

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA

**BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICRO-
ORGANISMOS VISANDO A PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

AGOSTO/2021

MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EM
CONDIÇÕES ATÍPICAS**

ORIENTADOR: WILLIAM RENZO CORTEZ-VEGA

**CO-ORIENTADORA: CINTHIA APARECIDA DE
ANDRADE SILVA**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Ciência e Tecnologia na área de concentração Interdisciplinar.

DOURADOS/MS

Termo de Aprovação

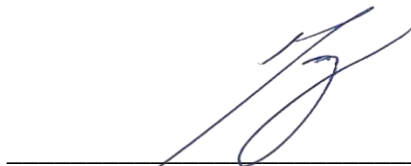
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“Bioprospecção e avaliação de microorganismos visando a produção de etanol de segunda geração”** de autoria de **MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega - (Participação Remota Síncrona)
Presidente da banca examinadora



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca (participação remota)
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Bruno Arantes Moreira - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Alessandro Minillo - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 30 de agosto de 2021.

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Quem acredita sempre alcança!*

Renato Russo e Flávio Venturini

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, sei que o caminho não foi fácil muitas pedras e espinhos porém sei que sempre esteve comigo.

Agradeço a minha família aqueles que me incentivaram e nunca deixaram de dar todo apoio e suporte.

Agradeço a minha noiva/amiga e parceira para todas as horas, Michele da Silva Gomes por todo apoio, incentivo e claro também puxões de orelha, você foi fundamental nessa etapa principalmente nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador, William Renzo Cortez-Vega, pelos anos de trabalho, ensinamentos, pela oportunidade e a confiança depositada, sem esses nada disso seria possível. A minha co-orientadora Dra. Cinthia Aparecida de Andrade Silva pelas horas de conversas, ajudas, dedicação e confiança despositada.

Aos Professores Dr. Gustavo Granciano Fonseca, Dr. Marcelo Fossa da Paz e Dr. Rodrigo Simões Leite, por toda disponibilidade e ajuda fornecida para a realização das análises durante o estudo. A todas as técnicas responsáveis pelo bloco dos laboratórios multidisciplinares pela ajuda e suporte.

À UFGD e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela oportunidade de formação.

Ao órgão de financiamento, Capes.

LISTA DE ABREVIATURAS

1G.....	Primeira geração
2G.....	Segunda geração
ART.....	Açúcar redutor total
ADNS.....	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
BRIX.....	Teor de sólidos solúveis
DO.....	Densidade Ótica
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
FRU.....	Frutose
GLC.....	Glicose
h.....	horas
ln.....	Logaritmo neperiano
log.....	Logarítmica
MCS.....	Massa celular seca
mm.....	Milímetro
pH.....	Potencial hidrogeniônico
Px.....	Produtividade de biomassa
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
SAC.....	Sacarose
TD.....	Tempo de duplicação
t.....	Tempo final
X.....	Concentração celular/biomassa
X _i	Concentração celular inicial
X _{max}	Concentração celular máxima
XYL.....	Xilose

UFC.....Unidade formadora de colônias

μ_{\max}Velocidade específica máxima de crescimento

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparativo de quantidade de usinas sucroalcooleiras em cada região do Brasil.....	15
Tabela 2.2 - Diferenças e particularidades entre o sistema de batelada simples e batelada alimentada.....	18
Tabela 2.3 - Esquema representativo das características e diferenças entre os sistemas de produção contínua e batelada alimentada.	19
Tabela 2.4 - Antibióticos mais utilizados nas indústrias sucroenergéticas.....	22
Tabela 2.5 - Biomassas lignocelulósicos utilizadas para produção do etanol 2G.	27
Tabela 2.6 - Composição química (parcial) de algumas biomassas lignocelulósicas utilizadas para produção do etanol 2G.	28
Tabela 2.7 - Estudos utilizando micro-organismos fermentadores de xilose e suas respectivas biomassas.	30
Tabela 3.1 – Características morfológicas dos isolados, a partir do mosto de cana-de-açúcar em diferentes meios de cultura à 30 °C.	49
Tabela 3.2 - Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas.....	53
Tabela 4.1 - Parâmetros cinéticos das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e <i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSL1 e da bactéria <i>Bacillus sp</i> MSL2, em cultivos com glicose (10 g L ⁻¹) à 30 °C e 40 °C.	76
Tabela 4.2 - Parâmetros cinéticos das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e <i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSL1 e da bactéria <i>Bacillus sp</i> MSL2, em cultivos com frutose (10 g L ⁻¹) à 30°C e 40°C.	79
Tabela 4.3 - Parâmetros cinéticos das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e <i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSL1 e da bactéria <i>Bacillus sp</i> MSL2, em cultivos com sacarose (10 g L ⁻¹) à 30°C e 40°C.	81
Tabela 4.4 - Parâmetros cinéticos da levedura <i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSL1 e da bactéria <i>Bacillus sp</i> MSL2, em cultivos com xilose (10 g L ⁻¹) à 30°C e 40°C.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Etapas do processo de fermentação alcoólica na condução pelo sistema de batelada simples Mellie-Boinot. Fonte: elaborado pelo autor. 17

Figura 4.1 - Dendograma utilizando o método *Neighbor-joining*, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do gene ribossomal 26S da amostra do MSL1 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw. Fonte: do autor. 73

Figura 4.2 – Dendograma utilizando o método *Neighbor-joining*, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do gene ribossomal 16S da amostra MSL2 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw. Fonte: do autor. 75

Figura 4.3 - Curva de crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■), *M. guilliermondii* MSL1 (●) e da bactéria *Bacillus sp* MSL2 (▲) em glicose (A e B), frutose (C e D), sacarose (E e F). E somente da levedura *M. guilliermondii* MSL1 (●) e da bactéria *Bacillus sp* MSL2 (▲) em xilose (G e H) como fonte única de carbono (10 g L⁻¹) à 30°C (coluna esquerda) e 40°C (coluna direita)..... 78

Figura 4.4 - Número de leveduras (UFC/mL) ao final de cada ciclo dos ensaios fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■), durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo. *Inicial se refere ao início do primeiro ciclo fermentativo..... 85

Figura 4.5 - Número de leveduras (UFC/mL) ao final dos ensaios fermentativos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) sendo no início de cada ensaio fermentativo e (B) ao final do tempo fermentativo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 °C, pH inicial 6,50, 7 °Brix..... 86

Figura 4.6 - Valor do pH ao final dos ensaios fermentativos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) ao final de cada ciclo fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo. (B) Ao final de cada tempo de fermentação, em cultivos de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 °C, pH inicial 6,50, 7 °Brix..... 87

Figura 4.7 - Valor de ART (g/L⁻¹) ao final dos ensaios fermentativos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1(■) e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) ao final de cada ciclo fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo (*ART Inical = 164,75 g/L⁻¹). (B) Ao final de cada tempo de fermentação, em cultivos utilizando

hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 °C, pH inicial 6,50, 7 °Brix (*ART Inical = 103,77 g/L⁻¹)..... 90

Figura 4.8 - Valor da produção do etanol (g/L⁻¹) ao final dos ensaios fermentativos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (●) e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) ao final de cada ciclo fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo. (B) Ao final de cada tempo de fermentação, em cultivos de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 °C, pH inicial 6,50, 7 °Brix. 92

LISTA DE EQUAÇÕES

$P_X = \frac{(X_{max} - X_i)}{t}$ <p>.....</p>	Equação 4. 1 69
<p><i>Varição logarítmica do crescimento = log (UFC/mL) final – log (UFC/mL) inicial</i></p> <p>.....</p>	Equação 4.2 71
$ART = \left(\frac{\text{absorbância da amostra} + 0,0657}{0,7878} \right) \times \text{diluição}$ <p>.....</p>	Equação 4.3 72
<p>Titulação (Etanol %v/v) = (0,01456 x (V1 – V2)) x Diluição</p> <p>.....</p>	Equação 4.4 72
$\text{Etanol \% (v/v)} = \frac{(\text{Titulação} - 0,039)}{0,104}$	Equação 4. 5 .. 72

RESUMO

O bioetanol de segunda geração (2G) tem ganhado um grande destaque mundial, visando as mudanças na situação energética do mundo. Porém a maior dificuldade é a seleção do micro-organismo utilizado na fermentação, tornando fundamental a bioprospecção de novos micro-organismos. O primeiro capítulo apresenta uma introdução geral do trabalho. No capítulo 2 foi realizado uma revisão, abordando o histórico de evolução do setor sucroalcooleiro, diferenças de produção do bioetanol e novas tecnologias de produção, temas abordados durante todo o trabalho. No capítulo 3 foi realizado a bioprospecção de micro-organismos em diferentes meios de cultura e temperatura, além de propor o isolamento em meio de cultura a base de mosto de cana-de-açúcar com ágar (20 g/L^{-1}). E avaliado o potencial de assimilação e fermentação dos isolados, em meio mineral com diferentes substratos e temperaturas. Foi possível realizar o isolamento de 8 micro-organismos, destaca-se os isolados MSL1 e MSL2, pois apresentaram capacidade de assimilação e fermentação em todos substratos e temperaturas. No capítulo 4 foram selecionados dois isolados, MSL1 e MSL2 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, os isolados foram submetidos a identificação molecular, estudos cinéticos em meio mineral e estudo fermentativo utilizando mosto e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Em relação a identificação o isolado MSL1 apresentou 100% de familiaridade com a *Meyerozymas guilliermondii* e o MSL2 não foi possível identificação a nível de espécie, sendo uma bactéria pertencente ao gênero *Bacillus sp.* Nos estudos cinéticos a *M. guilliermondii* MSL1 se mostrou promissora, comparada a *S. cerevisiae* CAT-1, os micro-organismos tiveram os maiores valores de μ_{max} em frutose, sendo de $0,48 \text{ h}^{-1}$ e $0,31 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, enquanto a *Bacillus sp* MSL2 foi em glicose ($0,32 \text{ h}^{-1}$), todos a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nos testes fermentativos utilizou-se somente as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e a *M. guilliermondii* MSL1, nos ensaios em mosto de cana-de-açúcar ambas leveduras apresentaram aumento no UFC/mL ao longo dos ciclos fermentativos. A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 obteve um menor ART (açúcar redutor total) residual e maior produção de etanol, sendo o maior no sexto ciclo fermentativo (12,4% v/v), enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 foi no quarto ciclo fermentativo (7,4% v/v). Em relação a fermentação em hidrolisado a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou um aumento no UFC/mL enquanto a *S. cerevisiae* CAT-1 teve uma queda no UFC/mL. Nota-se que as duas leveduras apresentaram consumo de açúcar e produção de etanol, sendo que a *M. guilliermondii* MSL1 teve a maior produção sendo de 6,9% v/v com 36h de fermentação, enquanto a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou 5,3% v/v. Através do presente trabalho conclui-se que a bioprospecção apresenta um papel fundamental para conhecimento de micro-organismos desconhecidos. A temperatura foi um fator limitante para o isolamento dos micro-organismos, e o meio proposto a base de mosto mostrou-se eficiente. Embora as leveduras *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae* CAT-1 seja um micro-organismos bastante utilizado, foi fundamental para compreender o comportamento dos micro-organismos em diferentes condições. Nota-se que mesmo com a limitação da temperatura para o isolamento a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou características de assimilação e fermentação nos diversos substratos e temperaturas. Corroborando o potencial da *M. guilliermondii* MSL1 nos ensaios fermentativos, uma vez a mesma apresentou consumo dos substratos e produção de etanol satisfatória principalmente em hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, apresentando produção de etanol superior à CAT-1.

Palavras-chave: etanol 2G, microbiologia, leveduras, fermentação.

ABSTRACT

Second-generation bioethanol (2G) has gained a great prominence worldwide, aiming the changes in the world energy situation. However, the greatest difficulty is the selection of the microorganism used in fermentation, making the bioprospecting of new microorganisms fundamental. The first chapter presents a general introduction to the work. Chapter 2 is a review of the history of the evolution of the sugar-alcohol sector, differences in bioethanol production and new production technologies, themes that will be addressed throughout the work. In Chapter 3, microorganisms were bioprospected in different culture media and temperature, and isolation was proposed in a culture medium based on sugarcane must with agar (20 g/L⁻¹). The assimilation and fermentation potential of the isolates was evaluated in mineral medium with different substrates and temperatures. It was possible to isolate 8 microorganisms, with the isolates MSL1 and MSL2 standing out because they showed assimilation and fermentation capacity in all substrates and temperatures. In chapter 4, two isolates, MSL1 and MSL2, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 were selected. The isolates were submitted to molecular identification, kinetic studies in mineral medium and fermentation studies using must and sugarcane bagasse hydrolysate. The isolate MSL1 presented 100% of familiarity with *Meyerozymas guilliermondii* and MSL2 was not possible to be identified at species level, being a bacterium belonging to the genus *Bacillus sp.* In kinetic studies, *M. guilliermondii* MSL1 showed promise, compared to *S. cerevisiae* CAT-1, the microorganisms had the highest values of μ_{max} in fructose, being 0.48 h⁻¹ and 0.31 h⁻¹ respectively, while *Bacillus sp* MSL2 was in glucose (0.32 h⁻¹), all at 40 °C. In the fermentative tests we used only the yeast *S. cerevisiae* CAT-1 and the *M. guilliermondii* MSL1, in the tests in sugar cane must, both yeasts showed an increase in CFU/mL throughout the fermentative cycles. The yeast *S. cerevisiae* CAT-1 obtained a lower residual ART (total reducing sugar) and higher ethanol production, being the highest in the sixth fermentative cycle (12.4% v/v), while *M. guilliermondii* MSL1 was in the fourth fermentative cycle (7.4% v/v). Regarding fermentation in hydrolysate *M. guilliermondii* MSL1 showed an increase in CFU/mL while *S. cerevisiae* CAT-1 had a decrease in CFU/mL. Both yeasts showed sugar consumption and ethanol production, with *M. guilliermondii* MSL1 having the highest production of 6.9% v/v with 36 hours of fermentation, while *S. cerevisiae* CAT-1 had 5.3% v/v. Through the present work it is concluded that bioprospecting presents a fundamental role for the knowledge of unknown microorganisms. The temperature was a limiting factor for the isolation of microorganisms, and the proposed must-based medium proved to be efficient. Although the yeast *M. guilliermondii* and *S. cerevisiae* CAT-1 is a widely used microorganism, it was fundamental to understand the behavior of the microorganisms under different conditions. It is noted that even with the limitation of temperature for isolation, *M. guilliermondii* MSL1 showed assimilation and fermentation characteristics in different substrates and temperatures. Corroborating the potential of *M. guilliermondii* MSL1 in the fermentative assays, once it presented consumption of the substrates and satisfactory ethanol production mainly in sugarcane bagasse hydrolysate, presenting ethanol production superior to *S. cerevisiae* CAT-1

Keywords: ethanol 2G, microbiology, yeast, fermentation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 Justificativa.....	1
1.3 Apresentação e estrutura do trabalho.....	3
1.4 Objetivos.....	4
1.5 Referências:	5
CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DO BIOETANOL: DA INDÚSTRIA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL E A ASCENSÃO DO SUCROENERGÉTICO.	11
2.1 Introdução.....	12
2.2 Desenvolvimento	14
2.2.1 Histórico do setor sucroenergético	14
2.2.2 Setor sucroenergético em números.....	14
2.2.3 Processo industrial do bioetanol no Brasil	16
2.2.4 Fatores influenciadores da fermentação alcoólica.....	20
2.2.5 Leveduras no processo fermentativo	23
2.2.6 Etanol de segunda geração (2G) e o futuro da produção do bioetanol.....	25
2.3 Referências	31
CAPÍTULO 3: BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE NOVOS MICRO-ORGANISMOS EM CONDIÇÕES ATÍPICAS.....	44
3.1 Introdução.....	46
3.2 Material e Métodos	47
3.3 Resultados e Discussão.....	48
3.4 Considerações Finais	59
3.5 Referências	59
CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE DOIS MICRO- ORGANISMOS ISOLADOS, UTILIZANDO MOSTO E HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	63
4.1 Introdução.....	64
4.2 Material e Métodos	66
4.2.1 Micro-organismos.....	66
4.2.2 Identificação molecular dos isolados.....	67
4.2.3 Estudos cinéticos	68
4.2.4 Ensaios fermentativos	69
4.2.5 Análises	71

4.2.6 Análise estatística	72
4.3 Resultados e Discussão.....	73
4.3.1 Identificação molecular	73
4.3.2 Estudos cinéticos	75
4.3.3 Ensaios fermentativos.....	84
4.4 Conclusões.....	92
4.5 Referências	93
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL.....	101
ANEXO I.....	102

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1.2 Justificativa

O Setor sucroenergético no Brasil, possui um papel fundamental na história e economia do país (ALCOFORADO et al., 2021). A implementação de iniciativas, como o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) e a criação do Instituto de Açúcar e Álcool (IAA) (KOHLHEPP, 2010; DUNFORD et al., 2020; ALCOFORADO et al., 2021), foi de fundamental importância para a consolidação do setor no Brasil.

No entanto com a mudança na situação energética do mundo e a busca de biocombustíveis renováveis, a produção do bioetanol sofreu grandes mudanças (VOHRA et al., 2014), parte pelo desenvolvimento de novas tecnologias, aumento da demanda pelo bioetanol e preocupação mundial ao meio ambiente (ROSSI et al., 2021). A consolidação de plataformas sustentáveis em detrimento das fontes fósseis se tornou essencial para atender às futuras demandas globais de geração de energia e mitigar os impactos ocasionados ao meio ambiente (SILVA et al., 2018; ALENCAR et al., 2020).

A produção brasileira do bioetanol tem como principal matéria-prima o mosto da cana-de-açúcar, que é submetido ao processo de fermentação utilizando como micro-organismos principalmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por apresentar um bom rendimento fermentativo (RADECKA et al., 2015; LOPES et al., 2016). Como dito o setor cada vez mais tendo oportunidades e possibilidades de desenvolver novas pesquisas e buscar novas fontes energéticas sustentáveis, além do aumento da demanda pelos produtos gerados pela indústria, como o bioetanol e a bioenergia (MARTINS et al., 2019).

Um dos produtos que tem ganhado bastante destaque mundial e vem se firmando cada vez mais é a produção do etanol de segunda geração (2G) (KUILA et al., 2016; BRANCO et al., 2019), no qual é produzido a partir de quaisquer biomassas lignocelulósicas, compostos por três polímeros principais: celulose, hemicelulose e lignina (PADILHA et al., 2020).

Estes materiais lignocelulósicos, tem como principais componente a glicose, xilose e lignina, no qual esses são convertidos através de processos bioquímicos em bioetanol 2G (CHACÓN et al., 2021), além de que uma das maiores vantagens do bioetanol 2G é a infinitas possibilidades de matérias-primas (PADILHA et al., 2020), como por exemplo, resíduo de bananeira (INGALE et al., 2014; JAHID et al., 2018; KHALIQ et al., 2020), palha de cevada (LARA-SERRANO et al., 2018), palha de milho (ZAKIR et al., 2016; DHIMAN et al., 2017), palhiço de cana-de-açúcar (MOUTTA et

al., 2013) e principalmente o bagaço da cana-de-açúcar (WONG; SANGGARI 2014; ZAKIR et al., 2016; CHENG et al., 2019; VIEIRA et al., 2021).

