, V. et al. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, 2016, 2017.
- NIAZE, A. A.; SAHU, R.; SUNKARA, M. H.; UPADHAYAYULA, S. Model construction and optimization for raising the concentration of industrial bioethanol production by using a data-driven ANN model. **Renewable Energy**, v. 216, 119031, 2023.
- PEREIRA, D. A.; MACRI, R. de C. V.; GIMENEZ, A. Z. Fatores que afetam a fermentação alcoólica. **Revista Ciência & Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 44-55, 2020.
- REIS, V. R., ANTONANGELO, A. T. B. F., BASSI, A. P., COLOMBI, D., CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 268-274, 2017.
- RUCHALA, J., KURYLENKO, O. O., DMYTRUK, K. V., SIBIRNY, A. A. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts

- (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 109-132, 2020.
- SILVA, D. L. G.; BATISTI, D. L. S.; FERREIRA, M. J. G.; MERLINI, F. B.; CAMARGO, R. B.; BARROS, B. C. B. Cana-de-açúcar: aspectos econômicos, sociais, ambientais, subprodutos e sustentabilidade. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e44410714163, 2021.
- TANG, D.; CHEN, M.; HUANG, X.; ZHANG, G.; ZENG, L.; ZHANG, G.; WU, S.; WANG, Y. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. **PLoS One**, v. 18, n. 11, e0294236, 2023.
- VELOSO, I. I. K.; RODRIGUES, K. C. S.; BATISTA, G.; CRUZ, A. J.; BADINO, A. C. Mathematical modeling of fed-batch ethanol fermentation under very high gravity and high cell density at different temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 6, p. 2632-2649, 2022.
- YAN, W.; GAO, H.; QIAN, X.; JIANG, Y.; ZHOU, J.; DONG, W.; XIN, F.; ZHANG, W.; JIANG, M. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, 107674, 2021.

CAPÍTULO 2. EFEITO DOS MOSTOS DE CALDO, MELAÇO E MISTO SOBRE O CRESCIMENTO DE LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* E *Saccharomyces cerevisiae*

1. Resumo

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, com destaque para o uso do caldo de cana e do melaço como meios para a fermentação. O processo fermentativo depende de fatores físico-químicos que afetam o desempenho das leveduras, sendo a viabilidade celular crucial para o rendimento alcoólico. O tipo de mosto exerce influência direta sobre o desempenho das leveduras. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o crescimento e o rendimento em etanol de leveduras não-*Saccharomyces* (*Meyerozyma guilliermondii*, *Scheffersomyces stipitis* e *Wickerhamomyces anomalus*) e duas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) em três diferentes mostos derivados da cana-de-açúcar. O crescimento de leveduras foi avaliado em caldo de cana, melaço e caldo misto (1:1), sendo o pH ajustado para 5,5. Os meios foram inoculados com 10 mL de cultura padronizada (1×10^7 células/mL), incubados por 24 h a 30 °C e 160 rpm. Amostras foram coletadas em diferentes tempos (4, 8, 12 e 24 h) para análises microbiológicas (contagem celular) e físico-químicas (açúcar redutor total, pH e teor alcoólico). O melaço foi o meio de crescimento que possibilitou maior aumento do número de células de leveduras nas condições de cultivo avaliadas, tanto para as leveduras *S. cerevisiae* quanto para as não-*Saccharomyces*. Quanto ao rendimento em etanol, a linhagem PE-2 apresentou maior valor em 12 h e os valores não diferiram muito nos três meios, diferentemente para a linhagem CAT-1, onde o maior rendimento foi obtido em meio de caldo em 24 h. Os melhores resultados de rendimento foram obtidos em caldo para *S. stipitis* e *W. anomalus*, enquanto para a levedura *M. guilliermondii*, o crescimento foi também melhor em melaço, mas rendimentos muito próximos foram observados tanto em caldo e melaço.

Palavra-chave: Meios de cultivo, Melaço, Caldo misto, *Saccharomyces*, Não-*Saccharomyces*.

2. Introdução

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção mundial de etanol, sendo o segundo maior produtor global, com produção de 36,07 bilhões de litros, sendo 13,89 bilhões de litros de etanol anidro e 22,18 bilhões de litros de etanol hidratado na safra 2024/2025, a partir da cana-de-açúcar (Conab, 2025). O processo

fermentativo, etapa central da produção de etanol, envolve uma série de fatores físico-químicos que podem impactar a viabilidade celular e o rendimento da fermentação, incluindo o mosto usado no processo.

Os principais agentes microbianos usados na fermentação são as leveduras, as quais podem atuar em condições aeróbias ou anaeróbias. Em aerobiose, degradam completamente a glicose, gerando alta quantidade de ATP e baixo rendimento de etanol. Já na anaerobiose, condição predominante nas destilarias, ocorre a produção de etanol e CO₂ como produtos principais, com menor geração de energia celular (Sampaio, 2021). A viabilidade celular é um fator determinante para o rendimento alcoólico, sendo impactada por parâmetros físico-químicos, contaminações, falhas operacionais e condições ambientais adversas (Cunha *et al.*, 2019; Jacob; Campos, 2023).

Rodrigues *et al.* (2025) relataram que durante a fermentação, em concentrações de açúcares acima de 40 g/L, tem-se uma queda proporcional nas velocidades de crescimento celular e de produção de etanol, e acima de 80 g/L a atividade fermentativa pode cessar completamente, exigindo o uso de mostos relativamente diluídos para assegurar uma conversão eficiente dos açúcares. O teor de açúcares fermentescíveis, medido por meio do Açúcar Redutor Total (ART), é um parâmetro crucial para o sucesso do processo, influenciando diretamente o desempenho das leveduras e a qualidade final do produto (Basso *et al.*, 2008).

Em escala industrial, linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, como CAT-1 e PE-2, têm sido amplamente utilizadas devido à sua adaptabilidade e eficiência nos processos fermentativos (Amorim *et al.*, 2011). Essas linhagens foram isoladas originalmente nas dornas de fermentação das próprias usinas, hoje representando cerca de 80% da biomassa utilizada em destilarias e responsáveis por mais de 60% da produção nacional de etanol (Nascimento; Fonseca, 2019). De acordo com Crepin *et al.* (2012), seu sucesso está relacionado à sua eficiência na metabolização de açúcares simples como glicose e frutose, além da capacidade de regular a absorção de fontes nitrogenadas por via catabólica.

No processo de produção de etanol as leveduras enfrentam estresses ambientais típicos do ambiente fermentativo, como altas concentrações de etanol, elevadas temperaturas e limitações nutricionais. Deficiências nutricionais podem comprometer a absorção de açúcares, desacelerar o crescimento celular e levar à interrupção da fermentação ocasionando baixa produção de etanol (Betite *et al.*,

2012; Gobert *et al.*, 2019). A suplementação do mosto com fontes nitrogenadas é uma prática comum para mitigar esses efeitos e garantir a continuidade do processo (Monteiro *et al.*, 2015).

O meio fermentativo exerce influência direta sobre o desempenho das leveduras. Na indústria sucroalcooleira, são utilizados caldo de cana, melaço e misturas desses, todos denominados de mosto (Lima, 2019). O caldo de cana-de-açúcar é um líquido opaco e viscoso, apresentando em sua composição majoritariamente água (80%) e sólidos solúveis (20%), dos quais se destacam sacarose (17%), glicose (0,4%) e frutose (0,2%), além de compostos nitrogenados e minerais (Menezes, 2012; Stuppiello, 1987).

O melaço é um subproduto espesso e escuro, contendo elevada concentração de carboidratos e demanda química de oxigênio (DQO), sendo amplamente utilizado tanto na produção de etanol quanto na geração de biogás (Oliveira *et al.*, 2020; Vilela *et al.*, 2019). A composição típica do melaço de cana-de-açúcar é de 25 a 35% de sacarose, 20 a 35% de açúcares redutores (glicose e frutose), 10 a 16% de cinzas e 0,5% de polissacarídeos (Yamakawa, 2016).

Estudos têm apontado o potencial de leveduras não-*Saccharomyces* como alternativas promissoras para processos industriais e sua comercialização, com características semelhantes às linhagens *S. cerevisiae*, em determinadas condições fermentativas. Estas leveduras apresentam características metabólicas diversificadas, que podem contribuir para a melhoria da tolerância a estresses, aumento da viabilidade celular e expansão do espectro de substratos utilizados (Almeida; Nascimento, 2021; Molinet; Cubillos, 2020).

Entretanto, são poucas as pesquisas que avaliam comparativamente o desempenho dessas leveduras em meios fermentativos reais, tais como caldo de cana, melaço e caldo misto (esse último uma mistura de caldo e melaço). Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o crescimento e rendimento em etanol de leveduras não-*Saccharomyces* (*Meyerozyma guilliermondii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Scheffersomyces stipitis*), anteriormente avaliadas quanto à tolerância aos estresses comumente encontrados na produção de etanol de primeira geração (1G), e *S. cerevisiae* (duas linhagens industriais, CAT-1 e PE-2), em três diferentes mostos derivados da cana-de-açúcar (caldo de cana, melaço e caldo misto). Capacidade e rapidez de crescimento nesses mostos são essenciais

para a etapa de propagação do inóculo, anteriormente à etapa de fermentação propriamente dita.

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas três cepas de leveduras *não-Saccharomyces*, sendo elas *S. stipitis* (linhagem cedida pela Profa. Dr^a. Inês Conceição Roberto, USP-Lorena, NRRL Y-7124), *W. anomalous* (isolada de madeira em decomposição, linhagem T1, Souza, 2015), e *M. guilliermondii* (isolada de caldo de cana, linhagem 311-CCT7783, Martini *et al.*, 2016). Para efeitos de comparação foram utilizadas duas linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1). Todas as linhagens de leveduras estão depositadas no banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar-Campus de Araras, mantidas em *slants* em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 20 g/L peptona e 20 g/L agar, em água destilada), a 4°C.

3.2 Preparo dos meios de crescimento

O meio de caldo foi preparado diluindo o caldo da cana-de-açúcar em água destilada para a concentração de 40 g/L de ART (4°Brix), sendo que a concentração inicial de ART do caldo de cana foi de 150 g/L (15° Brix). O meio de melaço foi preparado após diluição do melaço em água destilada para a concentração de 40 g/L de ART (4°Brix). A concentração inicial de ART do caldo de melaço foi de 759 g/L. O caldo misto foi constituído de caldo de cana e melaço nas proporções de 1:1 (50% de melaço e 50% de caldo), para concentração final de 40 g/L de ART. O pH dos mostos foi ajustado para 5,5 utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1N).

O melaço e caldo de cana foram obtidos na Usina Santa Lúcia, safra referente a 2023/2024, sendo utilizado o caldo clarificado. Após coleta na usina, o caldo foi filtrado em algodão para retirada de impurezas e armazenado em garrafas plásticas em *freezer*. O melaço também foi distribuído em garrafas plásticas e armazenado em *freezer*.

3.3 Preparação dos inóculos das leveduras

As leveduras foram cultivadas em meio líquido YPD (*overnight* a 30°C, em

agitação), padronizadas a 1×10^7 células/mL e mantidas em solução salina. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas no meio de crescimento (caldo, melão e misto), constituindo-se o inóculo para as etapas seguintes.

3.4 Testes de crescimento das leveduras em mostos de cana-de-açúcar

Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do meio de crescimento (caldo, melão ou misto), os quais foram autoclavados a 120°C e 1 atm por 15 minutos. Em seguida foram adicionados em cada frasco 10 mL do inóculo padronizado em 1×10^7 células/mL ressuspensado em seus respectivos meios. Os frascos foram mantidos em incubadora com agitação por um período de 24 horas a 30°C, a 160 rpm, em triplicata.

Foram retiradas amostras de 8 mL nos tempos de 4, 8, 12 e 24 h para análises microbiológicas e físico-químicas. Antes da centrifugação da amostra a 3400 rpm por 6 min, foi retirado um volume para a análise microbiológica. O sobrenadante, obtido após centrifugação da amostra, foi utilizado para as análises físico-químicas.

3.5 Análises microbiológicas

O número de células viáveis foi determinado por meio da contagem das células em microscópio utilizando-se câmara de Neubauer, utilizando a solução de azul de metileno - citrato de sódio como corante, segundo Lee, Robinson e Wang (1981). Os resultados foram transformados em log do número de células viáveis/mL.

3.6 Análises físico-químicas

Após a centrifugação das amostras e separação das células de leveduras, o sobrenadante foi analisado quanto ao pH, utilizando pH-metro digital MS Tecnopon mPA210; etanol (em g/100 mL), por meio da destilação de 5 mL das amostras em microdestilador Tecnal TE-012 e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital Anton-Paar®, conforme Amorim (1997).

O teor de açúcar redutor total (ART) foi determinado pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) (MILLER, 1959, modificado). Para a quantificação desses açúcares, foi realizada hidrólise ácida para conversão da sacarose em glicose+frutose (ambos açúcares redutores). Foi transferido 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, sendo em seguida, adicionados 30 mL de

água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Em seguida, os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em banho térmico (água gelada) e em seguida adicionados 2,8 mL de solução de NaOH 12 mol/L e completado o volume do balão até o menisco com água destilada.

Após a hidrólise, foi retirado 1 mL de cada solução preparada, transferindo para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, resfriadas em água corrente, e em seguida foram adicionados 5 mL de água destilada em cada tubo.

Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex, sendo realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (ThermoBiomate®). Um ensaio em branco foi conduzido substituindo a amostra por água destilada. Para o cálculo do ART foi elaborada uma curva padrão utilizando-se solução de glicose. A concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação da reta obtida a partir da curva padrão, conforme descrita abaixo:

$$ART (g/L) = \frac{A_{540nm} + 0,0329 * Diluição}{0,6510}$$

3.7 Cálculo do rendimento em etanol

O rendimento (g de etanol produzido/g de ART consumido) foi calculado com base nos resultados de teor alcoólico (g/100 mL) e consumo de ART (concentração inicial- concentração final, em g/100 mL) nos tempos de 12 e 24 h de cultivo.

4. Resultados e Discussão

A levedura *S. cerevisiae* PE-2 cresceu mais rápido e mais intensamente no meio de melaço (aumento de 2,0 ciclos log) quando comparado ao meio de caldo e misto (1,3 e 1,5 ciclos log, respectivamente). Em 12 h, o rendimento em etanol foi de 0,51, 0,46 e 0,48 g/g em melaço, caldo e misto, respectivamente (Figura 1, Tabela 1). Em 24 h, apesar do aumento de cerca de 50% no teor alcoólico, houve pouca variação na concentração de ART (menos de 30%) do melaço, o que pode ser atribuído ao consumo de alguma outra fonte de carbono presente no melaço

que não é redutora e portanto, não foi determinada pelo método do ADNS. A variação de pH foi a mesma nos três meios (Figura 1).