Em contrapartida, a maior dificuldade para a produção do etanol de segunda geração é a seleção do micro-organismo utilizado na fermentação. Mesmo que a *S. cerevisiae* seja uma das espécies mais utilizadas a *S. cerevisiae* a busca por um micro-organismos capazes de utilizar as hexoses tem ganhado cada vez mais espaço nas pesquisas científicas (RADECKA et al., 2015).

Outro fator fundamental no qual deve se levar em consideração na seleção do micro-organismos é as condições industriais e características do processo, levando em consideração não apenas rendimento fermentativo, mas também características que permitem a sobrevivência das cepas em condições de estresse (LOPES et al., 2016; HANS et al., 2019; CECCATO-ANTONINI; COVRE, 2020) além e da sua capacidade de adaptabilidade aos fatores inibitórios, como temperatura, pH, teor de sólidos solúveis, subprodutos, contaminação por leveduras selvagens ou bactérias, mas principalmente pela capacidade fermentativa em diferentes substratos (HANS et al., 2019).

Uma das alternativas encontrada é a utilização de leveduras geneticamente modificados (LUGANI et al., 2020; CECCATO-ANTONINI; COVRE, 2020), porém um dos problemas ao se utilizar os organismos geneticamente modificados (OGMs) está em relação ao princípio da prudência.

O princípio da prudência foi proposto na Conferência do Rio 92, estabelecido através do Protocolo de Cartagena, sendo uma referência internacional, visando a proteção da diversidade biológica e da saúde humana, diante a utilização dos micro-organismos gerados através da aplicação da tecnologia do DNA recombinante, ou aqueles nos quais não possam ser identificados (RIBEIRO; MARIN, 2000; PRUDENTE, 2004; VALOIS, 2016). Além de estabelecer e garantir normas-padrão de biossegurança, como por exemplo, a garantia dos OGMs se materem seguro durante todo o processo industrial (RIBEIRO; MARIN, 2000).

Sabe-se que as indústrias sucroenergéticas realizam o reciclo celular, durante toda a safra estipula-se os micro-organismos são submetidos em aproximadamente 400 reciclos celular (BASSO et al., 2008; LOPES et al., 2015; LOPES et al., 2016). Além disso durante a fermentação, sabe-se que há influencia de micro-organismos contaminantes, oriundos de etapas antecedentes, como por exemplo, leveduras selvagens e bactérias. Tornando a utilização dos OGMs ainda mais preocupantes, uma vez que possa ocorrer uma mutação no micro-organismos utilizado, comprometendo assim a garantia

de biossegurança. Sendo assim outra alternativa na qual viável é a bioprospecção de novos micro-organismos com potencial fermentativo para pentose e hexoses, se tornando a opção ideal uma vez que estes micro-organismos geralmente são oriundos do próprio processo ou da matéria-prima utilizada.

Embora as leveduras comerciais apresentem uma boa eficiência fermentativa a bioprospecção de novos micro-organismos é fundamental, buscando não somente aquelas que apresentem destacado potencial fermentativo, mas também outras aplicações biotecnológicas (SILVA; FONSECA, 2016; ANDRADE et al., 2017). Além disso, dada a biodiversidade mundial de microrganismos, provavelmente haja muitas espécies desconhecidas capazes de obter um bom rendimento fermentativo em condições estressantes (VALINHAS et al., 2018).

Atualmente há muitos micro-organismos, como bactérias e leveduras, classificados e estudadas comprovando a capacidade do aproveitamento da xilose para a produção do etanol na fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar (FARIAS; FILHO, 2021; ANTUNES et al., 2021), como por exemplo a levedura *Meyerozyma guilliermondii*.

A levedura *M. guilliermondii* apresenta várias aplicabilidades biotecnológicas desde produções industriais até pesquisas científicas, sendo considerável uma espécie rara (SHCHELOKOVA et al., 1974; YAN et al., 2021). Além disso a levedura é considerada uma das leveduras mais adequadas para a fermentação de xilose (CANETTIERI et al., 2001; CARVALHO et al., 2002; ATZMÜLLER et al., 2020; YAN et al., 2021), além de apresentar um grande potencial para enzimas industriais, como por exemplo, inulinase e lipase (GONG et al., 2007; CAI et al., 2018; WAH et al., 2013).

1.3 Apresentação e estrutura do trabalho

Esta tese apresenta as atividades realizadas pelo aluno Marcelo Augusto de Souza Costa durante o seu doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), iniciado em 2017.

O desenvolvimento do projeto deu-se a partir do isolamento de novos micro-organismos em condições atípicas, como altas temperaturas, diferentes substratos e concentrações, além da elaboração de um meio de cultura utilizando o próprio mosto da cana-de-açúcar. Os micro-organismos foram isolados a partir do mosto da cana-de-açúcar

obtidos em uma usina do estado do Mato Grosso do Sul, por questões de privacidade omitiu-se o nome da empresa.

Após a obtenção dos isolados foi realizada a seleção dos principais micro-organismos no qual apresentaram um melhor desempenho para a aplicação biotecnológica. Através do teste bioquímico de assimilação e fermentação em diferentes substratos e temperaturas foi selecionado somente os micro-organismos que apresentaram os melhores resultados e assim submetidos ao estudo cinético e aplicabilidade biotecnológica.

O texto do trabalho foi estruturado de modo que cada capítulo venha corresponder a uma publicação, exceto esta introdução geral (Capítulo 1) e a conclusão geral (Capítulo 5). Assim, este trabalho foi organizado da seguinte forma:

Capítulo 1. Introdução Geral.

Capítulo 2. Produção do bioetanol: Da indústria de açúcar e álcool e a ascensão do sucroenergético.

Capítulo 3. Bioprospecção e avaliação do potencial biotecnológico de novos micro-organismos em condições atípicas.

Capítulo 4. Caracterização biotecnológica de dois micro-organismos isolados, utilizando mosto e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Capítulo 5. Conclusão geral

1.4 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Objetivo Geral: Realizar a bioprospecção de micro-organismos em condições atípicas (temperatura e concentração de substrato) a partir do mosto da cana-de-açúcar, avaliar os parâmetros cinéticos em diferentes condições de cultivos e aplicabilidade biotecnológica.
- Capítulo 2: Revisar e sistematizar informações sobre o desenvolvimento e processo evolutivo do setor sucroalcooleiro, novas tecnologias de produção de etanol, biomassas e micro-organismos utilizados.
- Capítulo 3: Isolar micro-organismos a partir do mosto da cana-de-açúcar utilizando os meios de cultivos com glicose em diversas concentrações (YPD-2%,

YPD-5%, YPD-20%) e a xilose (YPX-2%, YPX-5%, YPX-20%) e o meio de cultura Mosto-Ágar (8, 15 e 25°Brix) e avaliar a capacidade de assimilação e fermentação dos isolados.

- Capítulo 4: Identificar dois isolados obtidos no capítulo 3 (MSL1 e MSL2), estudar os parâmetros cinéticos dos isolados dos isolados e da levedura industrial CAT-1. Além de avaliar o potencial biotecnológico das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e o isolado MSL1) em fermentações utilizando mosto de cana-de-açúcar e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

1.5 Referências:

ALCOFORADO, E. da S.; D'ANGELO, I. B. de M.; ALVES, J. S.; ARAÚJO, G. R. de; ALMERIDA, P. L. de F. Rapadura é doce, mas é dura: um panorama da realidade de exploração no trabalho do corte da cana-de-açúcar em Pernambuco. **Revista Inclusiones**, v. 8, p. 199-223, 2021.

ALENCAR, B. R. A.; VAZ, F. L.; NETO, A. G. B.; AQUINO, K. A.; SAMPAIO, E. V. D. S. B.; MENEZES, R. S. C.; DUTRA, E. D. Concentration of alkaline hydrogen peroxide (AHP) affects the recycle of the liquid fraction in the pre-treatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Waste Biomass Valorization**, v. 11, p. 6179–6188, 2020.

ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72–79, 2017.

ANTUNES, F. A. F.; THOMÉ, L. C.; SANTOS, J. C.; INGLE, A. P.; COSTA, C. B.; ANJOS, V.; BELL, M. J. V.; ROSA, C. A.; DA SILVA, S. S. Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1343-1355, 2021. doi: 10.1016/j.renene.2020.08.020.

ATZMÜLLER, D.; ULLMANN, N.; ZWIRZITZ, A. Identification of genes involved in xylose metabolism of *Meyerozyma guilliermondii* and their genetic engineering for increased xylitol production. **AMB Express**, v. 10, p. 1–11, 2020.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FESM**, v. 8, p. 1155–63, 2008. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.

BRANCO, R. H.; SERAFIM, L. S.; XAVIER, A. M. Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. **Fermentation**, v. 5, p. 4, 2019.

CAI, H.Y., ZHANG, T., DUMBA, T.; ZHAO, M.; LI, Y.; TONG, Z.; MAO, J.; ZHANG, H.; FENG, F. High-efficient expression and properties characterization of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, v. 18, p. 262–271, 2018.

CANETTIERI, E.V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, p. 159–168, 2001.

CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M. Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 79, p. 165–169, 2002.

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, p. 8, 2020.

CHACÓN, S. J.; MATIAS, G.; EZEJI, T. C.; FILHO, R. M.; MARIANO, A. P. Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation to produce butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, 321, 1-9, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124504.

CHENG, M. H.; WANG, Z.; DIEN, B. S.; SLININGER, P. J.; SINGH, V. Economic analysis of cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse using a sequential deacetylation, hot water and disk-refining pretreatment. **Processes**, v. 7, p. 642, 2019.

DHIMAN, S. S.; DAVID, A.; BRABAND, V. W.; HUSSEIN, A.; SALEM, D. R.; SANI, R. K. Improved bioethanol production from corn stover: role of enzymes, inducers and simultaneous product recovery. **Applied Energy**, v. 208, p. 1420-1429, 2017.

DUNFORD, E. K.; MILES, D. R.; NG, S. W.; POPKIN, B. Types and amounts of nonnutritive sweeteners purchased by US households: a comparison of 2002 and 2018. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 120, p. 1662-1671, 2020.

FARIAS, D.; FILHO F. M. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar. **Fuel**, v. 288, p. 1-11, 2021. doi: 10.1016/j.fuel.2020.119673.

GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z.; LI, J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 179–185, 2007.

HANS, M.; KUMAR, S.; CHANDEL, A. K.; POLIKARPOV, I. A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 125-134, 2019.

INGALE, S.; JOSHI, S. J.; GUPTE, A. Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 885-892, 2014.

JAHID, M.; GUPTA, A.; SHARMA, D. K. Production of bioethanol from fruit wastes (banana, papaya, pineapple and mango peels) under milder conditions. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 8, p. 327, 2018.

KHALIQ, A. B.; ACHMAD, C.; LUKMAN, M.; KHOLIL, I. **Making of bioethanol banana weevil as renewable energy**. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 722, 2020.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção do etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 223-253, 2010.

KUILA, A.; SHARMA, V.; GARLAPATI, V. K.; SINGH, A.; ROY, L.; BANERJEE, R. Present status on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Adv Biofeedstocks Biofuels**, v. 1, p. 85, 2016.

LARA-SERRANO, M.; SÁEZ ANGULO, F.; NEGRO, M.A.J.; MORALES-DELA ROSA, S.; CAMPOS-MARTIN, J.M.; FIERRO, J.L. Second-generation bioethanol production combining simultaneous fermentation and saccharification of IL-Pretreated Barley Straw. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, p. 7086–7095, 2018.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; CHERUBIN, R. A.; GODOY, A. Tailored-Yeast Strains for Ethanol Production: Process-Driven Selection. **Fermentec**, v. 42, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/289377526_Tailored_yeast_strains_for_ethanol_production_The_process_driven_selection.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; NETO, H. B. A.; AMORIM, H. V.

Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Biotechnology And Industry Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

LUGANI, Y.; RAI, R.; PRABHU, A. A.; MAAN, P.; HANS, M.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; CHANDEL, A. K.; SENGAR, R. S. Recent advances in bioethanol production from lignocelluloses: a comprehensive review with a focus on enzyme engineering and designer biocatalysts. **Biofuel Research Journal**, v. 28, p. 1267-1295, 2020.

MARTINS, L. H. S.; NETO, J. M.; GOMES, P. W. P.; OLIVEIRA, J. A. R.; PENTEADO, E. D.; KOMESU, A. Potential feedstocks for second-generation ethanol production in Brazil, In: A. Kuila (Ed.), **Sustainable Biofuel and Biomass Advances and Impacts**, New York Imprint Apple Academic Press, 2019, p. 822.

MOUTTA, R.; SILVA, M.; CORRALES, R.; CERULLO, M.; FERREIRA-LEITAO, V.; BON, E. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**. 01, 2013.

PADILHA, C. E. A.; NOGUEIRA, C. C.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; SOUSA JÚNIOR, F. C.; ASSIS, C. F.; SOUZA, D. F. S.; OLIVEIRA, J. A.; SANTOS, E. S. Fractionation of green coconut fiber using sequential hydrothermal/alkaline pre-treatments and Amberlite XAD-7HP resin. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p. 103474, 2020.

PRUDENTE, A. S. Transgênicos, biossegurança o Princípio da Precaução. **Revista CEJ**, v. 5, n. 2, p. 11–18, dez., 2004.

RADECKA, D.; MUKHERJEE, V.; MATEO, R. Q.; STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 15, p. 1 – 13, 2015.

RIBEIRO, I. G.; MARIN, V. A. A falta de informação sobre os Organismos Geneticamente Modificados no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p. 359 – 368.

ROSSI, L. M.; GALLO, J. M. R.; MATTOSO, L. H. C.; BUCKERIDGE, M. S.; LICENCE, P.; ALLEN, D. T. Ethanol from Sugarcane and the Brazilian Biomass-Based Energy and Chemicals Sector. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, p. 4293–4295, 2021.

SHCHELOKOVA, I. P., ZHAROVA, V. P., KVASNIKOV, E. I. Obtaining hybrids of haploid strains of *Pichia guilliermondii* Wickerham that assimilate petroleum hydrocarbons. **Mikrobiol Zh**, v. 36, p. 275–278, 1974.

SILVA, C. A. A.; FONSECA, G. G. Brazilian savannah fruits: Characteristics, properties, and potential applications. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, p. 1225-1232, 2016.

SILVA, F. L.; CAMPOS, A. O.; SANTOS, D. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; PADILHA, C. E. A.; SOUSA JÚNIOR, F. C.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Pre-treatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. **Renewable Energy**, v. 116, p. 299–308, 2018.

VALINHAS, R. V.; PANTOJA, L. A.; MAIA, A. C. F.; MIGUEL, M. G. C. P.; VANZELA, NA. P. F. C.; NELSON, D. L.; SANTOS, A. S. Xylose fermentation to ethanol by new *Galactomyces geotrichum* and *Candida akabanensis* strains. **PeerJ**, v. 6, p. 1-16, 2018.

VALOIS, A. C. C. O princípio da precaução em OGMs e recursos genéticos. **Revista RG News**, v. 2. n. 1, p. 40-42, 2016.

VIEIRA, C. F. S.; MAUGERI FILHO, F.; MACIEL FILHO, R.; MARIANO, A. P. Sugarcane bagasse hydrolysates as feedstock to produce the isopropanol-butanol-ethanol fuel mixture: effect of lactic acid derived from microbial contamination on *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124140, 2021.

VOHRA, M.; MANWAR, J.; MANMODE, R.; PADGILWAR, S.; PATIL, S. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 573–84, 2014.

WAH, T.T.; WALAISRI, S.; ASSAVANIG, NIAMSIRI, A. N.; LERTSIRI, S. Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 282–289, 2013.

WONG, Y.; SANGGARI, V. Bioethanol production from sugarcane bagasse using fermentation process. **Oriental Journal of Chemistry**, 30, 507-513, 2014. doi: 10.13005/ojc/300214.

YAN, W.; GAO, H.; QIAN, X.; JIANG, ZHOU, Y. J.; DONG, W.; XIN, F.; ZHANG, W.; JIANG, M. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107674, 2021.

ZAKIR, H.; HASAN, M.; SHAHRIAR, S.; ARA, T.; HOSSAIN, M. Production of biofuel from agricultural plant wastes: corn stover and sugarcane bagasse. **Chemical Engineering and Science**, v. 4, p. 5-11, 2016.

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DO BIOETANOL: DA INDÚSTRIA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL E A ASCENSÃO DO SUCROENERGÉTICO.

Bioethanol production: From the sugar and alcohol industry and the rise of sugarcane.

Resumo:

A produção do bioetanol brasileiro, apresentou grandes mudanças com o desenvolvimento de tecnologias, além do aumento da demanda por um biocombustível mais sustentável e a preocupação ambiental. Com isso o presente trabalho visa realizar uma revisão apresentando um breve histórico do setor sucroenergético em sua implantação no Brasil, o avanço de produção e as principais mudanças no processo de produção do bioetanol no decorrer dos anos. A produção brasileira de bioetanol, utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produção do bioetanol, embora a cana-de-açúcar seja a principal matéria-prima, há muitos estudos visando o reaproveitamento de resíduos industriais. Com as mudanças ambientais, oportunizaram ao setor diversas possibilidades para reutilização de resíduos agroindustriais, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar, destinado para a produção do bioetanol 2G e co-geração da bioenergia, trazendo uma solução na destinação correta do resíduo. A produção do bioetanol 2G ganhou destaque no cenário mundial, devido diversas origens de matérias-primas, como por exemplo, bagaço e palhiço de cana-de-açúcar, palha de cevada e de milho, fibra de coco, entre outros. No entanto um dos principais gargalos é a escolha do micro-organismo utilizado para a produção do bioetanol 2G, a tomada de decisão deve-se levar em conta todas as condições de produção e principalmente características nas quais permitem a sobrevivência destes. A busca por novos micro-organismos é fundamental para o sucesso de novas aplicabilidades de produção, o avanço da biologia molecular também abriu muitas possibilidades não só para o entendimento de como funciona as rotas metabólicas dos micro-organismos, mas para a obtenção de leveduras geneticamente modificadas.

Palavras Chave: Cana-de-açúcar, Bagaço, Fermentação, Micro-organismos.

Abstract:

Bioethanol production in Brazil has presented great changes with the development of technologies, due increase a demand for a more sustainable biofuel and environmental concerns. Thus, the present work aims to elaborated a review presenting a brief history of the sugar-energy sector in its implementation in Brazil, evolution in production, and the principal changes in bioethanol production process over the years. Brazilian production of bioethanol, uses sugarcane as raw material and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation process. Although sugarcane is the principal main raw material, there are many studies aimed at the reuse of industrial waste. Environmental changes have provided the sector with several possibilities for reusing agroindustrial residues, such as sugarcane bagasse, for the production of 2G bioethanol and co-generation of bioenergy, providing a solution for the correct destination of the residue. The production of 2G bioethanol has gained highlight in world scenario, due to several origins of raw materials, such as sugarcane bagasse and chaff, barley and corn straw, coconut fiber, among others. However, one of the main bottlenecks is the choice of

microorganism used for the production of 2G bioethanol, the decision must take into account all production conditions and especially characteristics that allow the survival of these microorganisms. The search for new microorganisms is essential for the success of new production applications, the advancement of molecular biology has also opened many possibilities not only for the understanding of how the metabolic pathways of microorganism's work, but also for obtaining yeasts genetically modified.

Keywords: Sugarcane, Bagasse, Fermentation, Microorganisms.

2.1 Introdução

A história da indústria de açúcar e álcool com o Brasil vem de muitos séculos atrás, apresentando um papel fundamental para o Brasil, assim como o país contribuiu significativamente para a evolução do setor (Alcoforado *et al.*, 2021). Destacando-se dois momentos fundamentais para durante o desenvolvimento do setor, a implementação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) e a criação do Instituto de Açúcar e Álcool (IAA) (Kohlhepp, 2010; Dunford *et al.*, 2020; Alcoforado *et al.*, 2021). A produção do bioetanol no Brasil mudou muito ao longo dos anos, com o desenvolvimento de novas tecnologias, aumento pela demanda pelo bioetanol e adaptações devido a preocupação mundial ao meio ambiente (Rossi *et al.*, 2021).

A condução do processo fermentativo no Brasil pode ser realizada através do processo de batelada (simples ou alimentada) ou sistema contínuo, ambos com suas características e diferenças, como por exemplo, condições de assepsia, manutenção, riscos de contaminações, adaptação das células de leveduras, custos, potencial de automação e principalmente o rendimento fermentativo (Carvalho & Sato, 2001; Schimidell & Facciotti, 2001; Costa *et al.*, 2014).

Para produção do bioetanol as indústrias utilizam a cana-de-açúcar como principal matéria-prima, o mosto extraído é enviado para as dornas de fermentação onde é realizado o processo de conversão das moléculas de açúcares em bioetanol. A conversão das moléculas se dá pela ação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao bom rendimento fermentativo quando utilizado o mosto da cana-de-açúcar como substrato (Radecka *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2016).

Embora a cana-de-açúcar seja a principal matéria-prima utilizada para produção do bioetanol, há muitos estudos visando o reaproveitamento de seus resíduos, agregando alto valor ao produto, principalmente devido à crescente preocupação ambiental no setor. Além disso o aumento da demanda pelo bioetanol, açúcar e a bioenergia, possibilitou ao

setor várias oportunidades e possibilidades para desenvolver e contribuir com o propósito (Martins *et al.*, 2019).

Um dos maiores exemplos de reaproveitamento é o próprio bagaço da cana-de-açúcar, no qual antes era considerado um “problema” para indústria, hoje é uma matéria-prima de alto valor agregado, e possui várias oportunidades de reaproveitamento, por exemplo, a obtenção de produtos químicos como ácidos orgânicos (Schmidt *et al.*, 2017; Oonkhanond *et al.*, 2017) e dióis (Song *et al.*, 2012), materiais à base de lignina (Bertolo *et al.*, 2019). Além desses o bagaço vem sendo muito utilizado para produção do bioetanol, conhecido como etanol de segunda geração (2G), no qual ganhou um grande destaque e aceitação no mercado mundial já alguns anos (Kuila *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2019).

No entanto, não é somente o bagaço no qual é utilizado como matéria-prima, há outras biomassas lignocelulósicas nas quais vem sendo utilizadas para produção do bioetanol, como por exemplo, resíduo de bananeira (Ingale *et al.*, 2014; Jahid *et al.*, 2018; Khaliq *et al.*, 2020), palha de cevada (Lara-Serrano *et al.*, 2018), palha de milho (Zakir *et al.*, 2016; Dhiman *et al.*, 2017), palhiço de cana-de-açúcar (Moutta *et al.*, 2013).

Dentre as várias vantagens de produção do etanol de segunda geração (2G), se destacam as infinitas possibilidades de matérias-primas (Padilha *et al.*, 2020), porém o gargalo de produção é a dificuldades na seleção do micro-organismo utilizado no processo fermentativo. A escolha do micro-organismo para a fermentação alcoólica depende não só da sua capacidade da adaptabilidade aos fatores inibitórios, mas também principalmente de sua capacidade fermentativa (Hans *et al.*, 2019).

As leveduras comerciais utilizadas na produção do bioetanol de primeira geração (1G) não possuem as mesmas capacidades fermentativas para aproveitar, por exemplo, a xilose principal açúcar encontrado na biomassa lignocelulósica. Uma das alternativas é a busca por leveduras selvagens ou a utilização de leveduras geneticamente modificados (Lugani *et al.*, 2020; Ceccato-Antonini & Covre 2020), além da bioprospecção de novos micro-organismos capazes do aproveitamento da xilose, há muitos micro-organismos, como bactérias e leveduras, classificados e estudadas comprovando a capacidade do aproveitamento da xilose para a produção do etanol. Através do contexto exposto, o presente trabalho visa realizar uma revisão da produção do bioetanol abordando a evolução do setor sucroenergético, bem como os avanços tecnológicos implementados.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Histórico do setor sucroenergético

A produção da cultura da cana-de-açúcar tem uma importância histórica na economia mundial, a produção e comercialização são encontradas em mais de 70 países, como por exemplo, China, Estados Unidos, Índia e o Brasil. Dentre os países produtores o Brasil se destaca devido ao grande potencial na produção de etanol e seus respectivos subprodutos, e diferentemente do que ocorre nos demais países, opera numa conjuntura positiva e sustentável (Moraes *et al.*, 2021). O setor sucroenergético no Brasil apresenta um papel fundamental na história brasileira, a economia canavieira vem de muitos séculos atrás, sendo implantado pelos portugueses no Brasil, devido ao alto valor que o açúcar representava na época (Alcoforado *et al.*, 2021).

Desde dá década de 1930, iniciou-se a produção e adaptação de motores de automóveis para funcionar apenas com bioetanol, garantindo ao mercado do bioetanol um grande aumento em sua produção. Através desta iniciativa o setor conseguiu estabelecer a sua importância e a apresentar sua importância econômica, tornando-se ainda mais forte principalmente devido ao desenvolvimento da tecnologia dos motores flex-fuel (Souza *et al.*, 2014; ANP, 2019; Rossi *et al.*, 2021).

Na década de 1960 surgiu o IAA (Instituto de Açúcar e Alcool) (Decreto n. 16 em 1966), assumindo o controle de produção de açúcar e álcool no âmbito local e buscando corrigir as irregularidades economicamente do setor (Dunford *et al.*, 2020; Alcoforado *et al.*, 2021), além da criação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) por volta de 1970, no qual tinha objetivo de garantir o fornecimento de energia e incentivar as indústrias sucroalcooleiras no Brasil (Kohlhepp, 2010).

Devido às mudanças mundiais, principalmente na política brasileira, houve a extinção de vários órgãos públicos, como por exemplo o IAA (1990). Com isso houve a criação do Centro de Tecnologia Canavieira (CTT), um dos órgãos fundamentais para o desenvolvimento tecnológicos do setor nos dias atuais (Guanais, 2018).

2.2.2 Setor sucroenergético em números

Atualmente os maiores produtores de cana-de-açúcar no Brasil se encontram nas regiões sudeste e centro-oeste, apresentando uma predominância em produção de cana-de-açúcar desde a safra 2007/08. A região Sudeste foi responsável por 66% da produção total brasileira de cana-de-açúcar na safra atual recém encerrada (2020/21), seguido pela região Centro-Oeste (21%), Nordeste (7%), Sul (5%) e Norte (1%) (CONAB, 2021).

À safra atual 2020/21 o estado de São Paulo apresentou a maior produção de cana-de-açúcar no país com 354 (mil/t), seguido por Goiás com 74 (mil/t), Minas Gerais com 70 (mil/t) e o estado do Mato Grosso do Sul com 48 (mil/t) (CONAB, 2021).

Segundo a Tabela 2.1, o Brasil conta com 418 usinas instaladas e distribuídas pelas regiões brasileiras. A maior quantidade de usinas está concentrada na região sudeste (225 usinas), seguida pela região Centro-Oeste (81 usinas) e região Nordeste (73 usinas) e por fim a região Norte (5 usinas).

A quantidade de usinas instaladas é um dos principais motivos pela diferença de produção de cana-de-açúcar. O estado de São Paulo possui a maior quantidade de produção de cana-de-açúcar (gráfico 2), devido apresentar a maior quantidade de indústrias instaladas (171 usinas), seguido por Minas Gerais (45 usinas), Goiás (40 usinas), Alagoas (25 usinas) e Mato Grosso do Sul (23 indústrias) (NOVACANA, 2021).

Tabela 2.1 - Comparativo de quantidade de usinas sucroalcooleiras em cada região do Brasil.

Região/UF	Usinas
Norte	5
Acre	1
Amazonas	1
Rondônia	1
Pará	1
Tocantins	1
Nordeste	73
Ceará	1
Maranhão	5
Piauí	1
Rio Grande do Norte	3
Paraíba	9
Pernambuco	17
Alagoas	25
Sergipe	6
Bahia	6
Centro-Oeste	81
Mato Grosso	18
Mato Grosso do Sul	23
Goiás	40

Fonte: modificado Nova-Cana, 2021.

Tabela 2.1 – Comparativo de quantidade de usinas sucroalcooleiras em cada região do Brasil (continuação).

Região/UF	Usinas
Sudeste	225
Minas Gerais	43
Espírito Santo	6
Rio de Janeiro	5
São Paulo	171
Sul	34
Paraná	29
Rio Grande do Sul	5

Fonte: modificado Nova-Cana, 2021.

O estado do Mato Grosso do Sul, embora possua uma quantidade menor na produção e de usinas, há anos vem apresentando uma grande expansão e desenvolvimento voltado para o setor sucroenergético. Um dos principais motivos é a grande expansão territorial, clima propício para o cultivo da cana-de-açúcar, utilização de áreas degradadas e áreas antes destinadas para pecuária, nas quais vem sendo utilizadas para plantio da cana-de-açúcar (Centenaro, 2012; Ferri, 2014).

Atualmente na safra 2020/21, o estado apresentou um acréscimo de 3,1% na produção da cana-de-açúcar comparado a safra anterior. As condições climáticas favoráveis apresentado neste ano principalmente no aspecto pluviométrico, possibilitou o aumento na produção para o estado, chegando a produção de 2.869 milhões de litros de etanol total e produzindo 1.847 mil toneladas de açúcar (CONAB, 2021)

Além de que o bioetanol não é somente utilizado como combustível de veículos, o mesmo possui uma extensa utilidade entre outras indústrias e até mesmo na área da saúde, por exemplo a atual situação mundial da pandemia de COVID-19 e às recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o uso de desinfetantes contendo álcoois como etanol e isopropanol para combate adequado ao coronavírus (Kratzel *et al.*, 2020).

2.2.3 Processo industrial do bioetanol no Brasil

Com o desenvolvimento das tecnologias e a alta demanda pelo bioetanol acarretou às indústrias sucroenergéticas no Brasil o aumento em sua produtividade e a competição no mercado mundial (Rossi *et al.*, 2021), apresentando um enorme potencial para o crescimento e otimização em sua produção (Jaiswal *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2020; Rossi *et al.*, 2021). Há dois diferentes processos de produção do etanol o sistema contínuo

e o descontínuo, conhecido também como batelada. A Figura 2.1 apresenta o processo de batelada (descontínuo), sendo este um dos mais encontrados nas indústrias sucroenergéticas. Atualmente o sistema de batelada é caracterizado em dois sub-grupos, batelada alimentada e simples.

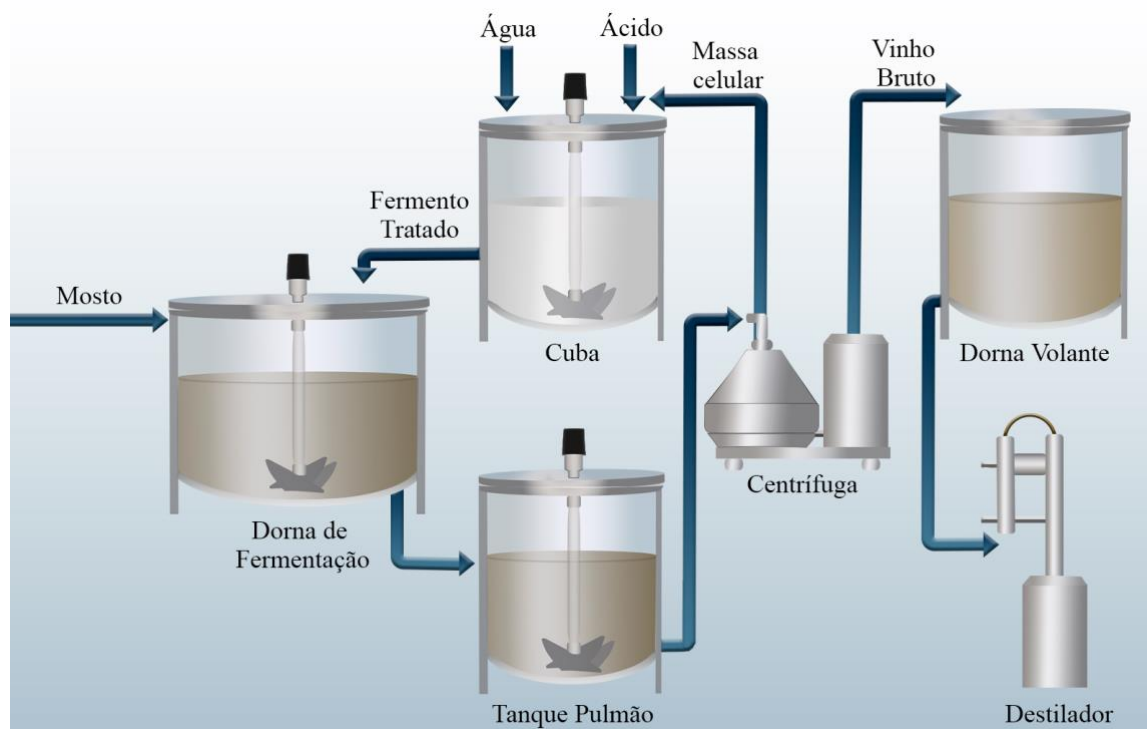


Figura 2.1 - Etapas do processo de fermentação alcoólica na condução pelo sistema de batelada simples Mellie-Boinot. Fonte: elaborado pelo autor.

O processo de batelada simples, conhecido por Mellie-Boinot, é considerado “mais simples”, e bastante estabelecido nas indústrias. Cerca de 75% das indústrias operam com o sistema batelada simples, principalmente as plantas mais antigas. O sistema tem por característica iniciar o processo fermentativo já com a capacidade máxima de mosto dentro das dornas de fermentação e com o inóculo (Basso *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2016; Neitzel *et al.*, 2020).

A produção de bioetanol no sistema de batelada simples inicia-se quando as leveduras são adicionadas as dornas de fermentação, já completa com o substrato, perdurando de 8 a 10 horas. Após esse período a dorna é considerada inativas e sem atividade biológica, devido à queda de nutrientes. Enquanto o sistema batelada alimentada, é considerado uma evolução baseada no Melle-Boinot, tendo como diferença

principalmente a alimentação do substrato através de uma vazão contínua e regular nas dornas de fermentação (Basso *et al.*, 2008).

A batelada alimentada inicia-se com o inóculo já dentro das dornas de fermentação cerca de 1/3 do volume total das dornas de fermentação contendo cerca de 60 a 90 g.L⁻¹ de massa seca de leveduras (Neitzel *et al.*, 2020), e ao decorrer do tempo a dorna é alimentada com substrato. Como dito a principal diferença do sistema é a alimentação do substrato nas dornas de fermentação, sendo considerado final do processo após completar o volume total da dorna (Carvalho e Sato, 2001).

Tornando o sistema de batelada atrativo e vantajoso para as indústrias sucroenergéticas, devido a flexibilidade de se desenvolver planos e estratégias durante a alimentação do substrato e controle da concentração dos nutrientes durante a fermentação alcoólica, se tornando uma das principais ferramentas de otimização da produção do bioetanol (Lee *et al.*, 1999).

E quando comparado o sistema de batelada simples e alimentada há algumas diferenças significativas entre os dois processos de fermentação (Carvalho & Sato, 2001; Schimidell & Facciotti, 2001), apresentado na Tabela 2.2.

Embora os sistemas de batelada seja bastante muito utilizado nas indústrias sucroenergéticas, ainda há muitas pesquisas e investimento para melhoria dos mesmos, desde as estratégias envolvendo modelos matemáticos (Costa *et al.*, 2014), produção de butanol com hidrolisados utilizando diferentes biomassas em batelada (Li *et al.*, 2019), produção de butanol utilizando melaço em sistema de batelada alimentada (Chacón *et al.*, 2021) e até mesmo os efeitos das contaminações durante a produção de bioetanol utilizando hidrolisado no sistema de batelada alimentada (Vieira *et al.*, 2021).

Tabela 2.2 - Diferenças e particularidades entre o sistema de batelada simples e batelada alimentada.

Características	Batelada	
	Simple	Alimentada
Condições assepsia	Boa e mais simples de se realizar	Maior probabilidade de contaminação
Manutenção	Mais simples	Mais complicada
Risco de Contaminação	Menor	Maior
Adaptação das leveduras ao mosto	Mais lenta	Mais rápida
Rendimento de fermentação	Menor	Maior
Potencial de automação	Boa	Boa

Fonte: elaborado pelo autor (modificado, Carvalho & Sato, 2001; Schimidell & Facciotti, 2001).

Além dos sistemas de batelada há o processo de produção conhecido como sistema contínuo, o processo de fermentação contínua tem por sua principal característica a fermentação ininterrupta até o término da safra (Aravéchia, 2013). O sistema contínuo utiliza várias dornas com dimensões maiores do que as utilizadas no sistema de descontínuo, o substrato é encaminhado a primeira dorna de fermentação com uma vazão contínua e controlada, o substrato da primeira dorna é encaminhado para “dorna 2” até chegar na última dorna de fermentação (Pereira *et al.*, 2020).

A produção contínua visa a produção máxima do bioetanol, no entanto no sistema contínuo há alguns pontos críticos, como por exemplo, a exigência de um maior cuidado com a contaminação bacteriana, pois quando há ocorrências de contaminação bacteriana a perda é muito maior quando comparado ao processo de batelada (Aravéchia, 2013; Lopes *et al.*, 2016).

Quando comparados os sistemas de produção, contínuo e batelada, as indústrias sucroenergéticas dão preferência ao sistema de batelada, principalmente o sistema de batelada alimentada, devido o apresentar algumas vantagens comparado ao sistema contínuo, como por exemplo, maior rendimento de fermentação (Lopes *et al.*, 2016).

A Tabela 2.3 apresenta as características e diferenças entre os sistemas de produção contínuos e batelada alimentada

Tabela 2.3 - Esquema representativo das características e diferenças entre os sistemas de produção contínua e batelada alimentada.

Características	Sistema de fermentação	
	Contínuo	Batelada Alimentada
Rendimento fermentativo (%)	87 – 89,5	88,9 – 90,5
Contaminação bacteriana do mosto (UFC/mL)	3,8 – 9,9 x 10 ⁷	2,0 – 3,9 x 10 ⁷
Ácido sulfúrico (g/L de etanol produzido)	8 – 14 g/L	6 – 7 g/L
Antibióticos (g/L de etanol produzido)	5,7 – 13 g/L	3,8 – 8 g/L
Anti-espumante (g/L de etanol produzido)	0,47 – 0,75 g/L	0,45 – 0,70 g/L

Fonte: elaborado pelo autor (modificado, Lopes *et al.*, 2016).

Embora os processos de condução da fermentação alcóolica citados acima são os mais utilizados no Brasil, atualmente há pesquisas relacionadas para metodologias e alternativas para o processo de produção.