Figura 1. Log do número de células viáveis/mL da levedura *S. cerevisiae* PE-2, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melação (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação.

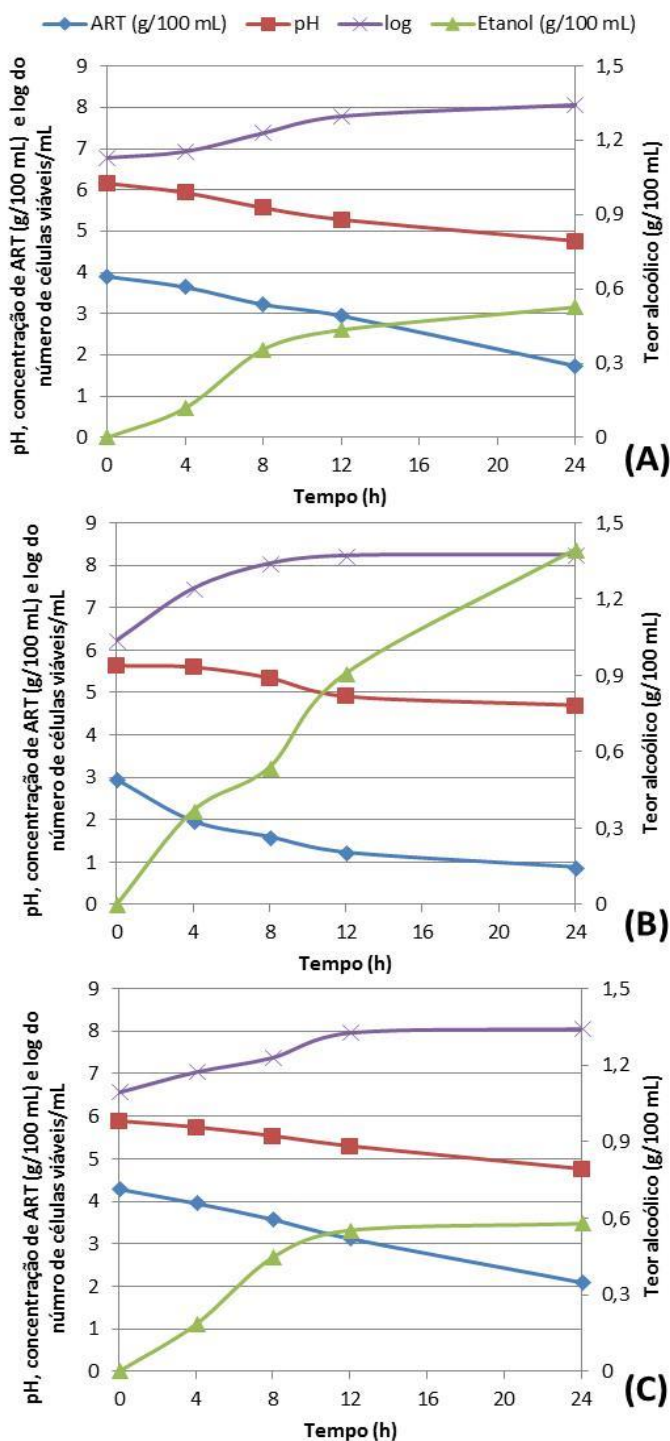


Tabela 1. Variação de crescimento (aumento do número de ciclos log ao final de 24 h) e rendimento em etanol (g etanol/g ART) das leveduras *S. cerevisiae* (linhagens PE-2 e CAT-1) e das leveduras não-*Saccharomyces* crescidas em meio de caldo, melaço e misto, a 30 °C, sob agitação, nos períodos de 12 e 24 h de cultivo.

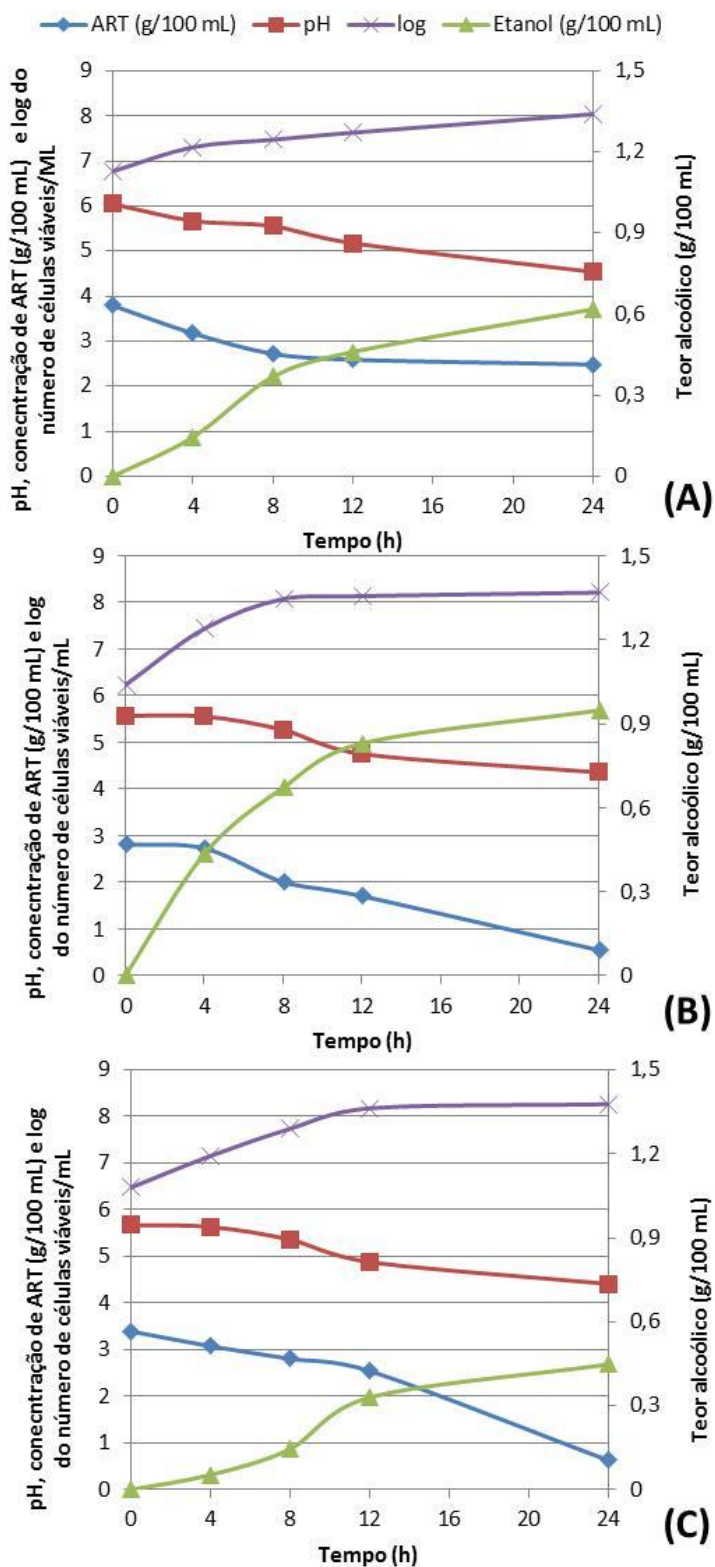
Levedura	Caldo			Melaço			Misto		
	Ciclos log	Rendimento		Ciclos log	Rendimento		Ciclos log	Rendimento	
		12 h	24 h		12 h	24 h		12 h	24 h
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	1,3	0,46	0,24	2,0	0,51	*	1,5	0,48	0,26
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	1,3	0,38	0,47	2,0	*	0,42	1,8	0,39	0,16
<i>S. stipitis</i>	1,6	*	0,50	1,9	0,12	0,08	1,9	0,26	0,18
<i>W. anomalus</i>	1,5	*	0,47	2,4	0,34	0,13	1,6	0,26	0,23
<i>M.</i> <i>guilliermondii</i>	1,2	0,47	0,37	2,0	0,50	0,29	1,6	0,26	0,17

*valores não expressos por estarem acima do rendimento teórico (>0,51 g/g)

Estudos apontam que a linhagem *S. cerevisiae* PE-2 se destaca entre as linhagens industriais devido a sua adaptabilidade e robustez em ambientes adversos com altos teores de açúcares fermentáveis (Della-Bianca *et al.*, 2014). No mesmo estudo, os autores ressaltaram que o rendimento do teor alcoólico pode chegar a 50% em relação ao valor teórico mesmo em condições de estresse.

A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 teve crescimento semelhante no meio de melaço e no meio misto (aumento de 2,0 e 1,8 ciclos log, respectivamente). A fase exponencial nesses dois meios ocorreu entre 4-8 h, sendo que no meio de caldo a fase exponencial teve duração maior e o crescimento foi mais lento, aumentando somente 1,3 ciclos log em 24 h. Em 24 h, o rendimento em etanol foi de 0,47 e 0,42 em caldo e melaço, respectivamente, sendo que em caldo misto o rendimento foi de 0,16 nesse período de tempo, mas de 0,39 em 12 h. De qualquer forma, o rendimento foi menor em caldo misto. Houve mais sobra de ART no meio de caldo. O pH teve o mesmo comportamento nos três meios (Figura 2, Tabela 1).

Figura 2. Log do número de células viáveis/mL da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação.



A levedura *S. stipitis* cresceu mais rápido e mais intensamente no meio de melaço e misto (aumento de 1,9 ciclos log) quando comparado ao meio de caldo (1,6 ciclos log). Embora tenha crescido melhor no meio de melaço, o rendimento em etanol foi o mais baixo (0,08 g/g-0,12 g/g, 24 h-12 h, respectivamente) nesse meio. Referente ao pH, é possível observar que praticamente não houve variação nos valores em quaisquer dos meios (Figura 3, Tabela 1).

A espécie *S. stipitis* tem sido bastante utilizada em processos de produção de etanol 2 G devido à sua capacidade de assimilar e fermentar xilose. Segundo Rodrigues *et al.* (2023), a glicose limita o transporte de xilose de forma não competitiva. Além disso, a *S. stipitis* é menos resistente ao etanol do que *S. cerevisiae*, e a necessidade de preservar as condições microaerófilas dificulta sua aplicação em escala comercial. Hughes *et al.* (2012) destacam que, quando cultivada em meio contendo xilose, *S. stipitis* apresenta maior produção de etanol em comparação ao crescimento em glicose, no entanto o rendimento celular é baixo.

A levedura *W. anomalus* cresceu melhor no meio de melaço (aumento de 2,4 ciclos log) em comparação com o misto (1,6 ciclos log) e caldo (1,5 ciclos log). O pH dos três meios foram semelhantes, com valores finais próximos de 4,5. Em 24 h, o rendimento em etanol foi de 0,47, 0,13 e 0,23 g/g em caldo, melaço e misto, respectivamente, destacando-se que em 12 h o rendimento foi maior em melaço (0,34 g/g) e misto (0,26 g/g). A maior sobra de ART ocorreu em meio de caldo (Figura 4, Tabela 1).

A *W. anomalus* é uma levedura menos tolerante ao estresse que pode apresentar um rendimento de etanol menor quando comparado com espécies de *Saccharomyces*, e com duração de fermentação mais longa (Ruyters *et al.*, 2025; Zha *et al.*, 2013). Estudando técnicas de co-fermentação para investigar a viabilidade de aumentar a produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar, essa levedura apresentou menor produção de etanol (Hawaz *et al.*, 2024).

Figura 3. Log do número de células viáveis/mL da levedura *S. stipitis*, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação.

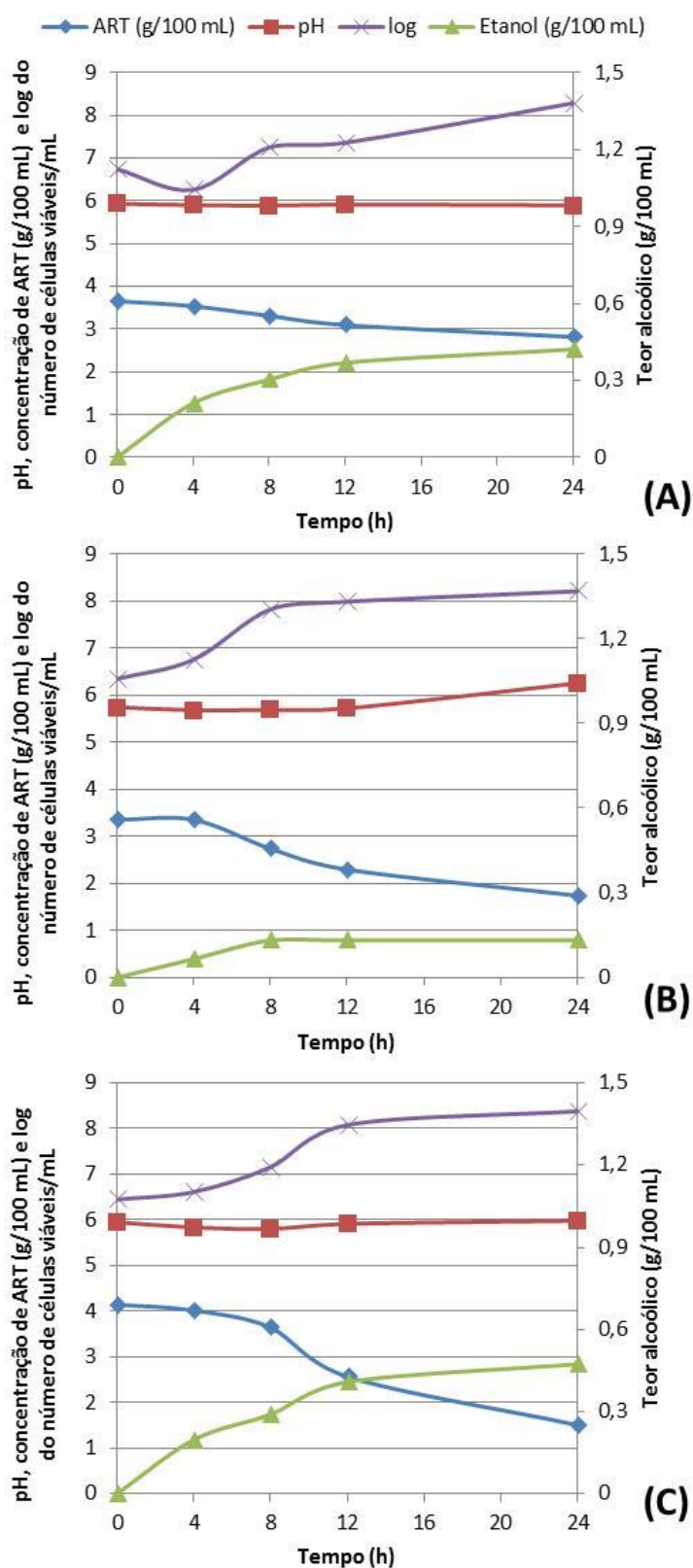
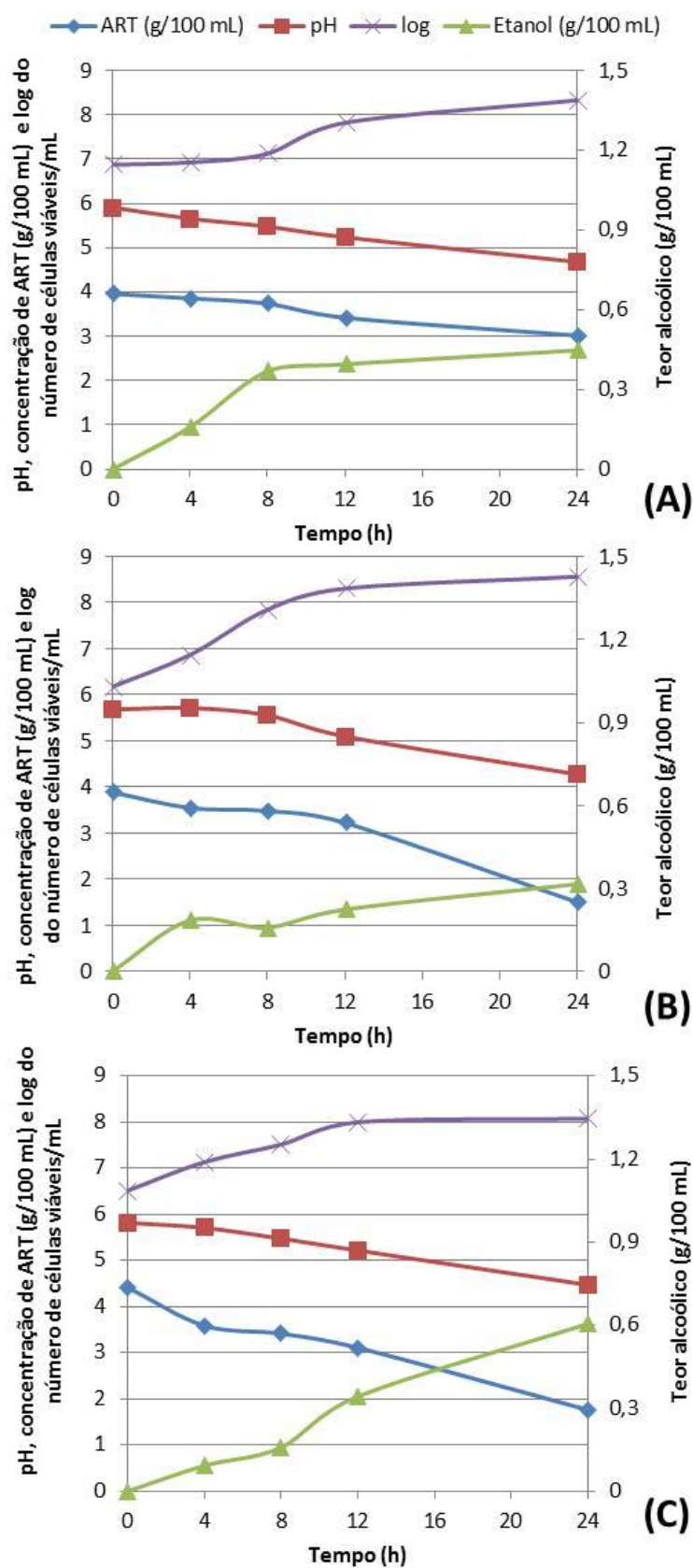


Figura 4. Log do número de células viáveis/mL da levedura *W. anomalus*, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação.



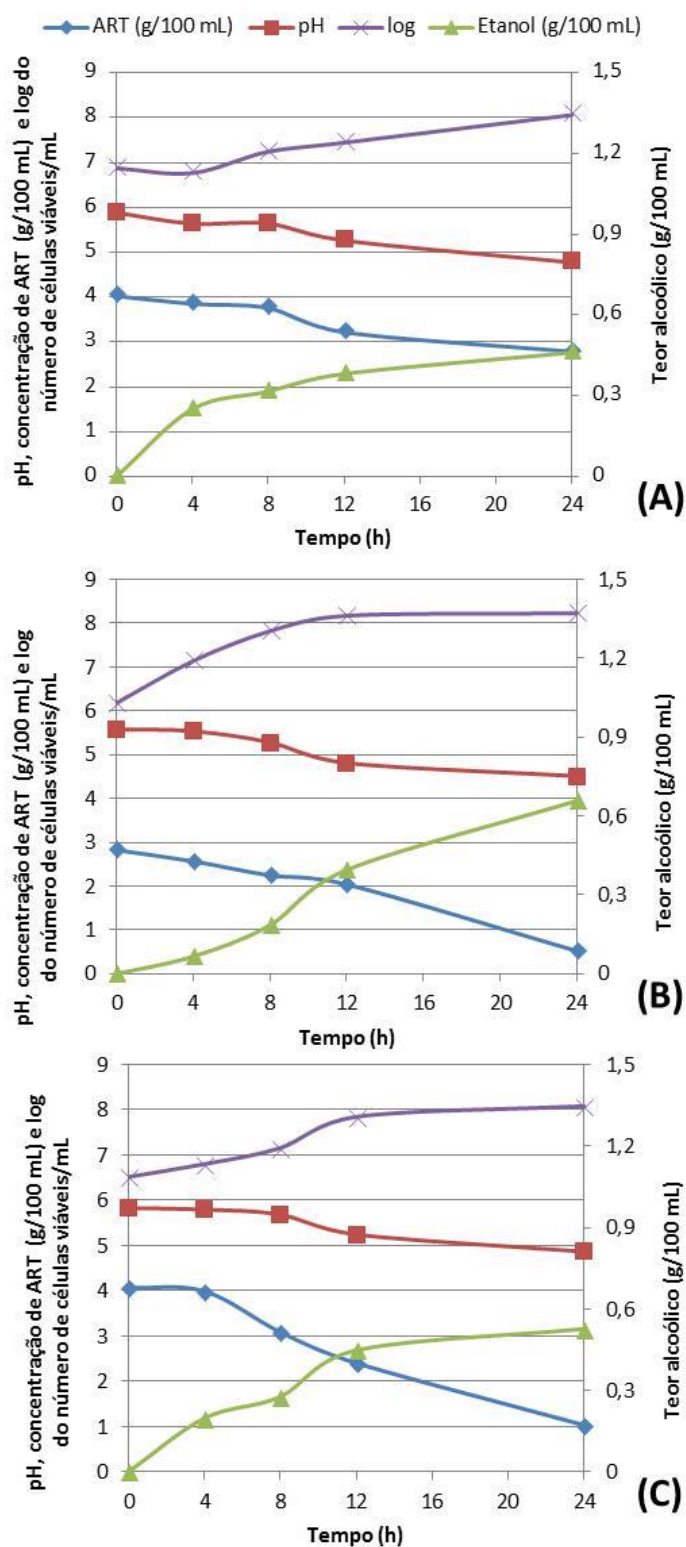
A levedura *M. guilliermondii* teve maior crescimento no meio de melaço do que nos meios de caldo e misto (aumento de 2,0, 1,2 e 1,6 ciclos log, respectivamente). Os maiores rendimentos foram obtidos em 12 h de cultivo (0,47, 0,50 e 0,26 g/g em caldo, melaço e misto, respectivamente). Em 24 h, o rendimento em etanol foi de 0,37, 0,29 e 0,17 g/g em caldo, melaço e misto, respectivamente, destacando-se que em 12 h o rendimento foi maior em melaço e caldo. As variações de pH foram muito semelhantes nos três meios (Figura 5, Tabela 1).

Comparando-se os valores de rendimento em etanol obtidos para as linhagens de *S. cerevisiae*, verifica-se que a linhagem PE-2 apresenta maior rendimento em 12 h e os valores não diferem muito nos três meios, diferentemente para a linhagem CAT-1, onde o maior rendimento foi obtido em meio de caldo em 24 h. Ainda que seja superior em caldo, o rendimento em melaço é ainda alto, porém em meio misto (caldo:melaço, 1:1), os rendimentos são bem inferiores, seja em 12 ou 24 h. Quando se avalia o crescimento dessas leveduras, considerando a fase de propagação do inóculo em que a finalidade é obtenção de massa celular, o melaço é mais indicado por possibilitar maior aumento do número de células viáveis (Tabela 1).

Para as leveduras não-*Saccharomyces*, o mesmo resultado se aplica quanto ao crescimento, sendo o melaço o meio mais indicado. Já para rendimento em etanol, os melhores resultados foram obtidos em caldo para *S. stipitis* e *W. anomalus*. Para a levedura *M. guilliermondii*, o crescimento foi também melhor em melaço, mas rendimentos muito próximos foram observados em caldo e melaço (Tabela 1).

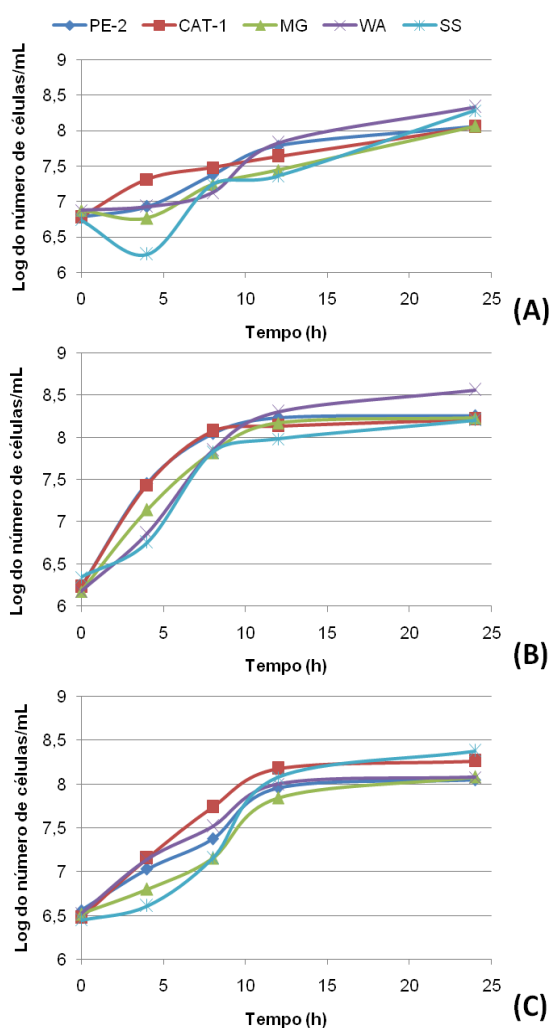
O melaço, embora rico em açúcares, contém um alto teor de sais minerais e presença de compostos que podem levar à inibição das leveduras (Camargos, 2019). Era esperado que o meio de melaço não fosse satisfatório para o crescimento das leveduras devido à presença de compostos inibidores, no entanto, foi o mosto que apresentou melhor resultado para todas as leveduras. A proposta de usar o meio misto (caldo e melaço em iguais proporções) era justamente para verificar se, em caso de inibição do crescimento em melaço, a mistura com caldo poderia aliviar a inibição, no entanto, o meio misto não apresentou resultados relevantes que justifiquem o seu uso em lugar do melaço sozinho.

Figura 5. Log do número de células viáveis/mL da levedura *M. guilliermondii*, concentração de açúcar redutor total (ART, g/100 mL), pH final e teor alcoólico (g/100 mL) do meio de caldo (A), melação (B) e misto (C) cultivado com essa levedura, em um período de 24 h, a 30°C com agitação.



A Figura 6 traz a comparação entre as leveduras para cada meio (caldo, melaço e misto) a fim de facilitar a visualização de quais leveduras e em qual meio se sobressaem quanto ao crescimento. É nítido que o melaço possibilita melhor crescimento e que as leveduras *S. cerevisiae* (linhagens CAT-1 e PE-2) e *M. guilliermondii* se sobressaem em termos de maior velocidade de crescimento (Figura 6B). Uma vez que a levedura *M. guilliermondii* foi a que mais se assemelhou à linhagem CAT-1 nos testes de tolerância aos estresses relatados no Capítulo 1, essas duas leveduras foram selecionadas para os testes fermentativos em sistema de reciclo utilizando melaço como meio de fermentação na próxima etapa do trabalho.

Figura 6. Comparativo do log do número de células viáveis/mL das leveduras *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) e não-*Saccharomyces* (*M. guilliermondii*, MG; *W. anomalus*, WA; *S. stipitis*, SS) em meio de caldo (A), melaço (B) e misto (C) ao longo de 24 h de cultivo, a 30°C com agitação.



5. Conclusões

O melaço foi o meio de crescimento que possibilitou maior aumento do número de células de leveduras nas condições de cultivo avaliadas, tanto para as leveduras *S. cerevisiae* quanto para as não-*Saccharomyces*. Quanto ao rendimento em etanol, a linhagem PE-2 apresentou-se maior em 12 h e os valores não diferiram muito nos três meios, diferentemente para a linhagem CAT-1, onde o maior rendimento foi obtido em meio de caldo em 24 h. Os melhores resultados de rendimento foram obtidos em caldo para *S. stipitis* e *W. anomalus*, enquanto para a levedura *M. guilliermondii*, o crescimento foi também melhor em melaço, mas rendimentos muito próximos foram observados tanto em caldo e melaço.

6. Literatura citada

- ALMEIDA, C. S.; NASCIMENTO, D. D.. Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 11, n. 1, p. 99-119, 2021.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267- 1275, 2011.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BETITE, V.C.; MIRANDA JR, M.; OLIVEIRA, J.E.; ERNANDES, J.R. Very high gravity sucrose fermentation by Brazilian industrial yeast strains: Effect of nitrogen supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 174–178, 2012.
- BROWN, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLD, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN. G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 277-290, 2013.
- CAMARGOS, C. V. **Produção de etanol utilizando melaço de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes**. 2019. 99f.

- Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- CRÉPIN, L.; NIDELET, T.; SANCHEZ, I.; DEQUIN, S.; CAMARASA, C. Sequential use of Nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of Nitrogen permeases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 22, 2012.
- DA CUNHA, L. R. R. *et al.* Monitoramento da viabilidade e contaminação bacteriana de um fermento de levedo industrial. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 28582-28593, 2019.
- DELLA-BIANCA, B. E. *et al.* Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS Yeast Research**, v. 14, e. 8, p. 1196–1205, 2014.
- GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; SPARROW, C.; MORGE, C.; ALEXANDRE, H. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. **Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 71–85, 2019.
- HAWAZ, E. *et al.* Bioethanol production from sugarcane molasses by co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* isolate TA2 and *Wickerhamomyces anomalus* isolate HCJ2F-19. **Annals of Microbiology**, v. 74, n. 13, 2024.
- JACOB, A. B.; CAMPOS, R. T. Estudo sobre a viabilidade celular da levedura no processo de fermentação em uma usina de álcool e açúcar. **Environmental Science & Technology Innovation**, v. 1, n.2, p. 108-131, 2023.
- LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial** - Vol. 3: Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Blucher, 2019.
- MENEZES, J. A. S. **Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a capacidade fermentativa das células de leveduras**. 2012. Dissertação (Mestrado); Universidade Federal de Pernambuco: Centro de Ciências Biológicas - Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas, Recife - PE, 2012.
- MONTEIRO, B.; FERRAZ, P.; BARROCA, M.; CRUZ, S.H.; COLLINS, T.; LUCAS, C. Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2018.