Um dos exemplos é a utilização do método *syngas* (fermentação do gás de síntese), segundo Medeiros et al. (2020) o método é um sistema alternativo para produção de biocombustíveis. A produção tem por objetivo realizar a conversão de CO, H₂ e CO₂ em bioetanol, e até mesmo outros produtos químicos utilizando bactérias autotróficas facultativas chamadas acetogênicos. Devido ao gás de síntese ser produzido por meio da gaseificação de diversas matérias-primas, até mesmo resíduos sólidos urbanos, esse sistema é considerado uma alternativa promissora e flexível às rotas bioquímicas nas quais dependem da liberação de açúcares da biomassa lignocelulósica.

2.2.4 Fatores influenciadores da fermentação alcoólica.

O processo de produção do bioetanol é realizado através da conversão dos açúcares fermentescíveis de um determinado substrato em moléculas de bioetanol, através da fermentação das leveduras. No Brasil as indústrias sucroenergéticas utilizam como substrato o mosto no qual é obtido da cana-de-açúcar, conhecido como etanol de primeira geração (1G). Pois o balanço energético do mosto é mais favorável comparado as outras materiais-prima, como por exemplo o milho (Basso *et al.*, 2008; Della-Bianca *et al.*, 2013), propiciando um excelente rendimento de produção (90-95%) e produtividades (10-15 g·L⁻¹·h⁻¹) (Basso *et al.*, 2008; Farias & Filho, 2021).

Segundo Guidini (2013), a fermentação alcoólica pode ser esquematizada pela seguinte reação:



Seguindo a estequiometria, com 1g de glicose (C₆H₁₂O₆) poderiam ser produzidos 0,51 g de bioetanol (C₂H₅OH) e 0,49 g de dióxido de carbono (CO₂), porém, vários fatores, como por exemplo, contaminação bacteriana, contaminação por leveduras selvagens, variação do pH, altas temperatura e até mesmo a síntese celular e de produtos secundários, pode limitar o rendimento fermentativo (Guidini, 2013).

O substrato antes de ser encaminhado ao processo de fermentação é submetido a ajustes, propiciando as melhores condições para as leveduras, como por exemplo, o ajuste do Brix (teor de sólidos solúveis) (Mutton *et al.*, 2012). Geralmente o teor de sólidos solúveis não é superior a 20 °Brix (até 200 g L⁻¹) de açúcares fermentáveis totais (glicose e frutose) (Amorim *et al.*, 2011; Basso *et al.*, 2011), porém a faixa de 18 a 22 °Brix é industrialmente amplamente aceitável (Brexó *et al.*, 2017).

Uma prática muito utilizada nas indústrias é o pé de cuba, a massa celular é previamente submetida a uma solução de mosto diluído na concentração aproximadamente à 4 °Brix, para a adaptação dos micro-organismos ao meio fermentativo e conseqüentemente ocasionando um menor estresse quando encaminhado ao processo de fermentação (Costa *et al.*, 2018).

Outro fator no qual influência diretamente a eficiência fermentativa é a temperatura, principalmente no Brasil, um país tropical onde apresenta temperaturas mais elevadas. Em algumas regiões as dornas de fermentações podem chegar à 40 – 45 °C (Chamnipa *et al.*, 2018), tornando extremamente prejudicial as leveduras, devido sua sensibilidade à altas temperaturas (Tanimura *et al.*, 2012).

Um das alternativas é a bioprospecção e estudos de linhagens termolatorantes, segundo Prado *et al.* (2020) há linhagens de *S. cerevisiae* indentificadas, capazes de obter um bom rendimento celular e fermentativo em à 40 °C, devido a mudança na sua expressão genética. Esta ferramenta permite que as leveduras selecionadas durante o processo industrial, se mantém adaptadas ao substrato. Porém, uma das maiores preocupações está relacionada a assepsia do substrato, propiciando o desenvolvimento de leveduras selvagens e bactérias nas dornas de fermentação (Lopes *et al.*, 2016).

Uma das características que favorecem a contaminação de bactérias e das leveduras selvagens (leveduras oriundas do próprio processo fermentativo) é o elevado volume de produção e a dificuldade de se manter uma produção asséptica (Amorim & Oliveira, 1982; Basso *et al.*, 2008; Lucena *et al.*, 2010), diminuindo significativamente o rendimento fermentativo (Oliveira & Pagnocca, 1988; Basso *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2016).

A maioria das bactérias encontradas no processo de fermentação são Gram-positivas (98,52%) do gênero *Lactobacillus* (59,75%) (Lucena *et al.*, 2010; Caetano & Madaleno, 2011) sendo as bactérias *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus vini* as mais encontradas durante o processo fermentativo (Yokoya & Oliva-Neto, 1991).

E tem por características a produção de manitol, ácido lático e acético através do consumo preferencialmente de frutose e glicose, ocasionando um impacto direto no rendimento fermentativo (Basso *et al.*, 2014), devido a competição pelo substrato e a produção de sub-produtos que muitas vezes são prejudiciais as leveduras.

A competição pelos açúcares do substrato é outro fator que ocasiona a queda da eficiência fermentativa, pois os micro-organismos contaminantes convertem os açúcares

em outros metabólitos, como por exemplo, ácidos orgânicos, ocasionando a inibição nas leveduras e a floculação (Lopes *et al.*, 2004; Ceccato-Antonini & Covre 2020).

As indústrias sucroenergéticas no país possuem algumas iniciativas visando o controle da contaminação bacteriana, por exemplo o tratamento ácido entre os ciclos fermentativos (Costa *et al.*, 2018) e aplicação de antibióticos (Lopes *et al.*, 2016), a Tabela 2.4 apresenta os antibióticos mais utilizados nas indústrias sucroenergéticas.

Tabela 2.4 - Antibióticos mais utilizados nas indústrias sucroenergéticas

Antibiótico	Bactérias	Referência
Penicilina	Gram-positivos	Bregagnoli, 2006; Moraes <i>et al.</i> , 2006
Oxitetraciclina	Gram-positivos	Bregagnoli, 2006; Moraes <i>et al.</i> , 2006
Monensina	Gram-negativa e positiva	Silva, 2010.
Kamorán®	Gram-positivos	Silva, 2010

Fonte: elaborado pelo autor.

Porém a prática do uso de antibióticos trás consigo alguns problemas ambientais, por exemplo, a dose necessária para inibir as bactérias além de ser prejudicial às leveduras há o risco de o princípio ativo permanecer nos subprodutos da fermentação (vinhaça e massa seca), ocasionando um grande impacto no meio ambiente (Costa *et al.*, 2018). Com isso uma das alternativas aplicadas pelas indústrias brasileiras é a utilização do reciclo celular, uma prática muito comum.

O reciclo celular tem por característica, a centrifugação da massa celular após o período de fermentação, onde é separada do vinho fermentado e encaminhada ao tratamento ácido. Durante o processo do tratamento ácido é realizado a lavagem das células com uma solução de água ácida sulfúrica (pH 2,0-2,5) por um período de 1 a 2 h. Em seguida a massa celular tratada é enviada novamente para os tanques para novo ciclo fermentativo (Amorim *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2016).

No entanto o tratamento ácido tem a possibilidade de não ser tão eficaz quando há altos níveis de contaminações, além de ter alto consumo de ácido sulfúrico, que pode ser prejudicial a parede celular das leveduras, uma alternativa é a adição de um percentual de etanol durante o tratamento ácido.

Foram testados adição do etanol nas concentrações de 15, 20, 25, 30 e 35% de etanol e a variação do pH entre 2,0 a 6,0, (Ceballos-Schiavone, 2009), segundo Costa *et al.* (2018) a concentração de 5% de etanol com pH 2,0 apresentou a inibição da bactéria *L.*

fermentum, e manteve a produção de etanol (aproximadamente 4,5 g 100 mL⁻¹) e o desenvolvimento das leveduras durante o processo fermentativo. Um dos motivos no qual pode ter ocasionado a inibição das bactérias é que a solução ácida mais etanol, agiu na estrutura celular das bactérias e ocasionado assim a inibição dos micro-organismos.

A soma das variáveis, como, altas temperaturas, concentração dos substratos, de etanol, variação do pH, contaminações por bactérias e leveduras selvagens e a produção de subprodutos, podem levar ao estresse fisiológicos das leveduras.

Com isso é imprescindível a utilização de linhagens robustas, nas quais suportam o estresse sem influenciar em sua viabilidade celular durante os ciclos fermentativos (Zhao & Bai, 2009; Lopes *et al.*, 2016). Além disso muitas das linhagens de leveduras foram se adaptando naturalmente ao processo de fermentação alcoólica, possibilitando assim as indústrias isolar algumas linhagens, nas quais hoje são consideradas “leveduras de elite”, como a *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. cerevisiae* PE-2 que tiveram seus genomas sequenciados em 2009 (Basso *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2011.)

2.2.5 Leveduras no processo fermentativo

S. cerevisiae são as principais leveduras para a produção do bioetanol, com várias linhagens consolidadas para a produção do etanol 1G, porém é fundamental sempre a busca de leveduras alternativas para produção.

A decisão de qual levedura a ser utilizada no processo industrial, irá depender das características do processo, levando em consideração não apenas rendimento fermentativo, mas também características que permitem a sobrevivência das durante todo o processo (Lopes *et al.*, 2016; Hans *et al.*, 2019; Ceccato-Antonini & Covre, 2020). Além disso devido à prática do reciclo celular, estipula-se que durante a safra a massa celular passa por aproximadamente 400 ciclos fermentativos (Basso *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2016).

O processo de conversão dos açúcares em bioetanol das leveduras apresenta em sua rota metabólica 12 reações, onde cada reação ocorre ação de uma enzima específica. Segundo Rodrigues *et al.* (2018), de uma forma simplificada o processo de conversão ocorre através da lise da sacarose através da enzima invertase, obtendo-se a glicose e frutose, que por sua vez estes açúcares são convertidos em piruvato. As moléculas de piruvato são convertidas em acetaldeído, através da reação de descarboxilação pela enzima Piruvato Descarboxilase, obtendo-se uma molécula de CO₂. O acetaldeído por sua vez é reduzido a bioetanol a partir da enzima álcool desidrogenase.

O bioetanol e o CO₂ não são os únicos produtos obtidos durante a fermentação alcoólica, além destes há vários subprodutos que são produzidos, por exemplo, ácidos orgânicos, outros alcóois e glicerol, sendo este um dos principais subprodutos da fermentação (Bai *et al.*, 2008).

Muitas das leveduras industriais atualmente já estabelecidas no mercado, são leveduras selvagens nas quais foram isoladas obtidas através de estudos, por exemplo, as *S. cerevisiae* CAT-1, PE-2, BG-1, FT-858 e Fermel. A alteração em sua classificação foi devido aos estudos referentes às características genômicas, metabólicas, transcriptômicas além da caracterização das condições ideais de fermentação.

O entendimento desses mecanismos em relação à sua superioridade nas condições industriais colaborou para a obtenção de leveduras modificadas por meio de abordagens da edição do genoma, por exemplo, o sistema CRISPR-Cas9 (Ceccato-Antonini & Covre, 2020), visando o aumento do rendimento fermentativo, tolerância a altas concentrações do bioetanol e aos compostos inibidores e a termotolerância (Xue *et al.*, 2019; Javed *et al.*, 2019; Ozsoz *et al.*, 2019).

Com os avanços tecnológicos na área da biologia molecular propiciou a aplicação de metodologias em leveduras e na produção do bioetanol, para a melhoria de rendimento, maior tolerância ao estresse ocasionados pelo bioetanol e aos ácidos, altas temperaturas (Abreu-Cavalheiro & Monteiro 2013; Inai *et al.*, 2013; Khatibi *et al.*, 2014; Gombert & Van Maris, 2015; Favaro *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020).

Além da capacidade para combater a contaminação bacteriana, uma vez que as próprias *S. cerevisiae* são capazes de produzir peptídeos antimicrobianos nos quais podem reduzir consideravelmente o uso de alguns produtos no controle da contaminação (Al-Sahlany *et al.* 2020; Ceccato-Antonini & Covre, 2020).

Embora as pesquisas voltadas à biologia molecular das leveduras sejam de maior notoriedade atualmente, é imprescindível a bioprospecção de novos micro-organismos além dos estudos fisiológicos buscando entender a capacidade e sua aplicabilidade comercial (Silva & Fonseca, 2016; Andrade *et al.*, 2017).

Um dos motivos está relacionado ao princípio da prudência no qual tem foi estabelecido através do Protocolo de Cartagena, e tem por objetivo a proteção da diversidade biológica e da saúde humana, diante a utilização dos micro-organismos OGMs (organismos geneticamente modificados), nos quais são gerados através da aplicação da tecnologia do DNA recombinante (Ribeiro & Marin, 2000; Prudente, 2004; Valois, 2016).

Além disso devido o reciclo celular durante a safra (aproximadamente 400 reciclos) e a influencia de micro-organismos contaminantes, oriundos de etapas antecedentes à fermentação (Basso et al., 2008; Lopes et al., 2015; Lopes et al., 2016), torna-se a utilização dos OGMs ainda mais preocupantes em escala industrial, uma vez que possa vir a ocorrer uma uma vez que possa ocorrer uma mutação nos micro-organismos presentes comprometendo assim a integridade da biossegurança.

Com isso devido à alta biodiversidade mundial de micro-organismos a busca por micro-organismos e compreensão do mesmo é fundamental, visando aqueles no qual possuem alguma estratégia metabólica, como rotas de conversão e até mesmo gene-chaves para otimização do processo e até para fermentação da xilose (Valinhas *et al.*, 2018).

Devido o grande avanço da produção do etanol de segunda geração (2G), obtido a partir da biomassa lignocelulósica (Kuila *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2019), a busca por micro-organismos fermentadores de hexoses tem ganhado um grande destaque, uma vez que os hidrolisados lignocelulósicos possuem cerca de 60 a 70% de glicose e 30 a 40% de xilose (Kwak & Jin, 2017).

Embora a *S. cerevisiae* seja a levedura comercial mais utilizada (Radecka *et al.*, 2015), a mesma não possui capacidade de fermentar alguns açúcares, como por exemplo a xilose, fazendo-se necessário a busca por um micro-organismo alternativo para reaproveitar a xilose.

2.2.6 Etanol de segunda geração (2G) e o futuro da produção do bioetanol

Com a crescente preocupação ambiental nos últimos anos, grupos industriais e órgãos governamentais tem se mobilizado cada vez mais, visando diminuir os impactos ambientais ocasionados principalmente pelos resíduos agroindustriais. Com o aumento da demanda dos produtos agroindustriais, como o bioetanol, açúcar e a bioenergia, possibilitou ao setor várias oportunidades e possibilidades para desenvolver e contribuir com a causa ambiental (Martins *et al.*, 2019).

Laufenberg et al. (2003) já alegavam que os resíduos contêm inúmeras substâncias de valores agregados podendo ser utilizados como matérias-primas promissoras ou até serem convertidos diretamente em um produto de valor comercial, como por exemplo a extração da glicose, xilose e lignina do bagaço da cana-de-açúcar no qual propicia grandes oportunidades de processos bioquímicos serem anexados às biorrefinarias de cana-de-açúcar existentes (Chacón *et al.*, 2021).

Embora os combustíveis oriundos de fósseis não renováveis como petróleo, gás natural e o carvão, ainda são as fontes primária de energia, tem sido cada vez mais consideradas como inadequadas, pelo ponto de vista ambiental e até mesmo de saúde pública (Lugani *et al.*, 2020). Com isso a busca por combustíveis alternativos e sustentáveis se tornou essencial para atender às futuras demandas globais de geração de energia e mitigar os impactos ambientais (Silva *et al.*, 2018; Alencar *et al.*, 2020).

Com isso um dos mais beneficiados foi o setor sucroenergético, devido a todos os esforços visando o comprometimento ambiental possibilitou ao setor diversas oportunidades e possibilidades para desenvolver e contribuir com o propósito (Martins *et al.*, 2019).

Além das demandas pela sustentabilidade, há uma pressão pela geração de mais valor por hectare de cana-de-açúcar, visando o aumento na produção do bioetanol e a busca para o desenvolvimento de alternativas de produção, como por exemplo, a reutilização do bagaço da cana, para produção de produtos químicos como ácidos orgânicos (Schmidt *et al.*, 2017; Oonkhanond *et al.*, 2017) e dióis (Song *et al.*, 2012), materiais à base de lignina (Bertolo *et al.*, 2019) e principalmente para produção do bioetanol.

Como dito o bagaço de cana-de-açúcar foi uma peça fundamental para o setor sucroenergético, pois antes era considerado um “problema” para indústria, hoje é uma matéria-prima de alto valor agregado. Apresentando várias oportunidades de reaproveitamento, por exemplo, a obtenção de produtos químicos como ácidos orgânicos (Schmidt *et al.*, 2017; Oonkhanond *et al.*, 2017) e dióis (Song *et al.*, 2012), materiais à base de lignina (Bertolo *et al.*, 2019), e a produção do bioetanol, conhecido como etanol de segunda geração (2G), no qual ganhou um grande destaque e aceitação no mercado mundial já alguns anos (Kuila *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que a eficiência de produção depende muito da composição química da biomassa e também de sua disponibilidade, estima-se que a cada 1 tonelada de cana moída há uma geração de aproximadamente 250 kg de bagaço (Bonassa *et al.*, 2015), sendo outro grande destaque para utilização do bagaço como biomassa, sua alta disponibilidade.

Proém estima-se que se os biocombustíveis 2G atingirem o potencial máximo de produção, possam cobrir cerca de 40% do consumo total de energia do mundo (Meher *et al.*, 2006; Gielen *et al.*, 2019). Um dos motivos é devido à diversas origens das matérias-primas no qual possibilitaria a produção do etanol 2G (Tabela 2.5):

Tabela 2.5 - Biomassas lignocelulósicos utilizadas para produção do etanol 2G.

Matéria-prima	Referência
Resíduos de bananeira	Ingale <i>et al.</i> (2014); Jahid <i>et al.</i> (2018); Khaliq <i>et al.</i> (2020)
Palha de cevada	Lara-Serrano <i>et al.</i> (2018)
Palha de milho	Zakir <i>et al.</i> (2016); Dhiman <i>et al.</i> (2017)
Caule de algodão	Nikolić <i>et al.</i> (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	Wong & Sanggari (2014); Zakir <i>et al.</i> (2016); Cheng <i>et al.</i> (2019); Vieira <i>et al.</i> (2021);
Palhiço de cana-de-açúcar	Moutta <i>et al.</i> (2013)
Fibra de coco verde	Gonçalves <i>et al.</i> (2015); Ebrahimi <i>et al.</i> (2017); Nogueira <i>et al.</i> (2018), (2019), (2021); Padilha <i>et al.</i> (2020).
Farelo de cevada	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Folhas de milho	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Eucalyptus globulus	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Palha de arroz	Mussato & Roberto (2002); Mohammadi <i>et al.</i> (2019)
Palha de trigo	Cândido <i>et al.</i> (2002)
Casca de aveia	Felipe <i>et al.</i> (2003)
Palha de Sorgo	Herrera <i>et al.</i> (2004)
Resíduo de algodão sujo	Fockink <i>et al.</i> (2020)
<i>Panicum virgatum</i>	Xia <i>et al.</i> (2014)

Fonte: elaborado pelo autor.

A Tabela 2.6 apresenta a composição química parcial de algumas biomassas mais utilizadas para a produção do etanol 2G, há diversas possibilidades de matéria-prima lignocelulósicas, pois segundo Padilha *et al.* (2020), essas biomassas basicamente podem ser descritas como compostos de multicamadas formadas por três polímeros principais: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose que está disponível nas biomassas lignocelulósicas, são polissacarídeos lineares formados por unidades de glicose unidas por ligações β -1.4 (Mood *et al.*, 2013).