- MOLINET, J.; CUBILLOS, F. A. Wild yeast for the future: exploring the use of wild strains for wine and beer fermentation. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 1–8, 2020.
- NASCIMENTO, V.M., FONSECA, G.G. Effects of the carbon source and the interaction between carbon sources on the physiology of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 4, p.349-356, 2019.
- OLIVEIRA, C. A.; FUESS, L.T.; SOARES, L.A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Thermophilic biomethanation of sugarcane molasses comparing single and two-stage systems: Process performance and energetic potential. **Bioresource Technology Reports**. v.12, art. 100590. 2020.
- REIS, V. R. *et al.* Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 48, n. 2, p. 268–274, 2017.
- RODRIGUES, A. B.; SILVA, T. P.; MONTEIRO, R. R.; SILVA, A. L. B.; SILVA, D. L. B.; LUCENA, L. M.; CASOTI, R.; SONEGO, J. L. S. Fermentação extrativa em batelada alimentada com remoção de etanol por CO₂: otimização da vazão de alimentação do mosto. **Revista Caderno Pedagógico**, v.22, n. 1, p. 01-21.2025.
- RODRIGUES, P. H. F. Fermentation of a xylose/xylulose mixture by the yeasts of *S. cerevisiae* And *S. Stipitis*. **Observatório de La Economia Latinoamericana**. v. 21, n. 11, p. 19972-19983. 2023.
- SAMPAIO, A. B. *et al.* Evaluation of the use of nisin to control bacterial contamination in ethanol fermentation of corn. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 32989-33006, 2022.
- SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, J.R. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 624- 630, 2004.
- SILVA, J. G. M.; PINTO, F. C. M.; OLIVEIRA, G. M.; SILVA, A. A.; CAMPOS JÚNIOR, O.; OLIVEIRA DA SILVA, R.; TEXEIRA, V. W.; MELO, I. M. F.; PAUMARTTEN, F. J. R.; SOUZA, T. P.; CARVALHO, R. R.; OLIVEIRA, A. C. A. X.; AGUIAR, J. L. A.; TEXEIRA, Á. A. C. Non-clinical safety study of a sugarcane bacterial cellulose hydrogel. **Research, Society and Development** 9: e960997932. 2020.

- STEFAN R., *et al.* Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, e. 1, p. 39-48, 2015.
- STUPIELLO, J. P. A Cana-de-açúcar como matéria-prima. *In*: PARANHOS, S. B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, v. 2, p. 761-804.1987.
- VASCONCELOS, J. N. Fermentação etanólica. *In*: CALDAS, C.; BORÉM, A.; SANTOS, F. (Ed.). **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas**. 2. ed. Viçosa, MG, 2012.
- VILELA, R. *et al.* Hydrogen production in reactors: The influence of organic loading rate, inoculum and support material. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 44, p. 27259–27271, 2019.
- YAMAKAWA, C. K. **Avaliação da fermentação alcoólica com reciclo de células de hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar em unidade integrada e autônoma**. 2016. 269f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- YING, Z. *et al.* *Pichia anomala* 29X: a resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 7, p. 609-617, 2013.
- ZHA, Y.; HOSSAIN, A. H.; TOBOLA, F.; SEDEE, N.; HAVEKES, M.; PUNT, P. J. *Pichia anomala* 29X: a resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 7, p. 609–617, 2013.

CAPÍTULO 3. DESEMPENHO FERMENTATIVO E VIABILIDADE DE *Meyerozyma guilliermondii* E *Saccharomyces cerevisiae* EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA SOB BATELADA ALIMENTADA COM RECICLO CELULAR E TRATAMENTO ÁCIDO

1. Resumo

A fermentação alcoólica é uma etapa essencial na produção de etanol combustível, onde fatores como composição do mosto, sistema de condução do processo e forma de tratamento do fermento afetam a eficiência do processo. O reciclo celular (sistema Mèlle-Boinot) assim como o uso de ácido sulfúrico no tratamento do fermento para diminuir a contaminação bacteriana e desfloculação do fermento são práticas comuns no sistema industrial brasileiro. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho fermentativo e viabilidade de uma linhagem de *Meyerozyma guilliermondii* em comparação com uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) em processo de fermentação alcoólica em sistema de batelada alimentada com reciclo celular, avaliando o efeito do tratamento das células entre os ciclos fermentativos com ácido sulfúrico. Utilizou-se melaço de cana diluído como mosto de fermentação. Foram realizadas análises de viabilidade celular e físico-químicas (teor alcoólico, pH e açúcares redutores) após cada ciclo de tratamento, durante 6 ciclos fermentativos. O reciclo celular foi um fator determinante para a redução da velocidade fermentativa e da viabilidade celular em ambas as leveduras estudadas. Para *M. guilliermondii*, o tratamento ácido provocou queda na viabilidade, mas não alterou significativamente o rendimento fermentativo, que se manteve em torno de 50% do teórico, sugerindo tolerância ao estresse ácido e reforçando que a limitação principal está relacionada à capacidade fermentativa intrínseca da espécie e ao acúmulo de reciclos. Já para *S. cerevisiae* CAT-1, o tratamento ácido promoveu efeito positivo no rendimento fermentativo, mesmo diante de reduções na viabilidade, no brotamento e na velocidade de fermentação. A levedura *M. guilliermondii* não é competitiva com *S. cerevisiae* no tocante ao rendimento fermentativo, embora tenha demonstrado que mesmo diante do tratamento ácido quanto dos reciclos celulares, consegue manter a viabilidade celular em níveis que não impactam o seu rendimento em etanol, ainda que muito inferior ao demonstrado pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1.

Palavra-chave: Fermentação, Melaço, Reciclo celular, *Saccharomyces*, Não-*Saccharomyces*

2. Introdução

No Brasil, a produção de etanol é predominantemente realizada por meio da fermentação dos açúcares presentes na cana utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Parapouli *et al.*, 2020). Esse processo encontra-se amplamente consolidado nas destilarias nacionais, sendo que a maioria das unidades industriais adota o sistema de fermentação em batelada alimentada (Almeida *et al.*, 2024; Lopes *et al.*, 2016). De acordo com Pacheco (2010), o processo de fermentação em batelada alimentada constitui uma das principais estratégias adotadas pelas usinas sucroalcooleiras no Brasil. Esse método caracteriza-se pela adição gradual do mosto ao reator ao longo do tempo, o que permite um controle mais rigoroso das variáveis do processo, como concentração de açúcares, temperatura e pH.

Durante o processo de fermentação em batelada alimentada, o mosto é adicionado ao *pé-de-cuba* (ou tanque de tratamento), que já se encontra no interior da dorna (reator de fermentação), iniciando-se assim a fermentação. O processo, em condições operacionais ideais, é finalizado em um período médio de 6 a 10 horas. Ao final da fermentação, as células de levedura são separadas por centrifugação, tratadas com ácido para controle da contaminação bacteriana e reaproveitadas em ciclos fermentativos subsequentes, por meio do sistema de reciclo celular (Pacheco, 2010).

Na fermentação com reciclo, a viabilidade celular é, sem dúvida, um aspecto fundamental para o controle do processo. Segundo Naves *et al.* (2010), quanto maior a viabilidade das células, maior tende a ser o desempenho geral do processo fermentativo. Contudo, quando as células sofrem estresse, elas têm sua viabilidade reduzida. Um dos principais desafios é selecionar linhagens de leveduras que sobrevivam às condições industriais e dominem o meio fermentativo.

No processo industrial brasileiro, as leveduras são recicladas até três vezes ao dia e, entre cada reutilização, submetidas à lavagem ácida com ácido sulfúrico diluído (pH 1,5–3,2) por cerca de uma hora, visando controlar a contaminação bacteriana e evitar floculação (Basso, 2008; Prado, 2020). Dados de unidades produtoras de etanol mostraram que o tratamento ácido é realizado comumente na faixa de pH 2,5-2,8 com aproximadamente 4-5% v/v de etanol, advindo do vinho que acompanha a massa celular após a centrifugação (Silva-Neto, 2024). Durante a fermentação, também se utilizam concentrações de 10 a 50 mg/L de ácido para

reforçar o controle da contaminação (Leite *et al.*, 2013). Esse tratamento embora essencial, impõe forte estresse celular. Estudos demonstram que, após o tratamento ácido, há regulação positiva de genes ligados ao transporte e ancoragem de proteínas e à síntese de β -1,3-glucana na parede celular, favorecendo a tolerância ao baixo pH (Lucena, 2012).

O pH ótimo para a fermentação situa-se entre 4,0 e 5,0, sendo que valores mais elevados reduzem o rendimento alcoólico e elevam a produção de ácido acético (Lima *et al.*, 2001; Souza, 2009). Entretanto, no contexto do reciclo celular, a lavagem ácida em pH extremo é indispensável para a estabilidade do processo, e agregado a fatores como temperatura, microaeração e suplementação de nutrientes podem minimizar os impactos desse estresse, melhorando a produtividade e a concentração final de etanol (Rivera *et al.*, 2024).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho fermentativo e viabilidade de uma linhagem de *Meyerozyma guilliermondii* em comparação com uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) em processo de fermentação alcoólica em sistema de batelada alimentada com reciclo celular, avaliando também o efeito do tratamento das células entre os ciclos fermentativos com ácido sulfúrico. Para avaliar o potencial de uma levedura não-*Saccharomyces* para produção de etanol 1G, é importante verificar o efeito que o reciclo celular e o tratamento ácido tem sobre a viabilidade celular e os parâmetros fermentativos, uma vez que tanto o reciclo quanto o tratamento ácido são práticas comuns no processo industrial brasileiro de produção de bioetanol.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

Foi utilizada a levedura *M. guilliermondii* (isolada de caldo de cana, linhagem 311-CCT7783, Martini *et al.*, 2016) e uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* (CAT-1). Essas linhagens de leveduras estão depositadas no banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar-Campus de Araras, mantidas em *slants* em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 20 g/L peptona e 20 g/L agar, em água destilada), a 4°C.

3.2 Preparo dos inóculos das leveduras e meios

O melaço foi obtido na Usina Santa Lúcia (Araras-SP), na safra 2023/2024. Após coleta na usina, o melaço foi armazenado em garrafas plásticas em *freezer*. Para a propagação das células, o melaço foi diluído para a concentração de 10% de açúcar redutor total (ART), e para a fermentação os meios foram preparados para 15% de ART.

Para o preparo do inóculo das leveduras, foram transferidas alçadas de leveduras recém-crescidas em placas de Petri com o meio YPD, para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio YPD líquido (4% de Glicose). Os frascos foram mantidos durante 24 horas a 30°C, a 160 rpm. Após esse período os inóculos foram transferidos para Erlenmeyers de 2 L com os meio de melaço a 10% de ART, previamente autoclavados. A propagação do inóculo teve duração de 72h em condições estáticas a 30°C, e durante esse processo, os frascos foram agitados de tempos em tempos para liberar o CO₂ aprisionado.

3.3 Padronização dos inóculos

Após o período de propagação, o vinho foi separado do creme de levedura e armazenado em frascos Erlenmeyers. Foi determinado o teor alcoólico do vinho por destilação da amostra e análise em densímetro digital Anton-Paar. Para a padronização do inóculo, foram adicionados cerca de 30 mL do creme de levedura em um tubo falcon previamente pesado, centrifugado a 4500 rpm por 15 min, sendo o sobrenadante descartado. A massa de levedura no tubo Falcon foi de aproximadamente 4 g (em base úmida). Se necessário foi adicionado volume adicional do creme de levedura para atingir a massa desejada por tubo.

3.4 Fermentação em batelada com reciclo celular e tratamento das células

Foi utilizado como meio de fermentação o melaço a 15% de ART, seguindo a metodologia descrita por Raghavendran *et al.* (2017). O pé-de-cuba (volume final de aproximadamente 12 mL) foi preparado adicionando à massa de levedura (cerca de 4 g de massa úmida) um volume de 2 mL do vinho da propagação e um volume de até 6 mL de água destilada estéril. A concentração de etanol foi corrigida considerando-se a porcentagem (v/v) de etanol do vinho acrescido ao tratamento, considerando o volume final de 5% (v/v). Em seguida foram adicionados 9,25 mL do meio de fermentação, sendo o peso do tubo anotado antes e depois da adição do

meio. Após essa etapa, os tubos foram levados para incubadora a 30 °C sem agitação. O meio de fermentação foi adicionado após 2 e 4h. Em intervalos de 2h (durante e após o processo de alimentação do mosto), os tubos foram agitados levemente para o desprendimento do CO₂ e em seguida pesados. Esse procedimento se repetiu até 10 h do início da alimentação, sendo que a seguir, os tubos foram retirados da incubadora e mantidos na bancada no período da noite, e novamente pesados no dia seguinte, totalizando cerca de 20 h de fermentação.

No final de cada ciclo de fermentação, os tubos foram homogeneizados, centrifugados a 4500 rpm por 15 min, sendo o sobrenadante armazenado em tubo falcon de 50 mL para as análises físico-químicas. Os tubos com a massa celular foram novamente pesados, e em seguida, a biomassa da levedura foi tratada com ácido sulfúrico, seguindo para um novo ciclo de fermentação. Após o tratamento com o ácido, uma alíquota de 1 mL foi coletada para análise microbiológica. Foram realizados 6 ciclos de fermentação, e todos os testes conduzidos em triplicatas.

O tratamento ácido foi realizado da seguinte maneira: adicionou-se 2 mL do vinho de propagação juntamente com um volume de até 6 mL de água destilada estéril. O teor alcoólico foi ajustado para 5% (v/v) com etanol absoluto com base no teor alcoólico do vinho adicionado, subtraindo-se proporcionalmente o volume de água. Foram adicionadas gotas de uma solução de ácido sulfúrico 1 N monitorando o pH em pH-metro digital para o valor de 2,5. As amostras foram levadas à incubadora com agitação de 160 rpm, 30 °C por 2h. Após o tratamento, esse pé-de-cuba seguiu para um novo ciclo fermentativo (adição do mosto de melaço) conforme descrito acima. Foi realizado um tratamento controle, ou seja, sem adição de ácido sulfúrico.

Foram realizadas 4 séries de experimentos: com a levedura *M. guilliermondii* com e sem tratamento ácido; e com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 com e sem tratamento ácido.

Os pesos obtidos após a pesagem de cada tubo foram utilizados para calcular o desprendimento de CO₂ em mmol/g biomassa úmida. A velocidade de fermentação (mmol CO₂/g biomassa úmida/h) foi calculada com base na regressão linear dos resultados obtidos para o desprendimento de CO₂ no intervalo de tempo de 0 a 8 h, para cada tubo, considerando-se a inclinação da reta como a velocidade de fermentação.

3.5 Análises microbiológicas

Foi retirado 1 mL de amostra após o tratamento das células (com e sem ácido sulfúrico), em cada ciclo fermentativo, para as análises microbiológicas. A partir da amostra corada com solução de azul de metileno - citrato de sódio, segundo Lee, Robinson e Wang (1981), foi contado o número de células vivas, o número de células mortas e o número de células vivas com brotamento utilizando a câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como número de células viáveis/mL (transformado em log), percentual de brotamento (número de células vivas com brotamento em relação ao número total de células vivas) e viabilidade celular (número de células vivas em relação ao número total de células, em %).

3.6 Análises físico-químicas

Ao final de cada ciclo fermentativo, as células foram retiradas do meio de fermentação por centrifugação, a 4500 rpm por 15 min, em centrífuga Eppendorf®, e o sobrenadante foi armazenado em tubos Falcon, a -10°C para as análises físico-químicas. O pH foi analisado utilizando pH-metro digital MS Tecnopon mPA210; o etanol (em g/100 mL), por meio da destilação de 5 mL das amostras em microdestilador Tecnal TE-012, e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital Anton-Paar®, conforme Amorim (1997). O teor de açúcar redutor total (ART) foi determinado pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) (MILLER, 1959, modificado). Para a quantificação desses açúcares, foi realizada hidrólise ácida para conversão da sacarose em glicose+frutose (ambos açúcares redutores). Foram transferidos 3 mL de cada amostra para balões volumétricos de 10 mL, sendo em seguida, adicionados de 250 µL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Em seguida, os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em banho térmico (água gelada) e em seguida adicionados 280 µL de solução de NaOH 12 mol/L e completado o volume do balão até o menisco com água destilada.

Após a hidrólise, foi retirado 1 mL de cada solução preparada, transferindo para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, resfriadas em água corrente, e em seguida foram adicionados 5 mL de água destilada em cada tubo.

Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex, sendo realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (ThermoBiomate®). Um ensaio em branco foi conduzido substituindo a amostra por água destilada. Para o cálculo do ART foi elaborada uma curva padrão utilizando-se solução de glicose. A concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação da reta obtida a partir da curva padrão, conforme descrita abaixo:

$$ART (g/L) = \frac{A_{540nm} + 0,0329 * Diluição}{0,6510}$$

O rendimento em etanol (g de etanol produzido/g de ART consumido) foi calculado com base nos resultados de teor alcoólico (g/100 mL) e consumo de ART (concentração inicial - concentração final, em g/100 mL). O rendimento foi calculado com base no teor alcoólico corrigido, ou seja, descontando-se o volume adicionado de etanol na fase de tratamento celular. Da mesma forma, a concentração de ART inicial foi corrigida considerando-se a concentração de ART do meio de melão e o fator de diluição gerado após alimentação do mosto em três parcelas de 9,25 mL em um volume de pé-de-cuba de 12 mL (diluição de 1,43 X).

3.7 Análise estatística

Para as variáveis e parâmetros avaliados (log do número de células viáveis/mL, percentual de brotamento, viabilidade, rendimento, pH e velocidade de fermentação), foi calculada a média das triplicatas e o desvio-padrão, em cada ciclo fermentativo, para cada um dos tratamentos utilizados na fermentação (com ou sem ácido). Os resultados foram avaliados por Análise de Variância para dois fatores (*Two-way anova*), considerando-se 'Ciclo' e 'Tratamento' como os fatores, mostrando a significância ao nível de 5% para cada fator e variável estudada.

Uma análise comparativa somente entre as leveduras/tratamentos (2 leveduras e 2 tratamentos, total de 4) foi feita por *One-way anova*, considerando os ciclos como repetições. Quando houve diferença significativa a 5%, os resultados foram comparados por meio do teste de Tukey a 5%. Nesse caso, os dados obtidos nos experimentos foram apresentados por meio de *box plots*, com o objetivo de visualizar a distribuição, média e dispersão das variáveis estudadas.

Utilizou-se o software *Past (Palaeontological Statistics)*, versão 4.03 (Hammer; Harper; Ryan, 2001) para a análise estatística.

4. Resultados e Discussão

4.1 Testes fermentativos com a levedura *M. guilliermondii*

Os perfis de desprendimento de CO₂ e velocidade de fermentação com a levedura *M. guilliermondii*, com e sem tratamento com ácido sulfúrico, estão apresentados na Figura 1A. Observou-se valor em torno de 12-14 mmol de CO₂/g de biomassa no primeiro ciclo, decrescendo ao longo dos ciclos, independentemente do tratamento. A velocidade de fermentação diminuiu significativamente ao longo dos ciclos e entre os tratamentos, sendo de uma forma geral menor com tratamento ácido (Figura 1B, Tabela 1).

O número de células viáveis e o percentual de brotamento não mostraram variação significativa entre os tratamentos, somente entre os ciclos (aumento ao longo dos ciclos) (Figura 2A e 2B, Tabela 1). Em relação à viabilidade (%), houve diminuição significativa entre os ciclos fermentativos e entre os tratamentos, de forma que para a fermentação sem tratamento ácido, o percentual variou de 87,1% a 82,3%, e para a fermentação com tratamento ácido variou de 90 a 76,2% (Figura 2C, Tabela 1). Estes resultados indicam que o tratamento ácido levou à morte de células, mas o incremento no percentual de brotamento ao longo dos ciclos não foi suficiente para manter a viabilidade nos mesmos níveis que no experimento sem tratamento ácido, impactando a viabilidade celular.

Os resultados referentes ao teor alcoólico (g/100 mL), concentração de ART residual (g/100 mL) e pH final das fermentações com a linhagem *M. guilliermondii* ao final de cada ciclo fermentativo estão apresentados na Figura 3. Na fermentação com tratamento ácido, houve uma diminuição mais acentuada do pH de 5,14 para 4,68; na fermentação sem tratamento ácido o pH mantém-se próximo de 5,17 a 5,05, com pequenas variações (Figura 3A). Essa resposta pode ser explicada por dois fatos: a liberação de CO₂ no processo fermentativo, incrementado pelo avanço dos ciclos fermentativos, resulta em diminuição do pH pela formação de ácido carbônico em reação com a água; e o ajuste do pH da solução no estágio de tratamento para 2,5, sendo que após o tempo de tratamento ocorreu a alimentação

com o melaço diretamente sobre essa solução, colaborando para a diminuição mais acentuada do pH na fermentação com tratamento ácido.

Figura 1. Perfis de desprendimento de CO₂ (mmol/g de biomassa úmida, A) e velocidade de fermentação (mmol CO₂/g de biomassa úmida/h, B) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada em melaço de cana com a levedura *M. guilliermondii*, com (cor preta) e sem tratamento (cor azul) com ácido sulfúrico.

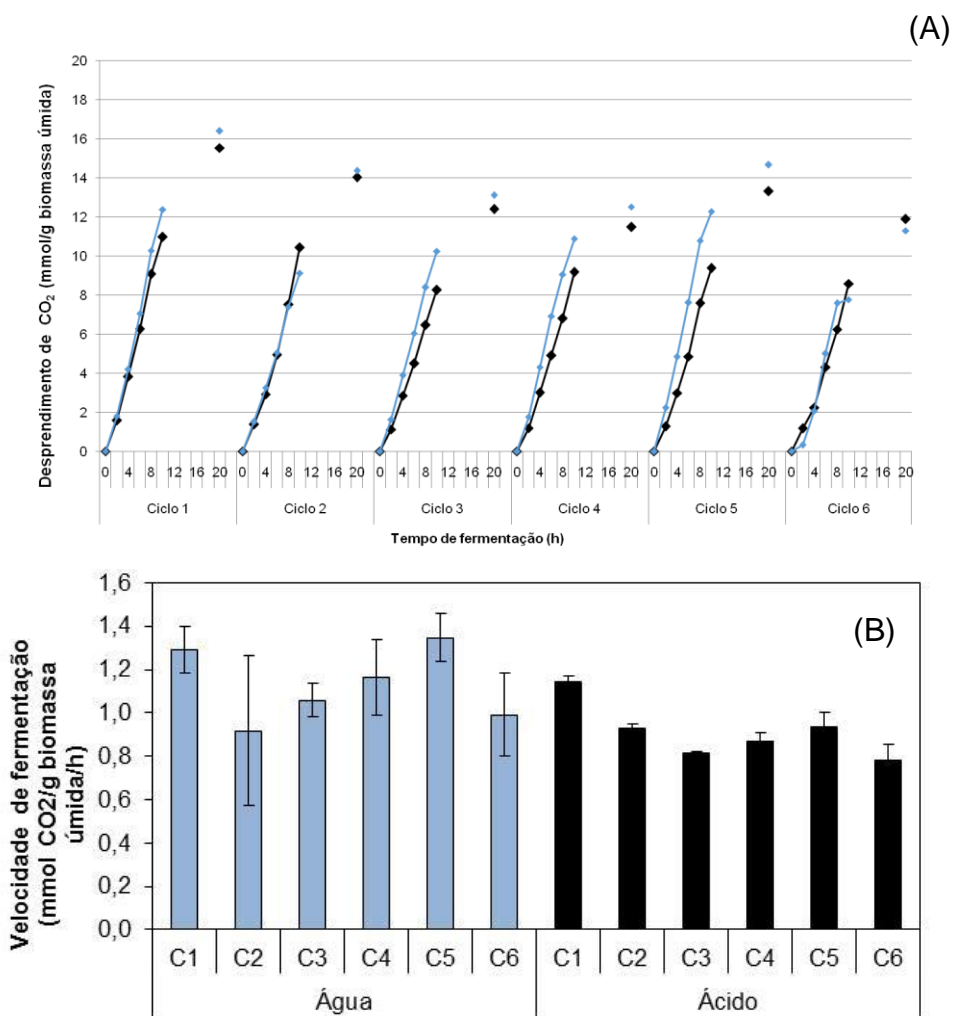


Tabela 1. Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da levedura *M. guilliermondii* em melaço de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

Variável/Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Velocidade de fermentação (mmol CO ₂ /g biomassa/h)	*	*	n.s.
Brotamento (%)	n.s.	*	n.s.
Log do número de células viáveis (células/mL)	n.s.	*	*
Viabilidade (%)	*	*	n.s.
Rendimento (g etanol/g ART)	n.s.	*	*
pH final	*	*	*

n.s.= não significativo ($p>0,05$) * = significativo a 5% ($p<0,05$)

Figura 2. Log do número de células/mL (A), viabilidade celular (%), B) e percentual de brotamento (%), C) da levedura *M. guilliermondii* ao longo dos reciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com melaço de cana, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba.

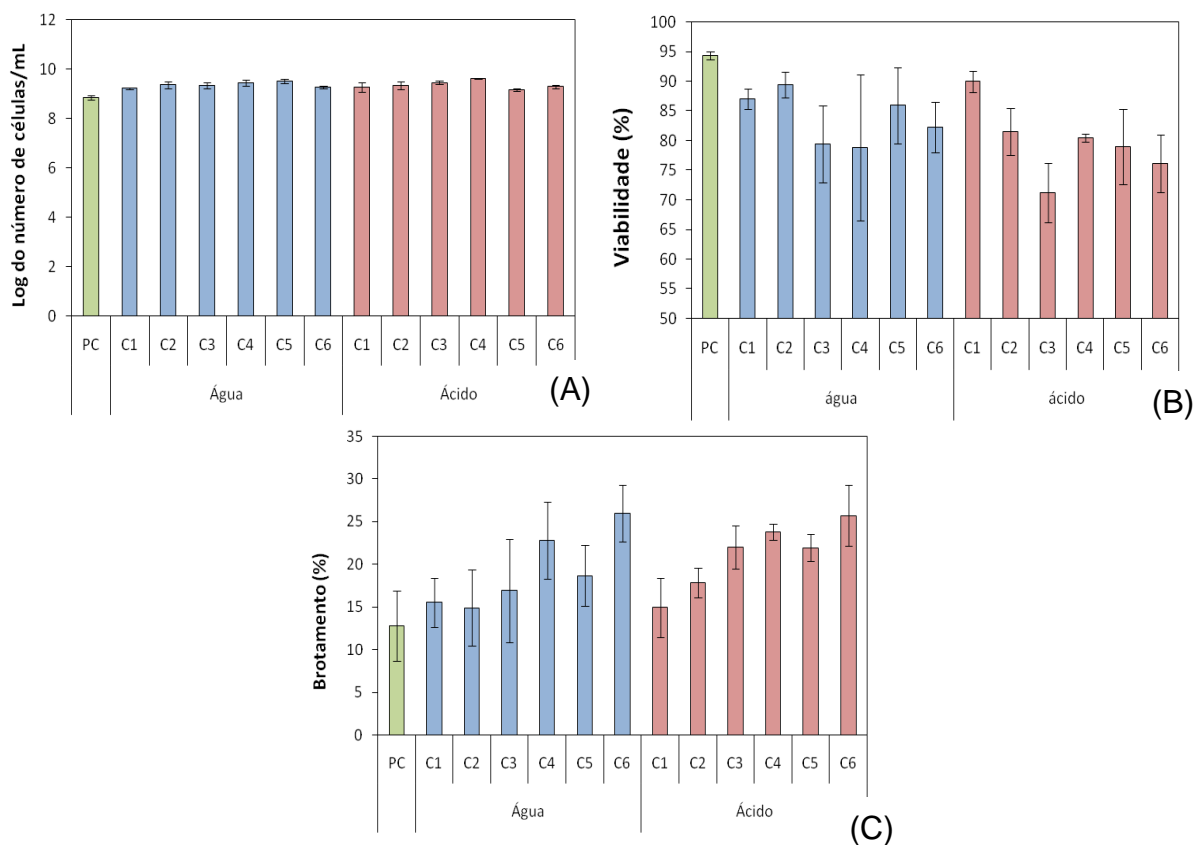
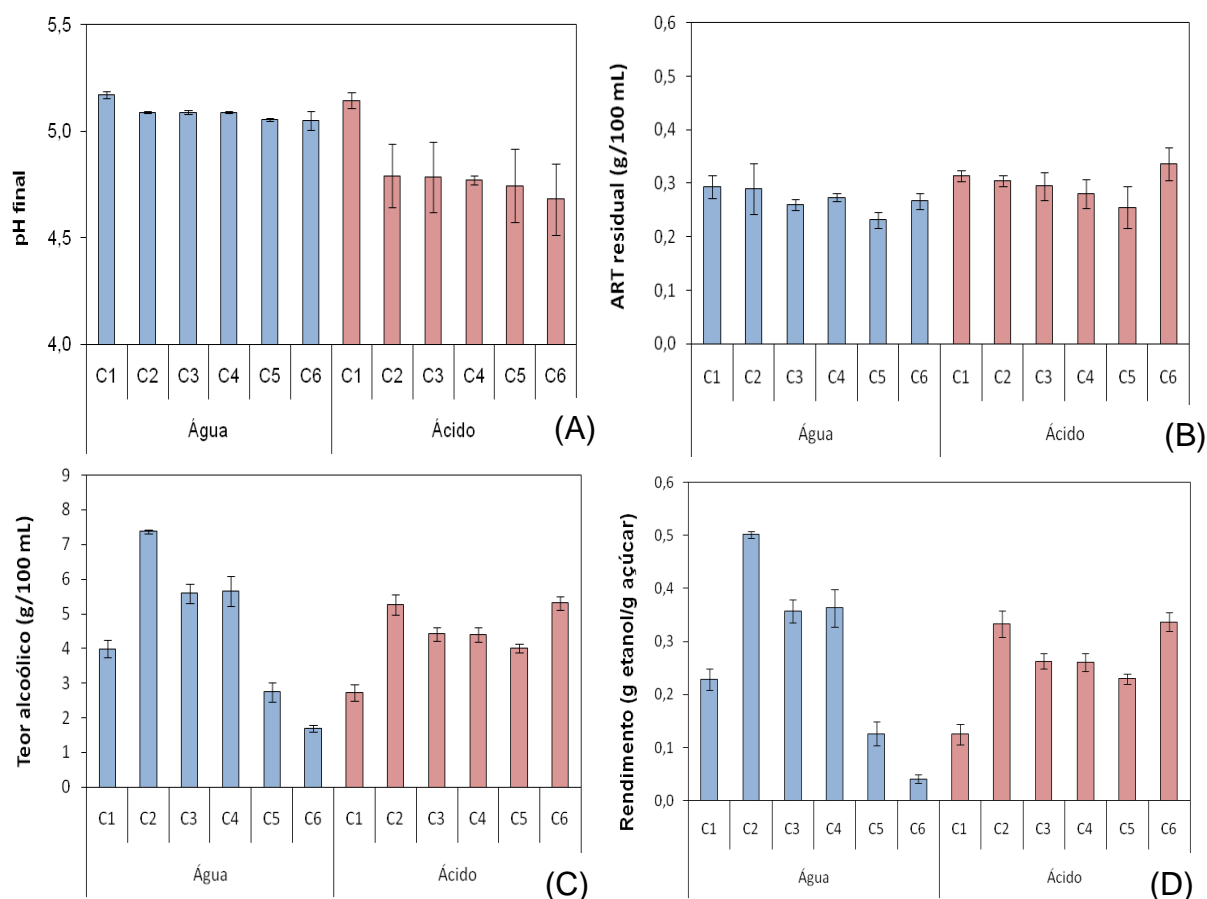