Já a hemicelulose é um polissacarídeo amorfo de estrutura ramificada, formada por pentoses (xilose, arabinose e ramnose) e hexoses (glicose, galactose e manose) podendo variar de acordo com a sua origem (Brandt *et al.*, 2013). A lignina é um polímero aromático no qual atua como uma espécie de cola, dando rigidez e proteção aos polissacarídeos contra ataques enzimáticos (Moura *et al.*, 2010; Schutyser *et al.*, 2018).

Tabela 2.6 - Composição química (parcial) de algumas biomassas lignocelulósicas utilizadas para produção do etanol 2G.

Biomassa*	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Bagaço	39,99	21,82	26,51	Moutta <i>et al.</i> (2013)
Palhiço	29,39	31,38	26,00	Moutta <i>et al.</i> (2013)
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Mussato & Roberto (2002)
Palha de trigo	33,81	31,83	20,12	Cândido <i>et al.</i> (2002)
Palha de sorgo	34,00	44,00	20,00	Herrera <i>et al.</i> (2004)

Fonte: elaborado pelo autor.

* Sem pré-tratamento (ácido ou enzimático).

Já há um tempo existe o interesse em converter a biomassa lignocelulósica, não só em bioetanol, mas também em produtos químicos (Silva *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2019). Outro ponto positivo em relação a produção do etanol 2G é que além de ser um combustível quase neutro na emissão de carbono, decorre que não compete com a produção de açúcar, quando comparado ao etanol de 1G no qual se tem o mix de produção (Mohr & Raman, 2013; Robak & Balcerek, 2018).

Segundo Lugani *et al.* (2020), o processo de produção do etanol 2G é dividido em três principais etapas, sendo o processo de pré-tratamento, no qual tem por objetivo solubilizar os componentes da biomassa lignocelulósica, reduzindo os efeitos negativos da lignina, propiciando uma maior superfície de contato às fibras de celulose, quando utilizado enzimas (Zhao *et al.*, 2017), além de reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar significativamente a porosidade (McMillan, 1994).

Devido à complexidade dos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica e devido ao empacotamento fechado dentro da estrutura recalcitrante da lignina, as torna altamente resistentes à degradação por métodos químicos e enzimáticos (Haldar & Purkait, 2020). Isso acarreta em um dos primeiros gargalos encontrado para a produção do etanol 2G, embora tenha uma alta disponibilidade ainda é um desafio em relação ao alto rendimento e produtividade do processo de conversão, ocasionando o impacto direto ao custo-benefício (Kumar *et al.*, 2009).

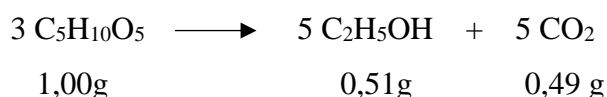
Após o pré-tratamento é realizada a sacarificação, ou hidrólise, na qual utilizam-se ácidos ou enzimas para hidrolisar a celulose polimérica e a hemicelulose em açúcares monoméricos fermentáveis (hexoses e pentoses). Em muitos casos apesar de ser mais custoso a hidrólise enzimática é preferida à hidrólise ácida, pois necessita uma quantidade menor de energia, e à redução da formação de subprodutos. Entretanto há vários fatores que influenciam a hidrólise enzimática, por exemplo a superfície de contato,

cristalinidade da celulose e o grau da polimerização, teor de ligninina, sinergia e a eficácia enzimática (Myat & Ryu, 2016; Lugani & Sooch, 2018; Cheng *et al.*, 2019; Kucharska *et al.*, 2020; Lugani *et al.*, 2020), e por final a fermentação propriamente dita sendo outro gargalo da produção do etanol 2G.

Quando há a hidrolise das hemiceluloses, se tem uma predominância de glicose e xilose, e em menores proporções, arabinose, galactose e manose, sendo que a preferência de fermentação dos açúcares variam de micro-organismos para micro-organismos (Gong *et al.*, 2013).

Com isso a seleção do micro-organismos para a fermentação alcoólica depende não só da sua capacidade da adaptabilidade aos fatores inibitórios, mas também de sua capacidade fermentativa, ou seja, a capacidade de aproveitar os diversos substratos (Hans *et al.*, 2019). Esse é um dos principais problemas encontrados para a produção do etanol 2G, pois as leveduras comerciais utilizadas na produção do 1G não possuem as mesmas capacidades fermentativas para aproveitar, por exemplo a xilose, sendo umas das alternativas a busca por leveduras selvagens ou a utilização de leveduras geneticamente modificados (Lugani *et al.*, 2020; Ceccato-Antonini & Covre 2020).

De acordo com a estequiometria as moléculas de etanol podem ser produzidas a partir de três moléculas de xilose, conforme apresentada na equação abaixo, os valores representam o rendimento teórico máximo (Moutta *et al.*, 2013).



Há muitos micro-organismos já identificados e classificados comprovando a capacidade do aproveitamento da xilose para a produção do etanol, nota-se que embora exista grande diversidade de micro-organismos fermentadores de xilose, ainda tem muito a ser explorado devido a diversidade mundial de micro-organismos, ambientes e resíduos.

A Tabela 2.7 apresenta um levantamento bibliográfico dos trabalhos apresentando o rendimento fermentativo dos micro-organismos utilizando xilose.

Tabela 2.7 - Estudos utilizando micro-organismos fermentadores de xilose e suas respectivas biomassas.

Micro-organismo	Biomassa	Referência
Leveduras		
<i>Pachysolen tanaphilus</i>	Meio Mineral utilizando xilose.	Nigam et al., 1985
<i>Cândida shehatae</i>	Meio Mineral utilizando xilose	Nigam et al., 1985
<i>Pichia stipitis</i>	Meio Mineral utilizando xilose	Nigam et al., 1985
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1400 – PLNH33 ^a	Meio Mineral utilizando xilose	Krishnan et al., 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (XYL 1, XYL 2) ^a	Hidrolisado lignocelulósico	Olsson & Hahn-Hagerdal, 1996
<i>Schizosaccharomyces pobe</i> (xyl A) ^a	Hidrolisado lignocelulósico	Olsson & Hahn-Hagerdal, 1996
<i>Pachysolen tannophilus</i> ^b	Hidrolisado lignocelulósico	Olsson & Hahn-Hagerdal, 1996
<i>Candida guilliermondii</i>	Bagaço	Rodriguez et al., 2003
<i>Candida tropicalis</i> NBRC 0618	Oliveira (<i>Olea europaea</i>)	Mateo et al., 2015
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Meio sintético e Bagaço de cana-de-açúcar	Martini et al., 2016
Isogênicas a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	Tran et al., 2020
BY4741 (XUSEA ^a ; XUSE ^a ; STXQ ^a ; DXS ^a)		Nogueira et al. 2021
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1)	Fibra de coco verde	Farias & Filho 2021
<i>Spathaspora passalidarum</i>	Bagaço cana-de-açúcar	2021
<i>Scheffersomyces shehata</i> UFMG-HM 52.2	Bagaço cana-de-açúcar	Antunes et al., 2021
<i>Candida tropicalis</i> UFMGBX12-a	Bagaço cana-de-açúcar	Antunes et al., 2021

Fonte: do autor.

^aMicro-organismos geneticamente modificado.

^bMicro-organismos mutantes

2.7 - Estudos utilizando micro-organismos fermentadores de xilose e suas respectivas biomassas (continuação).

Micro-organismo	Biomassa	Referência
Bactérias		
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1 ^a	Meio Mineral	Ohta et al., 1991
<i>Escherichia coli</i>	Meio Mineral	Ohta et al., 1990
<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 6423	Bagaço cana-de-açúcar	Vieira et al., 2021

Fonte: do autor.

^aMicro-organismos geneticamente modificado.

^bMicro-organismos mutantes

Embora a produção de açúcar e etanol no Brasil tenha uma representatividade histórica, o setor ainda é relativamente “jovem”, principalmente levando-se em conta que a impulsionamento de produção e comercial veio somente após a implantação do Proalcol (1970). Fica evidente a importância mundial do setor sucroenergético, além disso é notável a representatividade do setor economicamente, tecnológico e principalmente ambiental. Sendo uma das maiores virtudes do setor o desenvolvimento e a evolução ao longo dos anos, além das várias possibilidades que o setor pode oferecer nos diversos segmentos e para as pesquisas científicas.

Cabe a reflexão pois há algumas décadas atrás não se imaginava produzir etanol e bioenergia, a nível comercial, a partir do bagaço da cana-de-açúcar. Quando aplicado o processamento e o micro-organismo ideal, há diversas matérias-primas que podem ser utilizadas para produção do bioetanol, garantindo cada vez mais a sustentabilidade de produção

2.3. Referências

Abreu-Cavalheiro, A.; Monteiro, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 665-671, 2013. doi: 10.1590/S1517-83822013000300001

Al-Sahlany, S. T. G.; Altemimi, A. B.; Al-Manhel, A. J. A.; Niamah, A. K.; Lakhssassi, N.; Ibrahim, S. A. Purification of bioactive peptide with antimicrobial properties produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, 9, 324, 2020. doi: 10.3390/foods9030324.

Alcoforado, E. da S.; D'Angelo, I. B. de M.; Alves, J. S.; Araújo, G. R. de; Almerida, P. L de F. Rapadura é doce, mas é dura: um panorama da realidade de exploração no trabalho do corte da cana-de-açúcar em Pernambuco. *Revista Inclusiones*, 8, 199-223, 2021. Disponível em: <https://revistainclusiones.org/index.php/inclu/article/view/2739>

Alencar, B. R. A.; Vaz, F. L.; Neto, A. G. B.; Aquino, K. A.; Sampaio, E. V. D. S. B.; Menezes, R. S. C.; Dutra, E. D. Concentration of alkaline hydrogen peroxide (AHP) affects the recycle of the liquid fraction in the pre-treatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Waste Biomass Valoriz.* 11, 6179–6188, 2020. doi: 10.1007/s12649-019-00884-7.

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*, 91, 1267–1275, 2011. doi: 10.1007/s00253-011-3437-6.

Amorim, H. V.; Oliveira, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Açúcar Álcool*, 5, 12–18, 1982. Disponível em: https://www.fermentec.com.br/pub_arq/1981/infecção_na_feementação_como_evitá-la.pdf.

Andrade, R. P.; Melo, C. N.; Genisheva, Z.; Schwan, R. F.; Duarte, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. *Food Research International*, 91, 72–79, 2017. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.032.

ANP. *Anuário Estatístico Brasileiro Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis: 2019*; Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuario-estatistico/2019/2019-anuario-versao-impressao.pdf>>. Acesso em: mai. 2021.

Antunes, F. A. F.; Thomé, L. C.; Santos, J. C.; Ingle, A. P.; Costa, C. B.; Anjos, V.; Bell, M. J. V.; Rosa, C. A.; Da Silva, S. S. Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. *Renewable Energy*, 163, 1343-1355, 2021. doi: 10.1016/j.renene.2020.08.020.

Aravéchia, P. R. *Estudo da Influência da Pureza do Xarope e Mel Final Resultante de Produção de Açúcar na Contaminação do Processo Fermentativo e Seletividade do Meio*. Matão, trabalho de conclusão de curso (Pós Graduação lato senso em Álcool e Açúcar: das matérias primas á produção e análise de qualidade). IFSP, 2013. Disponível em: <https://www.docsity.com/pt/tcc-paulo-rogerio-aravechia/4846481/>.

Bai, F. W.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 1, 89- 105, 2008. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.002.

Basso, L. C.; Amorim, H. V.; Oliveira, A. J.; Lopes, M. L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. *FESM*, 8, 1155–63, 2008. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.

Basso, L.C.; Basso, T.O., & Rocha, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Bernardes, M.A.S. (Ed.) *Biofuel production - recent developments and prospects*. InTech, 2011, p. 85-100. Disponível em:

Basso, T. O.; Gomes, F. S.; Lopes, M. L.; Amorim, H. V.; Eggleston, G.; Basso, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacillis differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 169-177, 2014. doi: 10.1007/s10482-013-0063-6.

- Bertolo, M. R. V.; Paiva, L. B. B.; Nascimento, V. M.; Gandin, C. A.; Neto, M. O.; Driemeier, C. E.; Rabelo, S. Lignins from sugarcane bagasse: renewable source of nanoparticles as Pickering emulsions stabilizers for bioactive compounds encapsulation. *Industrial Crops and Products*, 140, 111591, 2019. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111591.
- Bonassa, G., Schneider, L. T.; Frigo, K. D. A.; Feiden, A.; Teleken, J. G.; Frigo, E. P. Subprodutos Gerados na Produção de Bioetanol: Bagaço, Torta de Filtro, água de Lavagem e Palhagem. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 4, 144-166, 2015. doi: 10.5380/rber.v4i3.44075.
- Branco, R. H.; Serafim, L. S.; Xavier, A. M. Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. *Fermentation*. 5, 4, 2019. doi: 10.3390/fermentation5010004.
- Bregagnoli, F. C. R. *Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica*. 80 f. Tese (Doutorado em microbiologia) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- Brexó, R, P.; Sant’ana, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 73, 423 – 434, 2017. doi: 10.1016/j.rser.2017.01.151.
- Caetano, A. C. G.; Madaleno, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB*, 2, 27-37, 2011. Disponível em: <https://citec.fatecjaboticabal.edu.br/index.php/citec/article/view/63>.
- Cândido, E. J., Canilha, L., Silva, J. B. A. Determinação da composição química da palhada de trigo. *In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Anais*, 7, 108, 2002.
- Carvalho, J. C.; Sato S. Fermentação descontínua alimentada. *In: Schimidel, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, A. (coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Bluncher, p. 205-218, 2001.
- Ceballos-Schiavone, C. H. M. *Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - Lactobacillus na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol*. Piracicaba, SP, Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009.
- 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*, 20, 8, 2020. doi: 10.1093/femsyr/foaa065.
- Centenaro, M. *Um estudo sobre investimento direto externo no setor sucroenergético do estado do Mato Grosso do Sul*. 194 f. Tese (Doutorado) – Universidade do Vale do Rio dos sinos- Unisinos. São Leopoldo, 2012.
- Chacón, S. J., Matias, G., Ezeji, T. C., Filho, R. M.; Mariano, A. P. Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation to produce butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, 321, 1-9, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124504.
- Chamnipa, N.; Thanonkeo, S. Klanrit, P.; Thanonkeo, P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol

production. *Biotechnology and Industrial Microbiology*, 49, 378-391, 2018. doi: 10.1016/j.bjm.2017.09.002.

Cheng, M. H.; Wang, Z.; Dien, B. S.; Slininger, P. J.; Singh, V. Economic analysis of cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse using a sequential deacetylation, hot water and disk-refining pretreatment. *Processes*, 7, 642, 2019. doi: 10.3390/pr7100642.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar, v. 7- Safra 2020/21, n. 4, p. 1-57, 2021*. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em jun. 2021.

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*, 65, 75-85, 2018. doi: 10.1111/lam.12819.

Costa, M. A.; Pasamontes, M.; Normey-Rico, J. E.; Guzman, J. L.; Berenguel, M. An advanced control strategy combined with solar cooling for improving ethanol production in fermentation units. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53, 11384-22392, 2014. doi:10.1021/ie403286m.

Cruz, J. M.; Domínguez, J. M.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. *Food biotechnology*, 14, 79-97, 2000. doi:10.1080/08905430009549981.

Della-Bianca, B. E.; Basso, T. O.; Stambuk, B. U.; Basso, L. C.; Gombert, A.K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 979–991, 2013.

Dhiman, S. S.; David, A.; Braband, V. W.; Hussein, A.; Salem, D. R.; Sani, R. K. Improved bioethanol production from corn stover: role of enzymes, inducers and simultaneous product recovery. *Applied Energy*, 208, 1420-1429, 2017. doi: 10.1016/j.apenergy.2017.09.013.

Dunford, E. K.; Miles, D. R.; Ng, S. W.; Popkin, B. Types and amounts of nonnutritive sweeteners purchased by US households: a comparison of 2002 and 2018. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 120, 1662-1671, 2020. doi: 10.1016/j.jand.2020.04.022.

Ebrahimi, M.; Caparanga, A. R.; Ordone, E. E.; Villaflores, O. B. Evaluation of organosolv pre-treatment on the enzymatic digestibility of coconut coir fibers and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation. *Renewable Energy* 109, 41–48, 2017. doi: 10.1016/j.renene.2017.03.011.

Farias, D.; Filho F. M. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar. *Fuel*, 288, 1-11, 2021. doi: 10.1016/j.fuel.2020.119673.

Favaro, L.; Jansen, T.; van Zyl, W. H. Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol.

Critical Reviews in Biotechnology, 39, 800-816, 2019. doi: 10.1080/07388551.2019.1619157.

Felipe, M. G. A.; Hauly, M. C. O.; Canettieri, E. V.; Cândido, E. J.; Tamanini, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. *In: Simpósio nacional de fermentações*, 14. (2003) *In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Anais do XIV SINAFERM*, 2003.

Ferri, A; Costa, M. A. De S; Batistote, M; Naka, M. H. Análise do perfil de produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados – MS. *Enciclopédia Biosfera*, 10, 251-268, 2014. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/analise%20do%20perfil.pdf>.

Fockink, D. H.; Andreaus, J.; Ramos, L. P.; Łukasik, R. M. Pretreatment of cotton spinning residues for optimal enzymatic hydrolysis: a case study using green solvents. *Renewable Energy*. 145, 490-499, 2020. doi: 10.1016/j.renene.2019.06.042.

Gielen, D.; Boshell, F.; Saygin, D.; Bazilian, M. D.; Wagner, N.; Gorini, R. The role of renewable energy in the global energy transformation. *Energy Strategy Reviews*. 24, 38-50, 2019. doi: 10.1016/j.esr.2019.01.006.

Gombert, A. K.; van Maris, A. J. A. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 81–86, 2015. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.012.

Gonçalves, F. A.; Ruiz, H. A.; Santos, E. S.; Teixeira, J. A.; Macedo, G.R. Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 77, 1–12, 2015. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.041.

Gong, Y. Y.; Yin, X.; Zhang, H. M.; Wu, M. C.; Tang, C. D.; Wang, J. Q.; Pang, Q. F. Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus usamii* E001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 40, 1433-1441, 2013. doi: 10.1007/s10295-013-1339-6.

Guanais, J. B.; Gil, F. (Orgs). Salário por peça e superexploração do trabalho. *In: Superexploração do trabalho no século XXI – Debates contemporâneos*. Bauru: Canal 6. 2018.

Guidini, C. Z.; Marquez, L. D. S.; Helisângela, A. S.; Resende, M. M.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J. Alcoholic Fermentation with Flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in Fed-Batch Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1623/1638-1638, 2013. doi: 10.1007/s12010-013-0646-8.

Haldar, D., Purkait, M. K. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. *Process Biochemistry*, 89, 110-133, 2020.

Hans, M.; Kumar, S.; Chandel, A. K.; Polikarpov, I. A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation. *Process Biochem.* 85, 125-134, 2019. doi: 10.1016/j.procbio.2019.06.019.

Herrera, A.; Simón, J. T. L.; Cabriales, J. J. G.; Ramírez, J. A.; Vázquez, M. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering*, 63, 103-109, 2004. doi: 10.1016/S0260-8774(03)00288-7.