Figura 3. pH final (A), concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL, B), teor alcoólico (g/100 mL, C) e rendimento (g etanol/g açúcar) D) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com melaço de cana com a levedura *M. guilliermondii*, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico.



A concentração de açúcar redutor total (ART) variou de aproximadamente 0,2 a 0,3 g/100 mL (Figura 3B). O teor alcoólico oscilou entre os ciclos de fermentação, com um aumento do 1º para o 2º ciclo, permanecendo praticamente constante até o final do 6º ciclo para o experimento com tratamento ácido. Sem tratamento ácido, embora o aumento do teor alcoólico tenha sido maior do 1º para o 2º ciclo fermentativo, houve uma queda progressiva atingindo cerca de 1-2 g/100 mL no final do 6º. Ciclo (Figura 3C).

Quando se analisa o parâmetro rendimento fermentativo, que mostra a relação entre a produção de etanol e açúcar consumido, houve diferença entre os ciclos, mas não entre os tratamentos (rendimento médio de 0,26 g/g). Há interação significativa entre ciclo e tratamento, sendo mais prejudicial na situação sem tratamento ácido (Figura 3D, Tabela 1).

Os resultados dos testes fermentativos com a levedura *M. guilliermondii* mostraram que o reciclo celular pareceu ter mais impacto sobre a fermentação do que o tratamento ácido em si, embora tenha havido uma velocidade de fermentação menor e menor viabilidade celular na situação com tratamento ácido. Essa levedura mostrou tolerância ao estresse ácido (resultados apresentados no Capítulo 1), de forma que o tratamento ácido não deve ser um fator limitante ao se prospectar o emprego dessa levedura no processo industrial. Testando a tolerância dessa mesma linhagem a inibidores de hidrolisados lignocelulósicos tais como o ácido acético, Perna *et al.* (2018) verificaram que *M. guilliermondii* consome ácido acético e cresce em baixo pH.

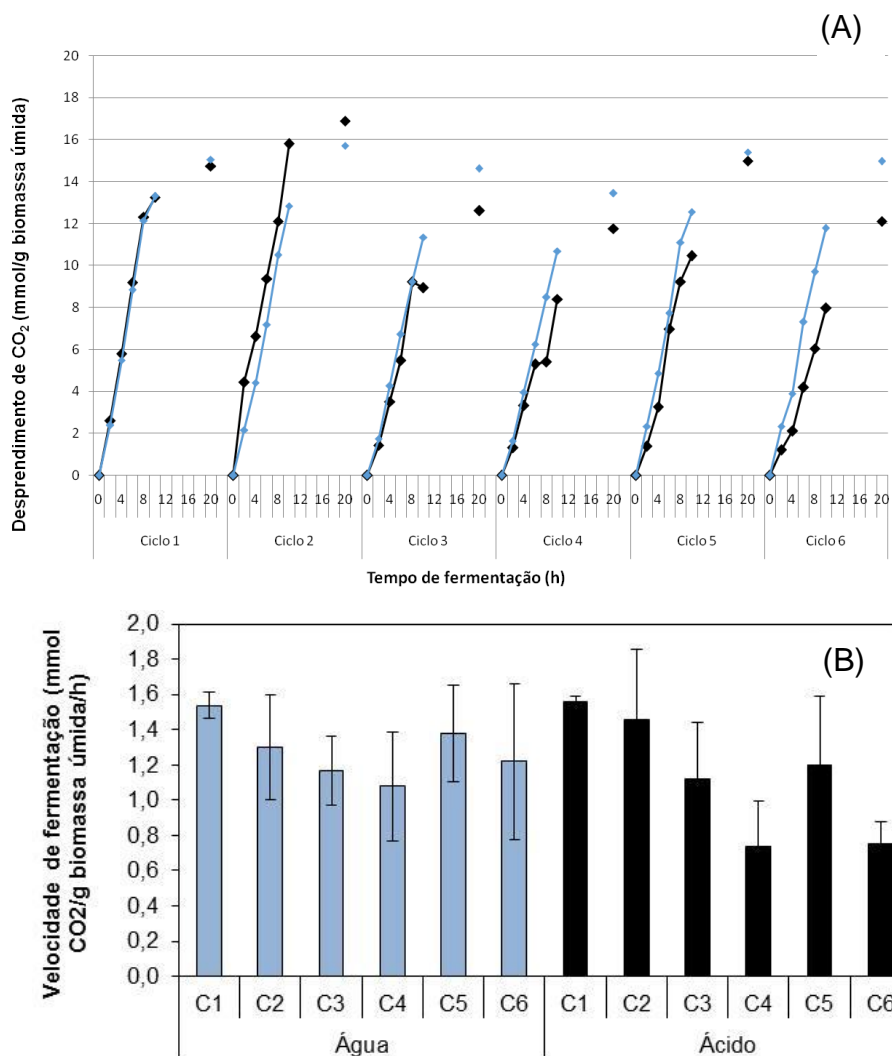
O efeito do tratamento ácido sobre a viabilidade celular não prejudicou o potencial fermentativo, pois a questão principal parece ser realmente a capacidade fermentativa dessa levedura aliada à situação de reciclo celular, pois o rendimento fermentativo foi cerca de 50% do rendimento teórico (0,51 g/g) sem ou com tratamento ácido. Não foram encontrados na literatura estudos que evidenciem resultados semelhantes utilizando essa levedura em mosto de sacarose. Segundo Martini *et al.* (2016), em meio sintético, essa linhagem de *M. guilliermondii* mostrou moderada eficiência de crescimento e consumo de açúcares (pentoses/hexoses) em pH 5,5. No meio hidrolisado, os autores verificaram que a detoxificação aumentou a biomassa e a suplementação com extrato de levedura melhorou o rendimento de etanol.

4.2 Testes fermentativos com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1

Os perfis de desprendimento de CO₂ e velocidade de fermentação com a linhagem *S. cerevisiae* CAT-1, com e sem tratamento ácido, estão apresentados na Figura 4. Observou-se que o desprendimento de CO₂ ao longo dos reciclos é superior na condição sem tratamento ácido principalmente a partir do 3^o. ciclo (Figura 4A).

Para a velocidade de fermentação, expressa como mmol CO₂/g de biomassa úmida/h representada na Figura 4B, houve diferença significativa somente entre os ciclos mas não entre os tratamentos (Tabela 2). É possível observar um padrão de decaimento na velocidade de fermentação do 1^o ao 4^o ciclo nos tratamentos com e sem o ácido. No 5^o ciclo ocorre um aumento na velocidade, baixando novamente no 6^o, sendo esse decaimento mais acentuado nas células tratadas com ácido.

Figura 4. Perfis de desprendimento de CO₂ (mmol/g de biomassa úmida, A) e velocidade de fermentação (mmol CO₂/g de biomassa úmida/h, B) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com melaço de cana com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, com (cor preta) e sem tratamento (cor azul) com ácido sulfúrico.



Na figura 5A é possível observar que o número de células/mL apresentou variação significativa somente ao longo dos ciclos. Quanto à viabilidade (Figura 5B), observou-se diferença significativa entre os tratamentos e entre os ciclos (Tabela 2). Na fermentação sem tratamento ácido, ocorre um decaimento do 1º ao 4º ciclo de 95,6 para 74,6%, nos ciclos seguintes a viabilidade aumenta para 82,3%. Para a fermentação tratada com ácido ocorre uma diminuição da viabilidade do 1º para o 2º ciclo de 95,7 para 78,2%, o qual se manteve na faixa de 78,1% nos ciclos seguintes (Figura 5B).

Tabela 2. Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) com melão de cana da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em melão de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

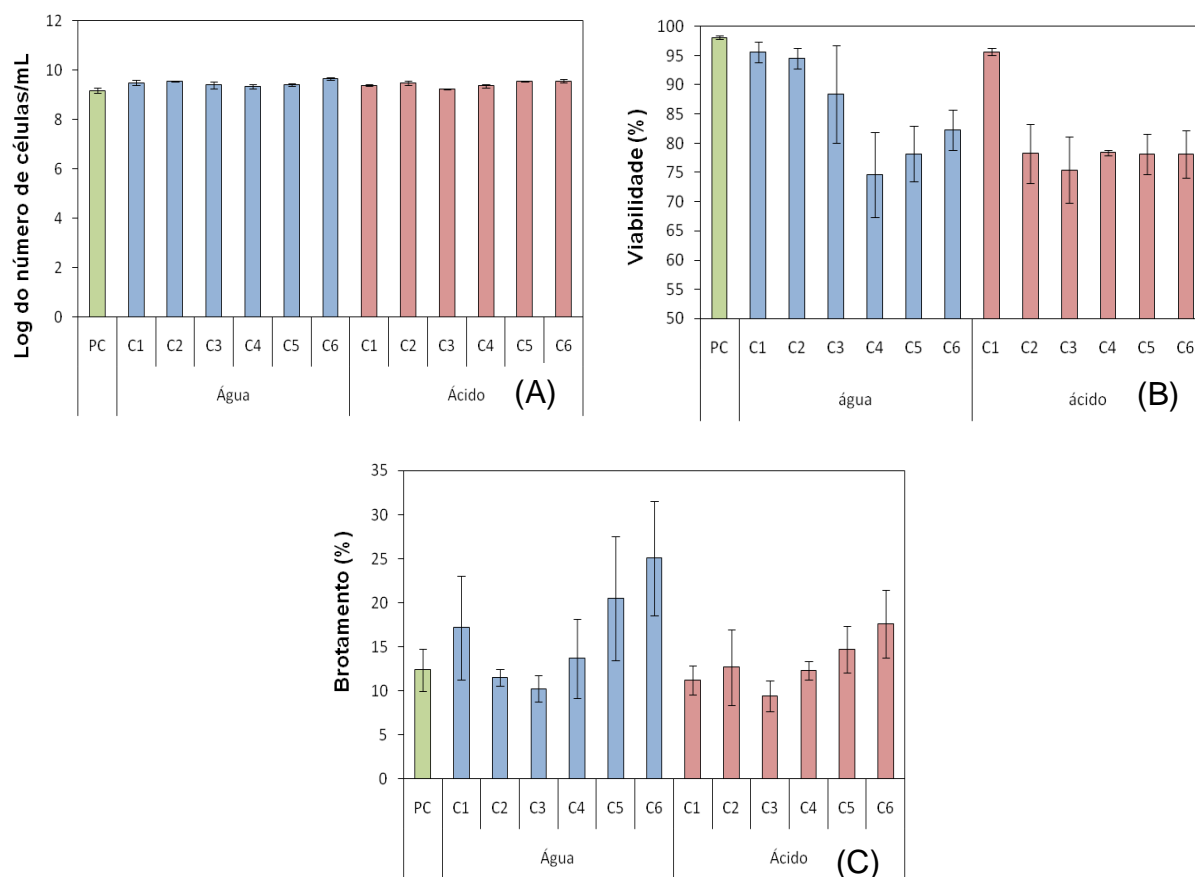
Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Velocidade de fermentação (mmol CO ₂ /g biomassa/h)	n.s.	*	n.s.
Brotamento (%)	*	*	n.s.
Células viáveis (células/mL)	n.s.	*	*
Viabilidade (%)	*	*	*
Rendimento (g etanol/g açúcar redutor total)	*	*	*
pH final	*	*	*

n.s.= não significativo ($p>0,05$) *= significativo a 5% ($p<0,05$)

O percentual de brotamento variou significativamente entre os tratamentos e entre os ciclos (Tabela 2), sendo maior no tratamento sem o ácido, com aumento gradativo do 3º ao 6º ciclo, de 12,4 para 25,6%. Na fermentação tratada com ácido, o percentual de brotamento foi menor quando comparado com o tratamento sem o ácido, no entanto, ocorreu um aumento gradual entre o 3º ao 6º ciclo (Figura 5C).

Os resultados referentes ao teor alcoólico (g/100 mL), concentração de ART residual (g/100 mL) e pH final das fermentações com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 ao final de cada ciclo fermentativo estão apresentados na Figura 6. O pH apresentou diferença significativa entre os ciclos e os tratamentos (Tabela 2). Como explicado anteriormente para a *M. guilliermondii*, essa resposta pode ser explicado por dois fatos: a liberação de CO₂ no processo fermentativo, incrementado pelo avanço dos ciclos fermentativos, resulta em diminuição do pH pela formação de ácido carbônico em reação com a água; e o ajuste do pH da solução no estágio de tratamento para 2,5, sendo que após o tempo de tratamento ocorreu a alimentação com o melão diretamente sobre essa solução, colaborando para a diminuição mais acentuada do pH na fermentação com tratamento ácido. Nas fermentações sem tratamento ácido, o pH manteve-se próximo de 5, enquanto que, nas fermentações com tratamento ácido, os valores permaneceram ao redor de 4,5.

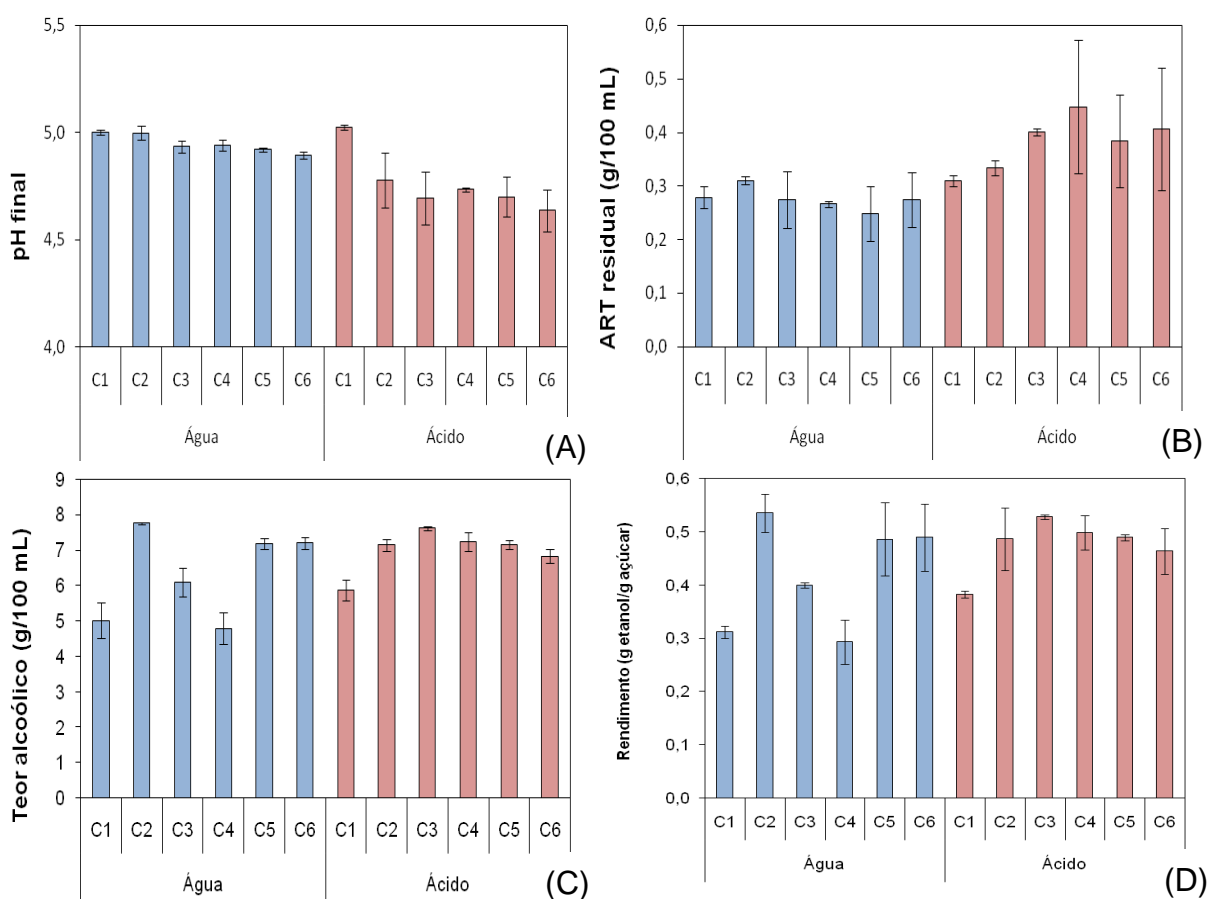
Figura 5. Log do número de células/mL (A), viabilidade celular (%), (B) e taxa de brotamento (%), (C) da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba.



Em relação ao ART residual (Figura 6B), os valores variaram entre 0,3 e 0,5 g/100 mL. Quanto ao teor alcoólico, houve oscilações nos três primeiros ciclos no tratamento com água, ao contrário do tratamento ácido onde os valores foram mais constantes. Ao final do 6º ciclo fermentativo, os valores são similares (Figura 6C).

O rendimento em etanol (g/g) apresentou variação entre os ciclos e entre os tratamentos (Tabela 2). Em média, o rendimento foi de 0,42 e 0,48 g/g para a fermentação sem e com tratamento ácido, respectivamente. Nas fermentações com tratamento ácido, observou-se um aumento gradual no rendimento ao longo dos três primeiros ciclos, seguido de um declínio nos ciclos subsequentes. Já nas fermentações sem tratamento, houve uma leve queda entre o 2º e o 4º ciclo, com posterior aumento e estabilização do rendimento nos ciclos 5 e 6 (Figura 6D).

Figura 6. pH final (A), concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL, B), teor alcoólico (g/100 mL, C) e rendimento (g etanol/g açúcar) D) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com melaço de cana com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico.



Os resultados dos testes fermentativos com a levedura *S. cerevisiae* (linhagem industrial CAT-1) mostraram que o ciclo celular teve impacto sobre a fermentação, mas o tratamento ácido teve efeito benéfico sobre o rendimento fermentativo. Em comparação com a levedura *M. guilliermondii*, o tratamento ácido teve mais influência sobre a fermentação, porém de uma forma positiva considerando o rendimento fermentativo, a despeito do efeito sobre a velocidade de fermentação, brotamento e viabilidade. Os efeitos do tratamento ácido sobre a levedura ainda não são bem conhecidos.

A resistência ao estresse ácido é amplamente associada à presença de carboidratos de reserva, como glicogênio e trealose, que desempenham um papel protetor frente às condições adversas (Basso *et al.*, 2008). De acordo com Basso *et al.* (2011), leveduras industriais tendem a acumular maiores quantidades de trealose

e glicogênio em comparação com às leveduras não industriais. Esse acúmulo de carboidratos de reserva é uma característica adaptativa importante para processos industriais contínuos, onde a capacidade de tolerância ao estresse é crucial para a manutenção da viabilidade celular e para a eficiência do processo fermentativo ao longo do tempo.

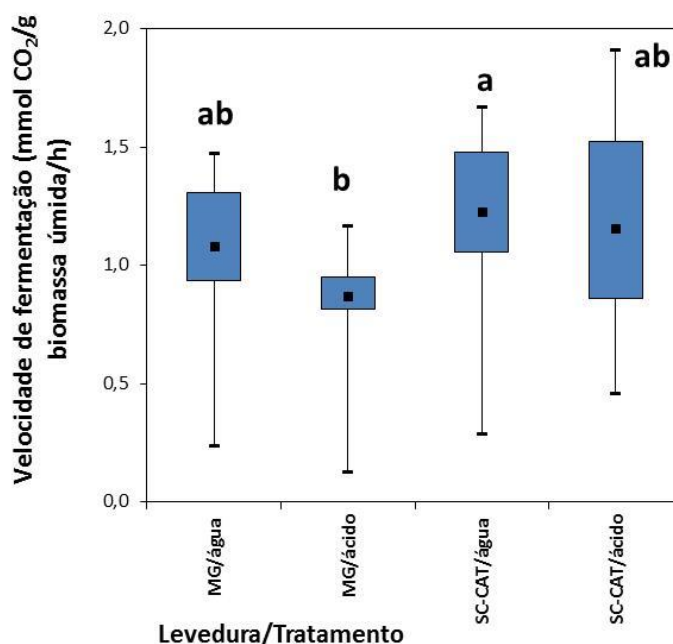
4.3 Análise comparativa dos testes fermentativos com *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae*

As fermentações conduzidas com as duas leveduras, uma não-*Saccharomyces* (*M. guilliermondii*) e uma *S. cerevisiae* (linhagem industrial CAT-1), foram comparadas utilizando os gráficos *box plot*. A fim de facilitar a comparação, os ciclos foram considerados como repetições, e assim utilizou-se a análise de variância com uma variável somente (levedura/tratamento), comparando-se, portanto entre quatro fermentações (duas leveduras e dois tratamentos). No modelo *box plot* é possível avaliar a variação existente entre os ciclos pelo tamanho dos boxes e os pontos máximo e mínimo.

A maior velocidade de fermentação ($\text{mmol CO}_2/\text{g}$ biomassa úmida/h) foi observada com a fermentação com a levedura CAT-1 sem tratamento ácido, porém ela só diferiu significativamente da fermentação com a levedura *M. guilliermondii* no tratamento ácido (Figura 7). De acordo com Raghavendran *et al.* (2017), menor taxa de liberação de CO_2 nem sempre está associada a menor capacidade fermentativa, já que parte do carbono pode ser desviada para a produção de carboidratos de reserva, como glicogênio e trealose, compostos utilizados para proteção celular e tolerância ao estresse. O acúmulo de carboidratos de reserva é uma característica comum em linhagens industriais, que possuem mecanismos otimizados de armazenamento energético (Zhang *et al.*, 2020).

Segundo Zhang *et al.* (2020), a síntese de ergosterol, componente essencial da membrana celular das leveduras, é dependente da presença de oxigênio e contribui significativamente para a resistência celular durante os ciclos fermentativos. Essa estabilidade de membrana é uma das características que garante a viabilidade e resiliência de linhagens industriais como a CAT-1.

Figura 7. *Box plot* da velocidade de fermentação (mmol CO₂/g biomassa úmida/h) das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo.



Todas as fermentações apresentaram valores semelhantes para o log do número de células/mL. Esses resultados indicam que as diferentes condições aplicadas não exerceram impacto significativo sobre a concentração de células para nenhuma das duas leveduras, independentemente da aplicação do tratamento ácido. A representação dos *boxes* e das linhas verticais mínima e máxima indica pouca variação dos valores também entre os ciclos fermentativos (Figura 8).

Referente ao percentual de brotamento (%), os menores valores foram obtidos com a levedura *S. cerevisiae*, estatisticamente diferentes daqueles obtidos com a levedura *M. guilliermondii*, independentemente do tratamento ácido, exceção às fermentações sem tratamento ácido para as duas leveduras, cujas médias foram estatisticamente iguais (Figura 9). Apesar do menor percentual de brotamento para a levedura *S. cerevisiae*, não houve diferença significativa entre as leveduras nos dois tratamentos quanto à viabilidade celular (Figura 10).

Figura 8. *Box plot* do log do número de células viáveis/mL das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo.

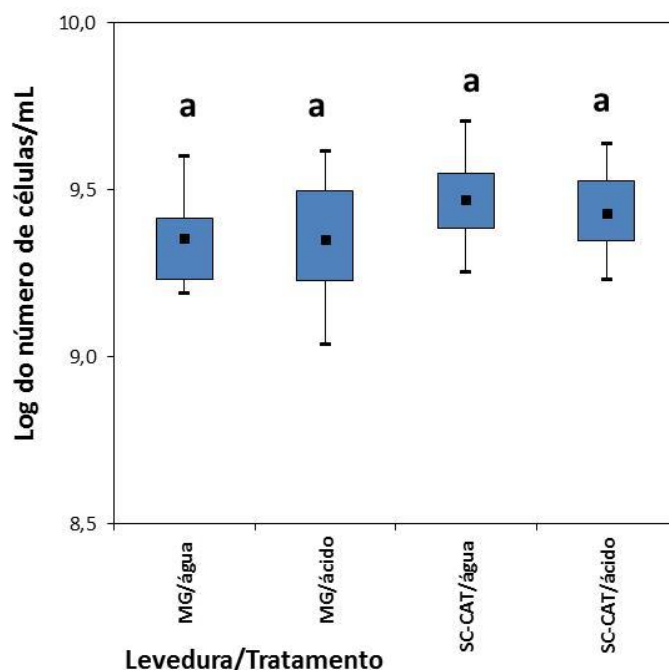


Figura 9. *Box plot* do percentual de brotamento(%) das leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo.

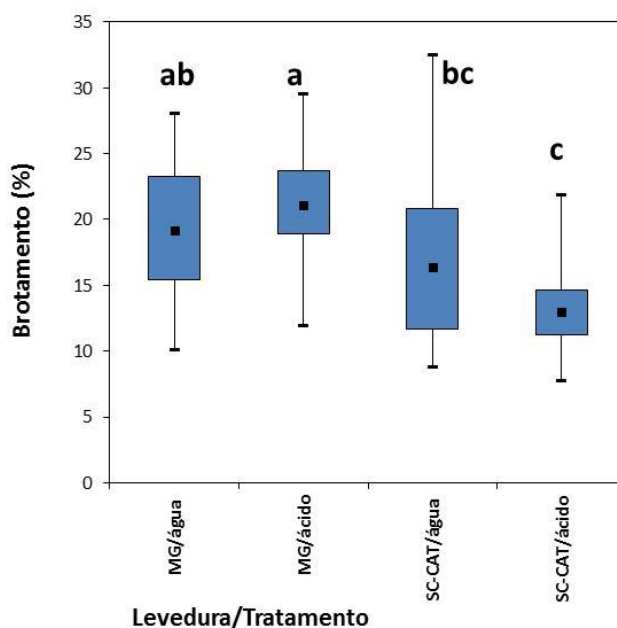
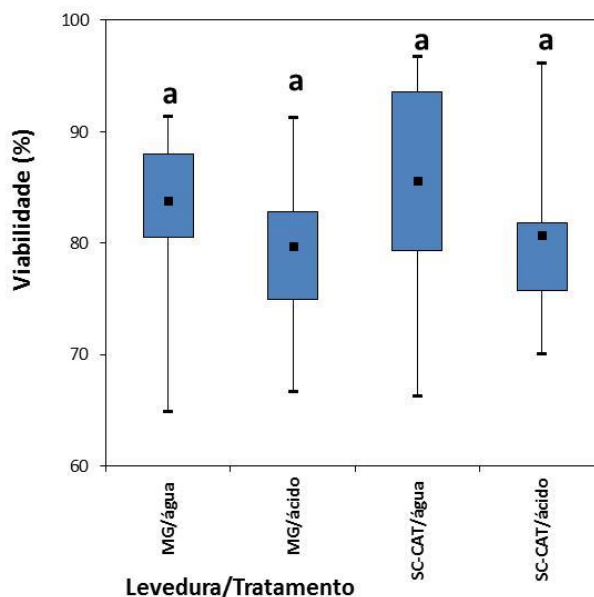


Figura 10. Box plot da viabilidade (%) das leveduras *M. guilliermondii*(MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos boxes azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo.