- Inai, T.; Watanabe, D.; Zhou, Y.; Fukada, R.; Akao, T.; Shima, J.; Takagi, H.; Shimoi, H. Rim15p-mediated regulation of sucrose utilization during molasses fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116, 591-594, 2013. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.015.
- Ingale, S.; Joshi, S.J.; Gupte, A. Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 885-892, 2014. doi: 10.1590/S1517-83822014000300018.
- Jahid, M.; Gupta, A.; Sharma, D. K. Production of bioethanol from fruit wastes (banana, papaya, pineapple and mango peels) under milder conditions. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 8, 327, 2018. doi: 10.4172/2155-9821.1000327.
- Jaiswal, D.; De Souza, A. P.; Larsen, S.; Lebauer, D. S.; Miguez, F. E.; Sparovek, G.; Bollero, G.; Buckeridge, M. S.; Long, S. P. Brazilian Sugarcane Ethanol as an Expandable Green Alternative to Crude Oil Use. *Nature Climate Change*, 7, 788–792, 2017. doi: 10.1038/nclimate3410.
- Javed, M. R.; Noman, M.; Shahid, M.; Ahmed, T.; Khurshid, M.; Rashid, M. H.; Ismail, M.; Sadaf, M., & Khan, F. Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. *Microbiological Research*, 219, 1-11, 2019. doi: 10.1016/j.micres.2018.10.010.
- Khaliq, A. B.; Achmad, C.; Lukman, M.; Kholil, I. Making of bioethanol banana weevil as renewable energy. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*. 722, 2020. doi: 10.1088/1757-899X/722/1/012080.
- Khatibi, P. A.; Roach, D. R.; Donovan, D. M.; Hughes, S. R.; Bischoff, K. M. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacteriophage endolysins reduce *Lactobacillus* contamination during fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 104, 2014. doi: 10.1186/1754-6834-7-104.
- Kohlhepp, G. Análise da situação da produção do etanol e biodiesel no Brasil. *Estudos Avançados*, 24, 223-253, 2010. doi: 10.1590/S0103-40142010000100017.
- Kratzel, A.; Todt, D.; V'kovski, P.; Steiner, S.; Gultom, M.; Thao, T. T. N.; Ebert, N.; Holwerda, M.; Steinmann, J.; Niemeyer, D. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by WHO-recommended hand rub formulations and alcohols. *Emerging Infectious Diseases*, 26, 1592-1595, 2020. doi: 10.3201/eid2607.200915.
- Krishnan, M.S.; Ho, N.W.Y.; Tsao, G.T. Fermentation kinetics of ethanol production from glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* 1400(pLNH33). *Appl Biochem Biotechnol* 78, 373–388, 1999. doi: 10.1385/ABAB:78:1-3:373
- Kucharska, K.; Słupek, E.; Cieśliński, H.; Kamiński, M. Advantageous conditions of saccharification of lignocellulosic biomass for biofuels generation via fermentation processes. *Chem. Pap.* 74, 1199-1209, 2020. doi: 10.1007/s11696-019-00960-1.
- Kuila, A.; Sharma, V.; Garlapati, V.K.; Singh, A.; Roy, L.; Banerjee, R. Present status on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Adv Biofeedstocks Biofuels*. 1, 85, 2016. doi: 10.1002/9781119117322.ch4.
- Kumar, A., Singh, L. K.; Ghosh, S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia*

stipites. *Bioresource Technology*, 100, 3293-3297, 2009. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.023.

Kwak, S.; Jin, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microbial Cell Factories*, 16, 1-15, 2017. doi: 10.1186/s12934-017-0694-9.

Lara-Serrano, M.; Sáez Angulo, F.; Negro, M.A.J.; Morales-dela Rosa, S.; Campos-Martin, J.M., & Fierro, J.L. Second-generation bioethanol production combining simultaneous fermentation and saccharification of IL-Pretreated Barley Straw. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6, 5, 7086–7095, 2018. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b00953.

Laufenberg, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, 67-198, 2003. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00167-0.

Lee, J.; Lee, S. Y.; Park, S.; Middelberg, A. P. J. Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances*, 17, 29-48, 1999. doi: 10.1016/S0734-9750(98)00015-9.

Li, J.; Du, Y.; Bao, T.; Dong, J.; Lin, M.; Shim, H.; Yang, S.-T. n-Butanol production from lignocellulosic biomass hydrolysates without detoxification by *Clostridium tyrobutyricum* Δ ack-adhE2 in a fibrous-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 289, 121749, 2019. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121749.

Lopes, M. L.; Paulillo, S. C. L.; Cherubin, R. A.; Godoy, A. Tailored-Yeast Strains for Ethanol Production: Process-Driven Selection. *Fermentec*, 42, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/289377526_Tailored_yeast_strains_for_ethanol_production_The_process_driven_selection.

Lopes, M. L.; Paulillo, S. C. L.; Godoy, A.; Cherubin, R. A.; Lorenzi, M. S.; Giometti, F. H. C.; Bernardino, C. D.; Neto, H. B. A.; Amorim, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Biotechnology And Industry Microbiology*, 47, 64–76, 2016. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.003.

Lopes, M.L.; Amorim, H.V.; Godoy, A.; Oliveira, A.J.; Cherubin, R.A.; Basso, L.C. Interaction between yeast and acetic acid bacteria in industrial fermentation for ethanol production: a case study. *In: 11th International Congress on Yeasts.*, 1, 2004.

Lucena, B. T. L; Dos Santos, B. M; Moreira, J. L. S; Moreira, A. P. B; Nunes A. C; Azevedo, V; Miyoshi, A; Thompson, F. L; Morais, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, 10, 298–306, 2010. doi: 10.1186/1471-2180-10-298.

Lugani, Y., Sooch, B. S. Insights into fungal xylose reductases and its application in xylitol production. *Fungal Biorefineries Springer*, 121-144, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-90379-8_7.

Lugani, Y.; Rai, R.; Prabhu, A. A.; Maan, P.; Hans, M.; Kumar, V.; Kumar, S.; Chandel, A. K.; Sengar, R. S. Recent advances in bioethanol production from lignocelluloses: a comprehensive review with a focus on enzyme engineering and designer biocatalysts. *Biofuel Research Journal*. 28, 1267-1295, 2020. doi: 10.18331/BRJ2020.7.4.5.

- Martini, C.; Tauk-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 J Microbiol Biotechnol*, 32, 80, 2016. doi: 10.1007/s11274-016-2036-1.
- Martins, L. H. S.; Neto, J. M.; Gomes, P. W. P.; Oliveira, J. A. R.; Penteado, E. D.; Komesu, A. Potential feedstocks for second-generation ethanol production in Brazil, *In*: A. Kuila (Ed.), *Sustainable Biofuel and Biomass Advances and Impacts*, New York Imprint Apple Academic Press, 2019, p. 822.
- Mateo, S.; Puentes, J. G.; Moya, A. J.; Sebastián, S. Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. *Bioresource Technology*. 190, 2015. doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.045.
- McMillan, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. *In*: Himmel ME, Baker JO, Overend RP (eds) *Enzymic conversion of biomass for fuels production*. Washington: American Chemical Society, 1994, p. 192-325.
- Meher, L. C.; Sagar, D. V.; Naik, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10, 248-268, 2006. doi: 10.1016/j.rser.2004.09.002.
- Mohammadi, M., Shafiei, M., Karimi, K., Abdolmaleki, A., Mikkola, J. P., Larsson, C. Improvement of ethanol production from birch and spruce pretreated with 1-H-3-methylmorpholinium chloride. *Electronic Journal of Biotechnology*, 41, 95-99, 2019. doi: 10.1016/j.ejbt.2019.07.004.
- Mohr, A., Raman, S., Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, 63, 114–122, 2013. doi: 10.1016/j.enpol.2013.08.033.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabael, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., Ardjmand, M., Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pre-treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93, 2013. doi: 10.1016/j.rser.2013.06.033.
- Moraes, A.; Sobral, M.; Melo, A. Market efficiency: application of the concept to the sucroalcooleiro sector of Paraíba. *Revista de Administração da UFSM*, 14, 138-161, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reaufsm/article/view/39181/pdf>.
- Moraes, J. A. S., Berchielli, T. T., Reis, R. A. Aditivos. *In*: Berchielli, T. T., Pires, A.V., Oliveira, S. G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006, p. 539-561.
- Moreira, M. M. R.; Seabra, J. E. A.; Lynd, L. R.; Arantes, S. M.; Cunha, M. P.; Guilhoto, J. J. M. Socio-Environmental and Land-Use Impacts of Double-Cropped Maize Ethanol in Brazil. *Nature Sustainability*, 3, 209–216, 2020. doi: 10.1038/s41893-019-0456-2.
- Moura, J. C. M. S.; Bonine, C. A. V.; Viana, O. F.; Dornelas, M. C., Mazzafera, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 360–376. 2010. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x.
- Moutta, R.; Silva, M.; Corrales, R.; Cerullo, M.; Ferreira-Leitao, V.; Bon, E. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion.

Journal of Microbial & Biochemical Technology. 01, 2013. doi: 10.4172/1948-5948.S12-005.

Mussato, S. I.; Roberto, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 28, 34-39, 2002. Disponível em: https://www.academia.edu/26298187/Produção_biotecnológica_de_xilitol_a_partir_da_palha_de_arroz.

Mutton, M. J. R.; Missima, J. O. D.; Silvano, N.; Santos, R. F. P.; Costa, G. H. G. Qualidade tecnológica do melão produzido com cana-de-açúcar bisada. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB (Online)*, 4, 1, 2012. doi: 10.7867/1983-1501.2019v21n1p38-45.

Myat, L., Ryu, G., Pretreatments and factors affecting saccharification and fermentation for lignocellulosic ethanol production. *Cellulose Chem. Technol.* 50, 177-188, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/304349034_Pretreatments_and_factors_affecting_saccharification_and_fermentation_for_lignocellulosic_ethanol_production.

Neitzel, T.; Lima, C. S.; Biazi, L. E.; Collograi, K. C.; Costa, A. C.; Dos Santos, L. V.; Ienczak, J. L. Impact of the Melle-Boinot process on the enhancement of second-generation ethanol production by *Spathaspora passalidarum*. *Renewable Energy*, 160, 1206-1216, 2020. doi: 10.1016/j.renene.2020.07.027.

Nigam, J. N., Ireland, R. S., Margaritis, A.; Lachance, M. A. Isolation and Screening of Yeasts That Ferment d-Xylose Directly to Ethanol. *Applied and environmental microbiology*, 50, 1486–1489, 1985.

Nikolić, S.; Pejin, J.; Mojović, L. Challenges in bioethanol production: utilization of cotton fabrics as a feedstock. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 22, 375-390, 2016. doi 10.2298/CICEQ151030001N.

Nogueira, C. C., Padilha, C. E. A., Jesus, A. A., Souza, D. F. S., Assis, C. F., Sousa Júnior, F. C., Santos, E. S. Pressurized pre-treatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. *Industrial Crops and Products*, 130, 259–266, 2019. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.12.091.

Nogueira, C. C.; Padilha, C. E. A.; Leitão, A. L. S.; Rocha, P. M.; Macedo, G. R.; Santos, E. S. Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber—pre-treatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. *Industrial Crops and Products*, 112, 734–740, 2018. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.12.047.

Nogueira, C.; Padilha, C.; Santos, E. Boosting second-generation ethanol titers from green coconut fiber by using high-concentration polyethylene glycol. *Industrial Crops and Products*. 166, 113494, 2021. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113494.

Novacana - *As usinas de Açúcar e Etanol do Brasil*. Disponível em: <https://www.novacana.com/usinas_brasil>. Acesso em: 19/07/2021.

OHTA, K., Alterthum, F., Ingram, L. O. Effects of Environmental Conditions on Xylose Fermentation by Recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 463-465, 1990. doi: 10.1128/aem.56.2.463-465.1990.

- Ohta, K., Beall, D. S.; Mejia, J. P.; Shanmugam, K. T.; Ingram, L. O. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl Environ Microbiol.* 57, 2810-5, 1991. doi: 10.1128/AEM.57.10.2810-2815.1991.
- Oliveira, M. C. F. L.; Pagnocca, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: Simpósio Nacional de Fermentação, VIII. São Lourenço: Sinaferm. p. 78–81, 1988.
- Olsson, L., Hahn-Hagerdal, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312-331, 1996. doi: 10.1016/0141-0229(95)00157-3.
- Oonkhanond, B.; Jonglertjunya, W.; Srimarut, N.; Bunpachart, P.; Tantinukul, S.; Nasongkla, N.; Sakdaronnarong, C. Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and ex-situ nanofiltration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 2533–2541, 2017. doi: 10.1016/j.jece.2017.05.004.
- Ozsoz, M.; Ibrahim, A. U.; Coston, P. P. Application of Crispr technology for the generation of biofuels: a review. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 9, 1000278, 2019. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/application-of-crispr-technology-for-the-generation-of-biofuels-a-review.pdf>.
- Padilha, C. E. A., Nogueira, C. C., Oliveira Filho, M. A., Sousa Júnior, F. C., Assis, C. F., Souza, D. F. S., Oliveira, J. A., Santos, E. S. Fractionation of green coconut fiber using sequential hydrothermal/alkaline pre-treatments and Amberlite XAD-7HP resin. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 7, 103474, 2020. doi: 10.1016/j.jece.2019.103474.
- Pereira, D. A.; Macri, R. C. V.; Gimenez, A. Z. Fatores que afetam a fermentação alcoólica. *Revista Ciência & Tecnologia*, 12, 44-55, 2020. doi: 10.52138/citec.v12i1.113.
- Prado, C. D.; Mandrujano, G. P. L.; Souza, J. P.; Sgobbi, F. B.; Novaes, H. R.; Silva, J. P. M. O.; Alves, M. H. R.; Eliodório, K. P.; Cunha, G. C. G.; Giudici, R.; Procópio, D. P.; Basso, T. O.; Malavazi, I.; Cunha, A. F. Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 13, 178, 2020. doi: 10.1186/s13068-020-01817-6.
- Radecka, D.; Mukherjee, V.; Mateo, R. Q.; Stojiljkovic, M.; Foulquié-Moreno, M. R.; Thevelein, J. M. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15, 1 – 13, 2015. doi: 10.1093/femsyr/fov053.
- Robak, K., Balcerek, M. Review of second-generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technol Biotechnol*, 56, 174–187, 2018. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5428.
- Rodrigues, K.C.S., Sonogo, J. L. S., Cruz, A. J. G., Bernardo, A.; Badino, A. C. Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂ stripping for bioethanol production. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 77-88, 2018. doi: 10.1016/j.cherd.2017.12.024.

- Rodrigues, R. C.; Felipe, M. G.; Roberto, I. C.; Vitolo M. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 103-7 2003. doi: 10.1007/s00449-003-0332-2.
- Rossi, L. M., Gallo, J. M. R., Mattoso, L. H. C., Buckeridge, M. S., Licence, P., & Allen, D. T. Ethanol from Sugarcane and the Brazilian Biomass-Based Energy and Chemicals Sector. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9, 4293–4295, 2021. doi: 10.1021/acssuschemeng.1c01678.
- Schmidell, W.; Facciotti, M. C. Biorreatores e processos fermentativos. In: Schimidell, W., et al. (coor.). *Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Bluncher, 2, 179-192, 2001.
- Schmidt, L. M.; Mthembu, L. D.; Reddy, P.; Deenadayalu, N.; Kaltschmitt, M.; Smirnova, I. Levulinic acid production integrated into a sugarcane bagasse based biorefinery using thermal-enzymatic pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 99, 172–178, 2017. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.02.010.
- Schutyser, W., Renders, T., Van den Bosch, S., Koelewijn, S. F., Beckham, G. T., Sels, B. F. Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chemical Society Reviews*, 47, 852–908, 2018. doi: 10.1039/C7CS00566K.
- Silva, C. A. A.; Fonseca, G. G. Brazilian savannah fruits: Characteristics, properties, and potential applications. *Food Science and Biotechnology*. 25, 1225-1232, 2016. doi: 10.1007/s10068-016-0195-3.
- Silva, F. L.; Campos, A. O.; Santos, D. A.; Oliveira Júnior, S. D.; Padilha, C. E. A.; Sousa Júnior, F. C.; Macedo, G. R.; Santos, E. S. Pre-treatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. *Renewable Energy*, 116, 299–308, 2018. doi: 10.1016/j.renene.2017.09.064.
- Silva, G. K. C. *Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para obtenção do etanol*. Trabalho de Conclusão Curso (Graduação do curso de Tecnologia em Biocombustíveis). Faculdade de Tecnologia, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba, 93 f. 2010.
- Silva, H. J. T.; Santos, P. F. A.; Nogueira Junior, E. C.; Vian, C. E. F. Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. *Revista Política Agrícola*, 29, 142-159, 2020. Disponível em: <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/1567/pdf>.
- Song, Y.; Li, Q.; Zhao, X.; Sun, Y.; Liu, D. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse. *BioResources*, 7, 4517–4530, 2012. Disponível em: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/production-of-23-butanediol-by-klebsiella-pneumoniae-from-enzymatic-hydrolyzate-of-sugarcane-bagasse/>.

- Souza, A. P.; Grandis, A.; Leite, D. C. C.; Buckeridge, M. S. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. *BioEnergy Research*, 7, 24–35, 2014. doi: 10.1007/s12155-013-9366-8.
- Tanimura, A.; Nakamura, T.; Watanabe, I.; Ogawa, J.; Shima, J. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *Springer Plus*, 1, 1-7, 2012. doi: 10.1186/2193-1801-1-27.
- Tran, P. H. N.; Ko, J.K.; Gong, G.; Um, Y.; Lee, S. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. *Biotechnol Biofuels*. 22, 13-12. 2020. doi: 10.1186/s13068-019-1641-2.
- Valinhas, R. V.; Pantoja, L. A.; Maia, A. C. F.; Miguel, M. G. C. P.; Vanzela, Na. P. F. C.; Nelson, D. L.; Santos, A. S. Xylose fermentation to ethanol by new *Galactomyces geotrichum* and *Candida akabanensis* strains. *PeerJ*. 6, 1-16, 2018. doi: 10.7717/peerj.4673. eCollection 2018.
- Vieira, C. F. S.; Mauger Filho, F.; Maciel Filho, R.; Mariano, A. P. Sugarcane bagasse hydrolysates as feedstock to produce the isopropanol-butanol-ethanol fuel mixture: effect of lactic acid derived from microbial contamination on *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *Bioresource Technology*, 319, 124140, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124140.
- Wong, Y.; Sanggari, V. Bioethanol production from sugarcane bagasse using fermentation process. *Oriental Journal of Chemistry*, 30, 507-513, 2014. doi: 10.13005/ojc/300214.
- Wu, R.; Chen, D.; Cao, S.; Lu, Z.; Huang, J.; Lu, Q.; Chen, Y.; Chen, X.; Guan, N.; Wei, Y.; Huang, R. Enhanced ethanol production from sugarcane molasses by industrially engineered *Saccharomyces cerevisiae* via replacement of the PHO4 gene. *RSC Adv*, 10, 2267-2276, 2020. doi: 10.1039/c9ra08673k.
- Xia, S., Baker, G. A., Li, H., Ravula, S., Zhao, H. Aqueous ionic liquids and deep eutectic solvents for cellulosic biomass pretreatment and saccharification. *RSC Adv*. 4(21), 10586-10596, 2014. doi: 10.1039/C3RA46149A.
- Xue, T.; Chen, D.; Su, Q.; Yuan, X.; Liu, K.; Huang, L.; Fang, J.; Chen, J.; He, W.; Chen, Y. Improved ethanol tolerance and production of *Saccharomyces cerevisiae* by global transcription machinery engineering via directed evolution of the SPT8 gene. *Food Biotechnology*, 33, 155-173, 2019. doi: 10.1080/08905436.2019.1572517.
- Yokoya, F.; Oliva Neto, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, 22,12-16, 1991. doi: 10.1590/S1413-70542004000400023.
- Zakir, H.; Hasan, M.; Shahriar, S.; Ara, T.; Hossain, M. Production of biofuel from agricultural plant wastes: corn stover and sugarcane bagasse. *Chemical Engineering and Science*. 4, 5-11, 2016. doi:10.12691/ces-4-1-2.
- Zhao, X. Q.; Bai, F. W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. *Biotechnology Advances*, 27, 849-856, 2009. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.006.

Zhao, X., Li, S., Wu, R., Liu, D. Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 11, 567–590, 2017. doi: 10.1002/bbb.1768.

O atual capítulo foi redigido seguindo as normas da publicação da revista *Desenvolvimento e Meio Ambiente*.

CAPÍTULO 3: BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE NOVOS MICRO-ORGANISMOS EM CONDIÇÕES ATÍPICAS.

Bioprospecting and evaluation the biotechnological potential of new microorganisms under atypical conditions.

Resumo

O processo de produção do bioetanol brasileiro utiliza como substrato o mosto da cana-de-açúcar tendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como responsável pela conversão dos açúcares em bioetanol. A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 embora seja a espécie mais utilizada no processo fermentativo, possui vários fatores inibitórios, principalmente em condições estressantes como, altas concentrações do substrato e temperatura. Embora as leveduras comerciais apresentem uma boa eficiência fermentativa é fundamental a bioprospecção de novas cepas. Portanto, objetivou-se com esse trabalho isolar microorganismos a partir do mosto de cana-de-açúcar das usinas da Região da Grande Dourados – MS obtidos em condições atípicas (temperatura, concentração de açúcar) utilizando diferentes substratos (glicose, xilose e meio elaborado a partir do caldo de cana) e avaliar a capacidade de assimilação e fermentação dos isolados variando a temperatura e a fonte de carbono. Os microorganismos foram isolados a partir do mosto, nas temperaturas 30, 35, 40 e 45°C, utilizando as fontes de carbono glicose e xilose nas concentrações 2%, 4% e 8%. Além de propor o meio elaborado utilizando mosto e ágar (20 g L⁻¹), nas concentrações 8, 15 e 25 °Brix. Avaliou-se a capacidade de assimilação e fermentação em tubos de ensaios com tubo de Durhan invertido, nas temperaturas 30, 35, 40 e 45°C por 120 h. Foram isolados um total de 8 micro-organismos sendo, 2 isolados no meio Mosto-Ágar 8 °Brix (MSL1 e MSL2), 2 do meio YPD-20% (MSL3 e MSL4), 1 do meio YPX-2% (MSL7) e 3 do meio YPD-2% (MSL10, MSL11 e MSL13) a 30 °C. Em relação ao teste de assimilação e fermentação destaca-se os isolados MSL1 e MSL2, ambos isolados em meio mosto-ágar, únicos isolados que apresentaram características de assimilação e fermentação em todos os substratos e temperaturas. Portanto é possível concluir que a temperatura foi um fator inibitório para o isolamento dos micro-organismo. No entanto os isolados MSL1 e MSL2, obtidos em meio mosto-ágar, se destacaram nas análises de fermentação e assimilação apresentando um potencial biotecnológico, principalmente em xilose e altas temperaturas.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação, microorganismos isolados.

Abstract

Brazilian bioethanol production process uses as substrate the sugarcane must and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for the conversion of sugars into bioethanol. The yeast *S. cerevisiae* CAT-1, although it is the most used species in the fermentative process, has several inhibitory factors, especially under stressful conditions such as high concentrations of substrate and temperature. Although the commercial yeasts present a good fermentative efficiency, the bioprospecting of new strains is fundamental. Therefore, the aim of this work was to isolate microorganisms from the sugar cane must of the plants in the region of Grande Dourados - MS obtained in atypical conditions (temperature, sugar concentration) using different substrates (glucose, xylose and medium prepared from sugar cane juice) and to evaluate the assimilation and fermentation capacity of the isolates varying the temperature and the carbon source. The microorganisms were isolated from the must, at temperatures 30, 35, 40 and 45°C, using the carbon sources glucose and xylose at concentrations of 2%, 4% and 8%. Besides proposing the medium prepared using must and agar (20 g L⁻¹), in concentrations of 8, 15 and 25 °Brix. The assimilation and fermentation capacity were evaluated in test tubes with inverted Durhan tube at temperatures of 30, 35, 40, and 45°C for 120 h. A total of 8 microorganisms were isolated, 2 from the 8 °Brix Must-Agar medium (MSL1 and MSL2), 2 from YPD-20% medium (MSL3 and MSL4), 1 from YPX-2% medium (MSL7) and 3 from YPD-2% medium (MSL10, MSL11 and MSL13) at 30 °C. In relation to the assimilation and fermentation test, the isolates MSL1 and MSL2, both isolated in must-agar medium, were the only isolates that presented assimilation and fermentation characteristics in all substrates and temperatures. Therefore, it can be concluded that temperature was an inhibitory factor for the isolation of the microorganisms. However, the isolates MSL1 and MSL2, obtained in must-agar medium, stood out in the fermentation and assimilation analyses presenting a biotechnological potential, especially in xylose and high temperatures.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, isolated microorganisms.

3.1 Introdução

O processo fermentativo nas indústrias brasileiras utiliza como substrato o mosto obtido da cana-de-açúcar, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismos responsável pela conversão das moléculas de açúcares em etanol, devido ao bom rendimento fermentativo em mosto (RADECKA et al., 2015; LOPES et al., 2016).

Dentro das linhagens comerciais mais utilizadas da *S. cerevisiae*, se destaca a *S. cerevisiae* CAT-1 (ROMANI et al., 2015). No entanto, embora as leveduras comerciais apresentam um bom rendimento, quando submetidas a altas concentrações de substrato e temperaturas, pode ocorrer queda no rendimento fermentativo (MUKHERJEE et al., 2014; LOPES et al., 2016).

Como dito, a temperatura é um dos fatores inibitórios no qual reduz a eficiência fermentativa, devido à sensibilidade da *S. cerevisiae* (TANIMURA et al., 2012), principalmente em países tropicais, como o Brasil, que pode alcançar 40 a 45°C dentro das dornas de fermentações (CHAMNIPA et al., 2018).

A temperatura é um dos parâmetros importantes para uma boa eficiência fermentativa devido à sua influência na conversão dos açúcares em bioetanol. Como a fermentação alcoólica é uma reação exotérmica é fundamental que haja um controle da temperatura, entre 32 a 35 °C, nas fermentações quando utilizado *S. cerevisiae*, devido à sensibilidade em altas temperaturas (BASSO, 2008).

Outra variável é o teor de sólidos solúveis presentes no substrato (MUTTON et al., 2012), geralmente nas indústrias sucroenergéticas utiliza-se por padrão aproximadamente 18 a 22 °Brix de teor de sólidos solúveis (BREXÓ et al., 2017).

Algumas indústrias tem como prática a realização do pé-de-cuba, realizando a diluição do mosto em água na concentração aproximadamente à 4 °Brix, com o intuito de adaptar as células de leveduras ao mosto e otimizar o processo de fermentação, reduzindo assim os efeitos estresse ao substrato (COSTA et al., 2017).

Embora a *S. cerevisiae* ser a levedura mais utilizada (RADECKA et al., 2015), a mesma não apresenta capacidade de fermentar alguns açúcares, como por exemplo a xilose. Sendo este um dos maiores gargalos da utilização das leveduras comerciais podendo ser considerado como desperdício industrial, uma vez que a xilose não é fermentada (GÍRIO et al., 2010; CLAASSEN et al., 1999). A glicose e a xilose são os principais monossacarídeos presentes nos hidrolisados de lignocelulósicos, representando

cerca de 60 a 70% e 30 a 40% de sua composição dos açúcares, respectivamente (KWAK; JIN, 2017).

Com isso é imprescindível a bioprospecção de novas cepas e os estudos das mesmas, dada à grande biodiversidade nos biomas brasileiros, visando às variáveis aplicações biotecnológicas (SILVA; FONSECA, 2016; ANDRADE et al., 2017). Além disso, dada a biodiversidade mundial de microrganismos, provavelmente haja espécies desconhecidas ou poucos exploradas capazes de obter um bom rendimento de produção diferentes em condições de produção (VALINHAS et al., 2018).

Pelo contexto exposto, o presente trabalho teve como objetivo isolar microrganismos a partir do mosto de cana-de-açúcar das usinas da Região da Grande Dourados – MS, em condições de estressantes (temperatura, concentração de açúcar) com diferentes substratos (glicose, xilose e meio elaborado a partir do caldo de cana) além de avaliar a capacidade de assimilação e fermentação dos isolados em diferentes temperaturas e substratos.

3.2 Material e Métodos

Para o isolamento dos microrganismos foram utilizados os seguintes meios de cultivos: YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20% g L⁻¹ ágar) nas concentrações de 2% (20 g L⁻¹ de glicose), 5% (50 g L⁻¹ de glicose) e 20% (200 g L⁻¹ de glicose) e o meio YPX nas mesmas condições, no entanto utilizou-se xilose no lugar da glicose.

Para elaboração do meio Mosto-Ágar, primeiramente o mosto foi previamente filtrado em papel filtro qualitativo redondo (gramatura 80 g m⁻², porosidade 3 micras, espessura 0,16 mm) para retirada das impurezas, após a filtragem do mosto o pH foi ajustado para 4,5 com NaOH 1M (SOUZA, 2011). Em seguida utilizou-se um refratômetro analógico (0 a 90% °Brix) RHB0-90 para ajustar nas concentrações de 8, 15 e 25 °Brix, a diluição do mosto foi realizada em água destilada estéril até atingir a concentração de açúcar desejada. Após os ajustes do mosto foi adicionado ágar (20 g L⁻¹), todos os meios foram autoclavados 121 °C por 15 min.

Os microrganismos foram isolados a partir do mosto da cana-de-açúcar, obtido de uma usina de açúcar e álcool localizada na região de Dourados-MS. Para o isolamento foi diluído 1 mL do mosto em 9 mL de solução salina (0,85% de NaCl) estéril, e realizado diluições seriadas (10⁻⁵ e 10⁻⁶) em seguida foi transferido 0,1 mL das diluições para as

placas de Petri contendo os meios de culturas citados anteriormente e incubadas à 30, 35, 40 e 45 °C por até 5 dias.

Foi realizada análise morfológica das colônias, avaliando a coloração e textura (adaptado Martini et al., 2016), onde as mesmas foram repicadas em placas de Petri contendo os respectivos meios de crescimento a 30 °C e realizado a avaliação visual (adaptada Madigan et al., 2010).

Foi realizado a manutenção dos micro-organismos a cada 15 dias, cultivando-os em em placas de Petri e tubos de ensaios contendo o meio de cultura respectivo ao isolamento. Para os tubos de ensaios adicionou-se óleo mineral até a imersão total do meio de cultura e armazenadas a 4 °C.

Para a avaliação da capacidade assimilação e fermentação, utilizou-se as fontes de carbono, glicose, frutose, sacarose e xilose. Foi inoculado uma alçada de platina do isolado recém crescido em tubo de ensaio contendo 10 mL de YPD_{líquido} (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ de glicose) e incubado por 48 h. Em seguida retirou-se 1 mL do inóculo e foi vertido em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução basal, pH 5,4: 0,5% de (NH₄)₂SO₄, 0,1% de NaH₂PO₄, 0,05% de MgSO₄, 2% do açúcar testado (glicose, frutose, sacarose ou xilose) e incubados nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C em triplicata (CAMARGO et al., 2018), em cada tubo de ensaio foi imerso um tubo de Durham invertido e todo o material foi previamente autoclavados a 121°C por 20 min. Foi um tubo de ensaio com solução basal sem adição de substrato como controle.

As leituras foram realizadas em 24, 48, 72, 96 e 120 h, e foi considerado positivo para fermentação os tubos nos quais ocorreram formação de gás, identificado pela formação de uma bolha no interior do tubo de Durham, e positivo para assimilação a formação de biomassa sedimentada no fundo do tubo de ensaio.

3.3 Resultados e Discussão

Em relação ao isolamento dos micro-organismos, somente houve crescimento a 30 °C, comprovando que a alta temperatura é um indicativo de inibição para o crescimento dos micro-organismos. Para nomenclatura utilizou-se a sigla MSL, seguido por um caractere numérico.

A Tabela 3.1 apresenta os isolados em diferentes meios de cultura à 30°C e suas respectivas características morfológicas. Foram isoladas duas colônias do meio Mosto 8

°Brix, denominadas MSL1 e MSL2, duas colônias no meio YPD 20%, MSL3 e MSL4, uma colônia no meio YPX 2%, MSL7 e três colônias no meio YPD 2%, denominadas MSL10, MSL11 e MSL14. Vale destacar que dentre os meios utilizados para o isolamento, apenas os meios YPD 2%, YPD 20%, YPX 2% e o meio proposto Mosto-Ágar 8 °Brix apresentaram desenvolvimento dos isolados.

Tabela 3.1 – Características morfológicas dos isolados, a partir do mosto de cana-de-açúcar em diferentes meios de cultura à 30 °C.

Isolado	Meio de Cultura	Cor	Textura
MSL1	Mosto 8 °Brix	Branca	Lisa
MSL2	Mosto 8 °Brix	Branca	Lisa
MSL3	YPD 20%	Branca	Lisa
MSL4	YPD 20%	Rosa	Rugosa
MSL7	YPX 2%	Marrom	Lisa
MSL10	YPD 2%	Branca	Lisa
MSL11	YPD 2%	Rosa	Rugosa
MSL13	YPD 2%	Branca	Rugosa

Fonte: autor

Ainda em relação à Tabela 3.1, observou-se pela análise morfológica que dos 8 isolados, 4 apresentaram coloração branca, sendo eles MSL1, MSL2, MSL3 e MSL10, 3 apresentaram coloração rosa, MSL4, MSL11 e MSL13 e o isolado MSL7 apresentou coloração marrom. O isolado MSL7 que apresentou coloração marrom foi o único isolado oriundo do meio YPX 2%. Em relação à análise morfológica de textura, observou-se que os isolados MSL1, MSL2, MSL3, MSL7 e MSL10 apresentaram textura lisa e os isolados MSL4, MSL11 e MSL13 apresentaram textura rugosa.

A tabela 3.2 apresenta os dados de assimilação e fermentação dos isolados a 30, 35, 40 e 45°C utilizando glicose, frutose, sacarose e xilose como fonte de carbono.

Em relação a análise de assimilação, o isolado MSL1 apresentou formação de biomassa em 24 h para todas as temperaturas e em todos os substratos estudados. Porém a fermentação à 35, 40 e 45°C ocorreu em 72 h para todos os substratos, a fermentação a 30°C utilizando xilose ocorreu em 72 h e para os substratos glicose, frutose e sacarose em 120 h.

O isolado MSL2 à 30, 35, 40 e 45°C assimilou para todos os substratos analisados, em 24 h. Para análise de fermentação à 35, 40 e 45 °C o isolado MSL2 fermentou em 72 h em todos os substratos, no entanto à 30 °C a fermentação apenas ocorreu em 72 h em xilose, enquanto que para os demais substratos ocorreu em 120 h.

Embora os isolados MSL1 e MSL2 tenha sido isolado somente à 30°C, nota-se que ambos apresentaram capacidade fermentativa e de assimilação a 40 e 45°C. Sugere-se que o pré-inóculo realizado previamente à 30°C, pode ter sido um fator fundamental para a adaptação e o desenvolvimento das células do micro-organismo em altas temperaturas. Corroborando a importância do processo de pé-de-cuba realizado pelas indústrias sucroenergéticas no processo fermentativo.

Segundo Ferreira et al. (2011) as pesquisas voltadas para bioprospecção de leveduras fermentadores de pentoses tem se intensificado a cada ano, uma das principais técnicas utilizadas é o isolamento de microrganismos em seus habitats naturais ou de origem industrial assim como ocorreu com os isolados MSL1 e MSL2.

Estes isolados são muito utilizados em pesquisas voltados para a produção do etanol de segunda geração, uma vez que a xilose é um açúcar encontrado em grande quantidade nas hemiceluloses (RAELE et al. 2014).

Varize et al. (2018) isolaram um total de 83 leveduras de amostras de madeiras apodrecidas coletadas de uma árvore brasileira conhecida como Quaresmeira (*Tibouchina granulosa*), dos 83 isolados duas cepas apresentaram produção de etanol utilizando cultivos com xilose como fonte de carbono. Vale destacar o sucesso ao realizar o isolamento de micro-organismos fermentador de xilose, como citado somente 2 de 83 isolados apresentaram capacidade fermentativa de xilose, enquanto no atual trabalho 2 (MSL1 e MSL2) dos 8 isolados apresentaram capacidade fermentativa de xilose.

Em relação ao isolado MSL3, em glicose, frutose e sacarose a assimilação ocorreu em 24 h em todas as temperaturas analisadas, enquanto que em xilose à 30 e 35 °C a assimilação ocorreu em 72 h e a 40 e 45 °C em 24 h. A fermentação à 30 e 35 °C para os substratos glicose, frutose e sacarose ocorreu em 24 h enquanto que à 40 e 45 °C com 48 h, sugerindo assim que o aumento da temperatura foi um dos fatores importantes para a fermentação. O isolado MSL3 não apresentou capacidade fermentativa durante as 120 h para o substrato xilose em nenhuma das temperaturas analisadas.

Com o isolado MSL3 a fermentação à 30 e 35 °C, faixa de temperatura utilizada pelas indústrias sucroenergéticas, houve uma fermentação mais rápida (24h). No entanto, em algumas usinas, dependendo de sua região e da eficiência do controle da temperatura, sabe-se que as dornas de fermentação podem ultrapassar 40 °C (RIVIERA et al., 2013). Segundo os dados do isolado MSL3, o mesmo apresentou capacidade fermentativa à 40

e 45 °C, não apresentando sensibilidade à alteração da temperatura, tornando uma opção viável para estudos em fermentações acima de faixa comum de temperatura.

Ainda de acordo com a Tabela 3.2, o isolado MSL4 apresentou assimilação em 24 h em glicose, frutose e sacarose em todas as temperaturas analisadas, e em xilose à 30 e 35°C a assimilação ocorreu em 24 h, à 40 e 45 °C o isolado não apresentou capacidade de assimilação de xilose. O isolado apresentou fermentação em glicose, frutose e sacarose em 48 h à 30 e 35 °C, e com 24 h à 40 e 45 °C. Embora o isolado tenha assimilado em xilose à 30 °C e 35 °C, não houve fermentação durante às 120 h nas temperaturas avaliadas. Ressalta-se que o isolado MSL4 apresentou fermentação mais rápida nas temperaturas 40 e 45 °C.