A manutenção da viabilidade celular é fundamental para o sucesso em processos com ciclos, sendo recomendado que a perda por ciclo não ultrapasse 15% da massa celular ao final do ciclo, sob o risco de comprometer a atividade fermentativa (Westman *et al.*, 2020). Para evitar essa situação, procedimentos podem ser adotados para aumentar a vida útil das leveduras, tais como tratamentos de revitalização, seleção de cepas adaptadas e nutrição suplementar (Ribeiro *et al.*, 2022).

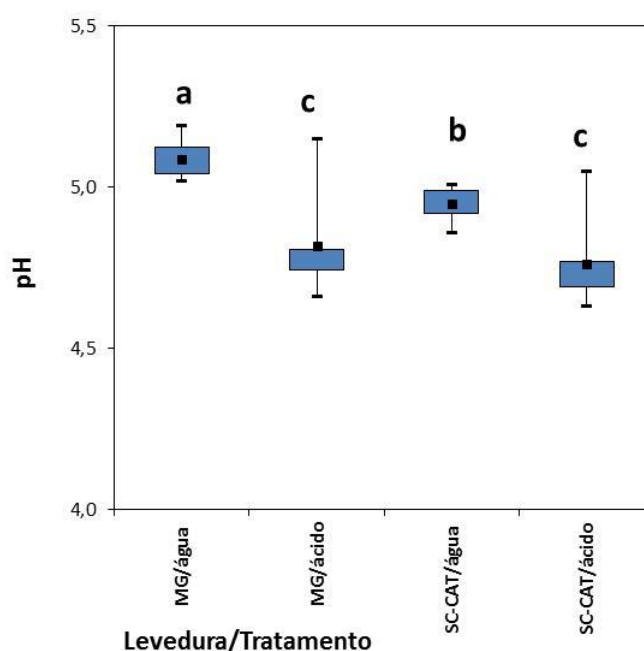
Portanto, na comparação entre as leveduras quanto à viabilidade celular no processo de fermentação em batelada alimentada conduzida com ciclos celulares e com tratamento ácido, práticas comuns no ambiente industrial, o perfil da levedura *M. guilliermondii* não difere muito do perfil da linhagem industrial de *S. cerevisiae*, sendo capaz de manter a viabilidade celular nessas condições.

Quanto ao pH, como já discutido anteriormente, os menores valores foram obtidos com as duas leveduras no tratamento ácido devido ao fato de a alimentação do mosto ocorrer no pé-de-cuba onde foi realizado o tratamento ácido. Nas fermentações conduzidas sem tratamento ácido, o pH da fermentação foi menor com a levedura *S. cerevisiae* (Figura 11). A literatura aponta que o pH ideal para o

crescimento e multiplicação das leveduras encontra-se entre 4,5 e 5,5 (Dias *et al.*, 2019; Câmara; Guimarães, 2024), sendo que o pH de 3,0 atua como pressão seletiva sobre linhagens menos tolerantes (Beato *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2017).

De acordo com Diógenes e Carmo (2021), a eficiência do processo fermentativo é favorecida quando o pH se mantém na faixa de 5,0 a 6,2, considerada ideal para o desenvolvimento das leveduras. Já Liu *et al.* (2015) destacam que um pH inicial mais baixo pode estimular o crescimento desses microrganismos; entretanto, valores ainda mais baixos tendem a inibir tal crescimento, ocasionando redução na taxa de fermentação e aumento na concentração final de ácido acético e glicerol.

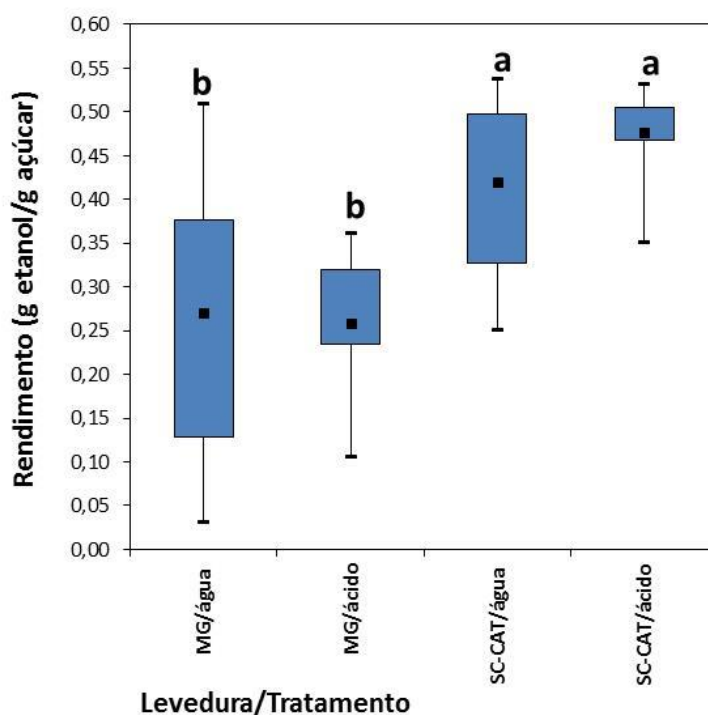
Figura 11. *Box plot* do pH das fermentações conduzidas pelas leveduras *M. guilliermondii*(MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo.



O rendimento em etanol (g/g) foi significativamente mais baixo para a levedura *M. guilliermondii*, independentemente do tratamento ácido. Sem o tratamento ácido, houve maior variação entre os ciclos (demonstrada pelo tamanho dos *boxes* e linhas verticais mínima e máxima), mostrando maior instabilidade na produção de etanol do que na condição de tratamento ácido, para as duas leveduras

(Figura 12). Ainda que não tenha havido grandes diferenças na velocidade de fermentação entre as duas leveduras (Figura 7), o potencial fermentativo da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 é muito superior, sendo ainda superior (embora não significativo) com o tratamento ácido, reforçando sua capacidade de conversão e estabilidade metabólica em condições de estresse (Fernandes, 2020).

Figura 12. *Box plot* do rendimento (g etanol/g açúcar) das fermentações conduzidas pelas leveduras *M. guilliermondii* (MG) e *S. cerevisiae* (SC-CAT), em batelada alimentada com reciclo celular em melaço de cana, sem (água) e com tratamento ácido (ácido). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). As médias estão representadas pelo retângulo preto dentro dos *boxes* azuis e as linhas verticais indicam os valores máximo e mínimo.



Conclui-se que a levedura *M. guilliermondii* consegue manter a viabilidade celular nas condições de fermentação aqui utilizadas e que simulam as condições industriais (batelada alimentada, reciclo celular e tratamento ácido) provavelmente usando a estratégia de aumento do percentual de brotamento para manter o número de células viáveis. No entanto, sua limitação parece estar mesmo na capacidade fermentativa, que não foi influenciada pelo tratamento ácido, levando a rendimentos 50% menores do que aqueles obtidos com a linhagem industrial de *S. cerevisiae* CAT-1. Convém destacar que nos experimentos de crescimento descritos no

Capítulo 2, o rendimento fermentativo foi muito superior (0,50 g/g) ao final de 12 h de cultivo em melaço, porém a concentração de ART era inferior (4 g/L) do que no experimento de fermentação (aproximadamente 17 g/L no mosto de alimentação), podendo sugerir um efeito da concentração de açúcar sobre o rendimento fermentativo.

Do ponto de vista de produção do etanol 1G, ou seja, produção de etanol a partir de mostos de cana-de-açúcar, a levedura *M. guilliermondii* não é competitiva com *S. cerevisiae* no tocante ao rendimento fermentativo, embora tenha demonstrado que mesmo diante do tratamento ácido quanto dos ciclos celulares, consegue manter a viabilidade celular.

5. Conclusões

O ciclo celular foi um fator determinante para a redução da velocidade fermentativa e da viabilidade celular em ambas as leveduras estudadas. Para *M. guilliermondii*, o tratamento ácido provocou queda na viabilidade, mas não alterou significativamente o rendimento fermentativo, que se manteve em torno de 50% do teórico, sugerindo tolerância ao estresse ácido e reforçando que a limitação principal está relacionada à capacidade fermentativa intrínseca da espécie e ao acúmulo de ciclos. Já para *S. cerevisiae* CAT-1, o tratamento ácido promoveu efeito positivo no rendimento fermentativo, mesmo diante de reduções na viabilidade, no brotamento e na velocidade de fermentação. A levedura *M. guilliermondii* não é competitiva com *S. cerevisiae* no tocante ao rendimento fermentativo, embora tenha demonstrado que mesmo diante do tratamento ácido quanto dos ciclos celulares, consegue manter a viabilidade celular em níveis que não impactam o seu rendimento em etanol, ainda que muito inferior ao demonstrado pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1.

6. Literatura citada

ALMEIDA, L. P.; ESPERANÇA M. N.; BADINO, A. C. Ethanol removal by vacuum-assisted gas stripping: Influence of operating conditions. **Chemical Engineering and Processing -Process Intensification**, v. 203, 109873, 2024.

- AMORIM, H. V. et al. Controle de contaminações bacterianas na fermentação etanólica: estratégias e inovações. **Revista de Biotecnologia Aplicada**, v. 40, n. 1, p. 22-35, 2023.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, 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: Santos Bernardes, M. A. (ed). **Biofuel production recent developments and prospects**. Croatia: Intech, p.85-100, 2011.
- BEATO, F. B., BERGDAHL, B., ROSA, C. A., FORSTER, J., GOMBERT, A. K. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS Yeast Research**. v. 16, n. 7, art. fow076. 2016.
- CÂMARA, C. N.; GUIMARÃES, C. C. Fermentação alcóolica: um estudo de caso sobre as ações adotadas para a otimização deste processo. **Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 1, e16102, 2024.
- CASTRO, R. E. N. et al. Assessment of sugarcane-based ethanol production. In: BASSO, T. P.; BASSO, L. C. (org.). **Fuel ethanol production from sugarcane**. [S. I.]: INTECHopen, 2019. p. 3–22.
- DIAS, M. O. S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil: Optimization challenges. **Renewable Energy**, v. 141, p. 1047–1055, 2019.
- DE SOUZA, R. B. et al. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209–222, 2015.
- DIÓGENES, B. C.; CARMO, S. K. S. Desempenho de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse ácido no processo de fermentação alcoólica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e232101018716, 2021.
- FERNANDES, A. M. O.; GARCIA, N. F. L.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R.; PAZ, M. F. Evaluation of the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and BB9 strains and *Pichia kudriavzevii* BB2 at simulated industrial conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 494–504, 2020.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

- LEITE, E. A. *et al.* Avaliação da lavagem ácida da levedura para o controle microbiológico da fermentação alcoólica. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 69, p. 56-62, 2013.
- LOPES, L.; PAULILLO, S. C. DE. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIN NETO, H. B.; AMORIN, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.
- LUCENA, R. M. de. **Identificação dos mecanismos genéticos de resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Genética, Pernambuco, 2012.
- MARTINI, C. *et al.* A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 1–9, 2016.
- NAVES R.F; FERNANDES F.S; PINTO O.G; NAVES P.LF. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.11, p. 1-16, 2010.
- PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010
- PARAPOULI, M. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-31, 2020.
- PERNA, M. S. C. et al Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, 119, 2018.
- RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T. P.; SILVA, J. B.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 971-983, 2017.
- REIS, V. R., ANTONANGELO, A. T. B. F., BASSI, A. P., COLOMBI, D., CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 268-274, 2017.

- RIBEIRO, R. A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 953479, 2022.
- RIVERA, E. C. et al. Prediction of intensified ethanol fermentation of sugarcane using a deep learning soft sensor and process analytical technology. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 207-216, 2024
- SILVA-NETO, J. M. **Estratégias convencionais e não-convencionais para o tratamento do fermento em mosto contaminado com *Lactobacillus fermentum*: efeito sobre a fermentação, sobre a expressão de genes de *Saccharomyces cerevisiae* e mecanismos de ação.** 2024. Qualificação (Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos – Curso de Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2024.
- SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*.** 2009. Tese (Doutorado Interunidades em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- WESTMAN, J. O.; WANG, R.; NOVY, V.; FRANZÉN, C. J. Sustaining fermentation in high-gravity ethanol production by feeding yeast to a temperature-profiled multifeed simultaneous saccharification and co-fermentation of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, 213, 2017.
- ZHANG, Y. et al. Yeast stress tolerance and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 42, p. 107-120, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leveduras industriais *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 demonstraram elevada tolerância aos estresses comumente encontrados na produção de bioetanol como baixo pH, altas concentrações de glicose e etanol e alta temperatura, confirmando sua adaptação ao processo industrial. Entre as não-*Saccharomyces*, as leveduras *M. guilliermondii* e *W. anomalus* apresentaram tolerâncias comparáveis às leveduras industriais, destacando-se pela viabilidade frente a diferentes condições de cultivo, sendo a primeira mais próxima do perfil da CAT-1 e a segunda mais semelhante à PE-2.

A avaliação em diferentes mostos de cana-de-açúcar demonstrou que o melaço favoreceu maior crescimento para as leveduras em relação ao caldo e misto (mistura de caldo e melaço), com destaque para a linhagem de *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii*. As diferenças de desempenho observadas entre as linhagens ressaltam a importância da seleção criteriosa da levedura e do mosto para maximizar a eficiência do processo fermentativo, sobretudo em sistemas de produção de etanol 1G.

Os testes fermentativos em batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido conduzidos com as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii* em melaço revelaram que o reciclo celular reduz a velocidade fermentativa e a viabilidade celular para ambas as leveduras. Para *M. guilliermondii*, o tratamento ácido provocou queda na viabilidade, mas não alterou significativamente o rendimento fermentativo, que se manteve em torno de 50% do teórico, sugerindo tolerância ao estresse ácido e reforçando que a limitação principal está relacionada à capacidade fermentativa intrínseca da espécie e ao acúmulo de reciclos. Já para *S. cerevisiae* CAT-1, o tratamento ácido promoveu efeito positivo no rendimento fermentativo, mesmo diante de reduções na viabilidade, no brotamento e na velocidade de fermentação. A levedura *M. guilliermondii* não é competitiva com *S. cerevisiae* no tocante ao rendimento fermentativo, embora tenha demonstrado que mesmo diante do tratamento ácido quanto dos reciclos celulares, consegue manter a viabilidade celular.

A levedura *M. guilliermondii* não se mostrou competitiva com *S. cerevisiae* no tocante ao rendimento fermentativo, embora tenha demonstrado que mesmo diante do tratamento ácido quanto dos reciclos celulares, consegue manter a viabilidade

celular em níveis que não impactam o seu rendimento em etanol, ainda que muito inferior ao demonstrado pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1.