Embora haja microrganismos termotolerantes (capazes de se adaptar em altas temperaturas e apresentar uma boa eficiência fermentativa) ainda há uma grande limitação no isolamento e utilização comercial dos mesmos (UENO et al., 2003). Segundo a literatura há linhagens na qual são descritas pela capacidade de se reproduzir e desenvolver a 52 °C e realizar fermentação até 50 °C. Estas linhagens são muito utilizadas em regiões quentes como por exemplo destilarias da Índia (BANAT et al., 1992).

Em relação ao isolado MSL7, sugere-se que há uma influência da temperatura, pois à 40 e 45 °C o isolado não assimilou nenhum dos substratos enquanto que à 30 e 35 °C apresentou assimilação de todos os substratos com 24 h. À 40 e 45 °C, não houve fermentação de nenhum substrato, enquanto que à 30 e 35 °C fermentou em 48 h em glicose, frutose e sacarose. O isolado não apresentou fermentação em xilose durante as 120 h. Embora o MSL7 também seja influenciado pela temperatura, houve inibição completa tanto de assimilação quanto fermentação em todos os substratos à 40 e 45 °C.

O isolado MSL10 apresentou uma variação maior em relação à temperatura e substratos. A assimilação em glicose, frutose, sacarose à 30 °C ocorreu em 72 h, enquanto à 35 °C foi em 96 h. A assimilação à 40 °C em glicose e sacarose ocorreu em 72 h e para frutose em 48 h, enquanto à 45°C em frutose e sacarose a assimilação ocorreu em 24 h e glicose em 72 h. O isolado não apresentou capacidade de fermentação para nenhum dos substratos utilizados nas temperaturas 30 e 35°C, para a xilose não houve assimilação e fermentação em nenhuma das temperaturas analisadas durante 120 h. Em glicose à 40 e 45 °C e frutose à 40 °C houve fermentação em 24 h e com frutose à 45°C foi em 48 h. Já com sacarose a fermentação ocorreu em 48 h à 40 e 45 °C.

O isolado MSL11 à 30 e 35 °C assimilou glicose em 48 h, frutose em 96 h e sacarose em 72 h. Nas temperaturas 40 e 45 °C o isolado somente realizou assimilação da glicose e sacarose em 72 h, não houve assimilação da xilose em nenhuma das temperaturas durante as 120 h. Em relação a fermentação, o isolado apresentou capacidade fermentativa em glicose em 24 h e sacarose em 72 h à 30 e 35°C, enquanto que à 40 e 45°C não houve fermentação em nenhum dos substratos durante as 120 h.

O isolado MSL13 à 30 e 35°C assimilou glicose e frutose em 72 h. À 40 e 45°C somente com frutose houve assimilação em 24 h, com glicose assimilou em 72 h e com sacarose em 48 h. Em relação a fermentação em glicose e frutose, o isolado apresentou capacidade fermentativa em 24 h em todas as temperaturas, quando utilizado a sacarose a fermentação ocorreu em 72 h à 30 e 35°C e em 96 h à 40 e 45°C. O isolado MSL13 não apresentou capacidade de assimilação e fermentação em xilose em nenhuma das temperaturas estudadas.

Com todo o conteúdo exposto, nota-se que a temperatura é um fator fundamental para o isolamento dos micro-organismos, comprovando a dificuldade de se obter um isolado termotolerante. Embora a temperatura tenha sido um fator de seleção para o isolamento, os micro-organismos MSL1, MSL2, MSL3, MSL4, MSL11 e MSL13 apresentaram ao menos um dos potenciais biotecnológicos (assimilação ou fermentação), em alguma das fontes de carbono utilizadas. Comprovando assim que o pré-inóculo, realizado em temperatura ideal para os isolados (30°C), foi um fator de adaptação das células, sendo fundamental para redução do estresse celular e sobrevivência dos isolados em altas temperaturas.

Como dito, vale destacar o alto potencial biotecnológico dos isolados MSL1 e MSL2, nos quais apresentaram capacidade de assimilação e fermentação para xilose em todas temperaturas. Dada a dificuldade do isolamento de micro-organismos fermentadores de xilose. Como apresentado por Varize et al. (2018), apenas 2,5% dos isolados apresentam capacidade fermentativa para xilose, sendo assim mais um ponto de grande destaque do atual trabalho, pois 2 dos 8 isolados apresentaram potencial biotecnológico para xilose, ou seja, 25% dos isolados obtidos.

Tabela 3.2 - Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas.

Isolado	T (°C)	S	Tempo (H)									
			24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
MSL1	30°	GLC	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
		FRU	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
		SAC	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
MSL1	35°	GLC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
MSL1	40°	GLC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
MSL1	45°	GLC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
MSL2	30°	GLC	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
		FRU	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
		SAC	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
MSL2	35°	GLC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

A – Assimilação; F – Fermentação; S – Substrato utilizado; (+) Capacidade para assimilação/fermentação – (-) Não apresentou capacidade de assimilação/Fermentação. **GLC** – Glicose; **FRU** – frutose; **SAC** – sacarose; **XYL** – xilose.

Tabela 3.2 – Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas (continuação).

Isolado	T (°C)	S	Tempo (H)										
			24 h			48 h		72 h		96 h		120 h	
			A	F	S	A	F	A	F	A	F	A	F
MSL2	40°	GLC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
		FRU	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
		SAC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
MSL2	45°	GLC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
		FRU	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
		SAC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
		XYL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
MSL3	30°	GLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		XYL	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	
MSL3	35°	GLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		XYL	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	
MSL3	40°	GLC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		XYL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
MSL3	45°	GLC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		XYL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

A – Assimilação; F – Fermentação; S – Substrato utilizado; (+) Capacidade para assimilação/fermentação – (-) Não apresentou capacidade de assimilação/Fermentação. **GLC** – Glicose; **FRU** – frutose; **SAC** – sacarose; **XYL** – xilose.

Tabela 3.2 – Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas (continuação).

Isolado	T (°C)	S	Tempo (H)									
			24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
MSL4	30°	GLC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
MSL4	35°	GLC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
MSL4	40°	GLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL4	45°	GLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL7	30°	GLC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
MSL7	35°	GLC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

A – Assimilação; F – Fermentação; S – Substrato utilizado; (+) Capacidade para assimilação/fermentação – (-) Não apresentou capacidade de assimilação/Fermentação. **GLC** – Glicose; **FRU** – frutose; **SAC** – sacarose; **XYL** – xilose.

Tabela 3.2 – Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas (continuação).

Isolado	T (°C)	S	Tempo (H)										
			24 h		48 h		72 h		96 h		120 h		
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	
MSL7	40°	GLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		FRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL7	45°	GLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		FRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL10	30°	GLC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
		FRU	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
		SAC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL10	35°	GLC	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
		FRU	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
		SAC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL10	40°	GLC	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL10	45°	GLC	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A – Assimilação; F – Fermentação; S – Substrato utilizado; (+) Capacidade para assimilação/fermentação – (-) Não apresentou capacidade de assimilação/Fermentação. **GLC** – Glicose; **FRU** – frutose; **SAC** – sacarose; **XYL** – xilose.

Tabela 3.2 – Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas (continuação).

Isolado	T (°C)	S	Tempo (H)									
			24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
MSL11	30°	GLC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
		SAC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL11	35°	GLC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
		SAC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL11	40°	GLC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
		FRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SAC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL11	45°	GLC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
		FRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SAC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL13	30°	GLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL13	35°	GLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A – Assimilação; F – Fermentação; S – Substrato utilizado; (+) Capacidade para assimilação/fermentação – (-) Não apresentou capacidade de assimilação/Fermentação. **GLC** – Glicose; **FRU** – frutose; **SAC** – sacarose; **XYL** – xilose.

Tabela 3.2 – Capacidade de assimilação (A) e fermentação (F) dos isolados em diferentes temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante 120 horas (continuação).

Isolado	T (°C)	S	Tempo (H)									
			24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
MSL13	40°	GLC	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSL13	45°	GLC	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		SAC	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
		XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A – Assimilação; F – Fermentação; S – Substrato utilizado; (+) Capacidade para assimilação/fermentação – (-) Não apresentou capacidade de assimilação/Fermentação. **GLC** – Glicose; **FRU** – frutose; **SAC** – sacarose; **XYL** – xilose.

3.4 Considerações Finais

De todas as temperaturas propostas para isolamento somente houve crescimento de micro-organismos à 30 °C. Foram isolados um total de 8 microrganismos sendo 2 isolados no meio Mosto-Ágar 8 °Brix (MSL1 e MSL2), 2 do meio YPD-20% (MSL3 e MSL4), 1 do meio YPX-2% (MSL7) e 3 do meio YPD-2% (MSL10, MSL11 e MSL13). Dos 8 isolados os isolados MSL1 e MSL2 isolados a partir do Mosto-Ágar foram os únicos isolados que apresentaram assimilação e fermentação em todos os substratos e embora tenha sido isolado à 30 °C, os micro-organismos apresentaram capacidade de assimilação e fermentação em altas temperaturas e em xilose, apresentando um potencial biotecnológico.

3.5 Referências

ANDRADE, R. P., MELO, C. N., GENISHEVA, Z., SCHWAN, R. F., DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, 91, 72–79, 2017.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Isolation of thermotolerant fermentative yeasts capable of growth at 52°C and ethanol production at 45°C & 50°C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 259-263, 1992.

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, p. 1155–1163, 2008.

BREXÓ, R, P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 73, p. 423 – 434, 2017.

CAMARGO, J. Z.; NASCIMENTO, V. M.; STEFANELLO, I.; SILVA, C. A. de A.; GONÇALVES, F. A.; PERDOMO, I. C.; VILELA, D. M.; SIMIONATTO, S.; PEREIRA, R. M.; PAZ, M. F. da; LEITE, R. S. R.; GELINSKI, J. M. L. N.; FONSECA, G. G. Biochemical evaluation, molecular characterization and identification of novel yeast strains isolated from Brazilian savannah fruits, chicken litter and a sugar and alcohol mil with biotechnological potential for biofuel and food industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 390-399, 2018.

CHAMNIPA, N.; THANONKEO, S. KLANRIT, P.; THANONKEO, P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. **Biotechnology and Industrial Microbiology**, v. 49, p. 378-391, 2018.

CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; LOPEZ-CONTRERAS, A. M.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A.

Utilization of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, v.52, p.741-755, 1999.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – **Cana-de-açúcar – Quarto levantamento ABRIL 2020.** ISSN 2318-7921 Acomp. safra bras. cana, v. 6 - Safra 2019/20, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-58 abril de 2020.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – **Cana-de-açúcar – Terceiro levantamento dezembro 2019.** ISSN 2318-7921 Acomp. safra bras. cana, v. 6 - Safra 2019/20, n. 3 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-58, dezembro de 2019.

COSTA, M. A. de 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. 65, p. 1-1, 2017.

FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipites* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast.**, v. 7, p. 547-554, 2011.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology.**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; MARINI, M. M.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 103, p. 2438–2447, 2007.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; SINGH, A.; ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews.**, v. 15, p.4950–4962, 2011.

KWAK, S.; JIN, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microbial Cell Factories.**, v. 16, p. 1-15, 2017.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; NETO, H. B. A.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between Science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.**, Editora: Artmed S.A. 12ª Edição. São Paulo. 2010.

MARTINI, C.; TAUKE-TORNISIELO 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 fermentation pentoses in synthetic and bagasse

hydrolysate media. **World Journal Microbiology Biotechnology.**, v. 32, n. 80, p. 1 – 9. 2016.

MUKHERJEE, V.; STEENSELS, J.; LIEVENSILS, B.; VOORDE, I.V.; VERPLAETSE, A.; AERTS, G.; WILLEMS, K.A.; THEVELEIN, J.M.; VERSTREPEN, K.J.; RUYTERS, S. Phenotypic evaluation of natural and industrial *Saccharomyces* yeasts for different traits desirable in industrial bioethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, v. 98, p. 9483–9498, 2014.

MUTTON, M.J.R.; MISSIMA, J.O.D.; SILVANO, N.; SANTO, R.F.P.; COSTA, G.H.G. Qualidade tecnológica do melão de cana-de-açúcar bisada. **Ciência & Tecnologia.**, v.4, 2012.

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.

RADECKA, D.; MUKHERJEE, V.; MATEO, R.Q.; STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. v. 15, n. 6, p. 1 – 13, **FEMS Yeast Research.**, 2015.

RAELE, R. et al. Scenarios for the second-generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting & Social Change.**, v. 87, p. 205-223, 2014.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola.**, v. 56, p. 255-263, 1999.

RIVERA, E. C.; YAMAKAWA, C. K.; GARCIA, M. H.; GERALDO, C.; ROSSELL, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMIA, A. procedure for estimation of fermentation kinetic parameters in fed-batch bioethanol production process with cell recycle, **Chemical Engineering Transactions.**, v. 32, p. 1369-1374, 2013.

ROMANI, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology.**, v 179, p. 150–158, 2015.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno. **Proceedings.** St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, C. A. A.; FONSECA, G. G. Brazilian savannah fruits: Characteristics, properties, and potential applications. **Food Science. Biotechnology.**, v. 25, p. 1225-1232, 2016.

SILVA, C. A. de A.; OKA, M. L.; FONSECA, G. G. Physiology of yeast strains isolated from Brazilian biomes in a minimal medium using fructose as the sole carbon source reveals potential biotechnological applications. **3 Biotech.**, v. 9, n. 191, p. 1-10, 2019.

SILVA, R. O.; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity.**, v. 2, p. 22–27, 2011.

SOUZA, J. L. U. de; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **Cadernos de pós-graduação da fazu.**, v. 2, p. 1 – 8, 2011.

TANIMURA, A.; NAKAMURA, T.; WATANABE, I.; OGAWA, J.; SHIMA, J. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. **Springer Plus.**, v. 1, n. 27, p. 1-7, 2012.

UENO, R.; HAMADA-SATO, N.; URANO, N. Fermentation of molasses by several yeasts from hot spring drain and phylogeny of the unique isolate producing ethanol at 55°C. **Journal of the Tokyo University of Fisheries.**, v.90, p. 23-30, 2003.

VALINHAS, R. V.; PANTOJA, L. A.; MAIA, A. C. F.; MIGUEL, M. G. C. P.; VANZELA, NA. P. F. C.; NELSON, D. L.; SANTOS, A. S. Xylose fermentation to ethanol by new *Galactomyces geotrichum* and *Candida akabanensis* strains. **PeerJ.**, v. 6, p. 1-16, 2018.

VARIZE, C.; CADETE, R. M.; LOPES, L. D.; CHRISTOFOLETI-FURLAN, R. M.; LACHANCE, MARC-ANDRÉ; ROSA, C. A.; BASSO, L. C. *Spathaspora piracicabensis* f. a., sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.**, v. 111, p. 525-531, 2018.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration an alcoholic fermentation. **Yeast.**, v. 8, p. 501–517, 1992.

CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE DOIS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS, UTILIZANDO MOSTO E HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Resumo

Devido a mudança da situação energética no mundo, o reaproveitamento de resíduos industriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, para produção do etanol 2G tem ganhado um grande destaque. Porém o maior gargalo para a produção do etanol 2G são os micro-organismos utilizados, devido à dificuldade de fermentar xilose, uma das alternativas é a bioprospecção de novos micro-organismos. O presente trabalho visou realizar a identificação de dois micro-organismos isolados (Capítulo 3), estudar o comportamento cinético dos isolados e da *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e avaliar o potencial biotecnológico dos micro-organismos em mosto e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Para a identificação dos micro-organismos foi realizada a extração do DNA e ambos foram identificados através do método de PCR. Para os estudos cinéticos utilizou-se os substratos glicose, frutose, sacarose e xilose como fonte de carbono única nas temperaturas de 30 e 40 °C. Para avaliação biotecnológica dos isolados utilizou-se o mosto 18 °Brix, pH 5,7, em 6 ciclos fermentativos (9h), com tratamento celular (pH 2,0) com adição de 5% de etanol e o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar 7 °Brix, pH 6,5, 160 rpm, a 30 °C nos tempos de 12, 24, 36, 48 e 60h. As fermentações foram conduzidas em shaker a 160 rpm, 30 °C. Para as análises foram realizadas análises microbiológicas (contagem UFC/mL) e físico-química (pH, ART residual e etanol). Segundo a identificação o isolado MSL1 apresentou 100% de similaridade com a levedura *Meyerozyma guilliermondii*, enquanto a MSL2 foi possível a identificação somente a nível de grupo, apresentando similaridade com a bactéria *Bacillus*. Na avaliação cinética os isolados apresentaram capacidade de aproveitamento de todos os substratos utilizados a 30 e 40 °C. Destaca-se as cinéticas utilizando xilose, uma vez que a MSL1 apresentou valor de μ_{\max} 0,18 h⁻¹ (30 e 40 °C) e a MSL2 obteve valor de μ_{\max} 0,19 h⁻¹ e 0,21 h⁻¹, em 30 e 40 °C respectivamente. Nos ensaios fermentativos em mosto a *S. cerevisiae* CAT-1 e a *M. guilliermondii* MSL1 apresentaram um crescimento celular enquanto nos ensaios com hidrolisado a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou uma queda no crescimento celular. Em ambos substratos as leveduras apresentaram consumo do açúcar e produção de etanol, sendo de 12,4% v/v da *S. cerevisiae* CAT-1 e 7,4% v/v da *M. guilliermondii* MSL1 no em mosto. No hidrolisado a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou uma produção de 6,9% v/v em 36h de fermentação enquanto a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou 5,5% v/v em 60h de fermentação.

Palavras Chave: Fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, *Meyerozymas guilliermondii*.

Abstract

Due to the changing energy situation in the world, the reuse of industrial waste, such as sugarcane bagasse, for the production of 2G ethanol has gained great prominence. However, the biggest bottleneck for the production of 2G ethanol are the microorganisms used, due to the difficulty of fermenting xylose, one of the alternatives is the bioprospecting of new microorganisms. The present work aimed to perform the identification of two microorganism isolates (Chapter 3), to study the kinetic behavior of

the isolates and of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, and to evaluate the biotechnological potential of the microorganisms in sugarcane bagasse must and hydrolysate. For the identification of the microorganisms the DNA was extracted and both were identified by the PCR method. For the kinetic studies, the substrates glucose, fructose, sucrose and xylose were used as single carbon source at temperatures of 30 and 40 °C. For biotechnological evaluation of the isolates, we used the must 18 °Brix, pH 5.7, in 6 fermentation cycles (9h), with cell treatment (pH 2.0) with addition of 5% ethanol and the sugarcane bagasse hydrolyzate 7 °Brix, pH 6.5, 160 rpm, 30 °C in times of 12, 24, 36, 48 and 60h. The fermentations were conducted in shaker at 160 rpm, 30 °C. For the analyses, microbiological (CFU/mL count) and physical-chemical (pH, residual ART and ethanol) analyses were performed. According to the identification the isolate MSL1 presented 100% of similarity with the yeast *Meyerozyma guilliermondii*, while MSL2 was possible the identification only at group level, presenting similarity with *Bacillus sp.* In the kinetic evaluation, the isolates showed ability to use all the substrates used at 30 and 40 °C. The kinetics using xylose stand out, since *M. guilliermondii* MSL1 presented a μ_{max} value of 0.18 h⁻¹ (30 and 40 °C) and *Bacillus sp* MSL2 obtained a μ_{max} value of 0.19 h⁻¹ and 0.21 h⁻¹, at 30 and 40 °C, respectively. In the fermentative trials using wort the *S. cerevisiae* CAT-1 and *M. guilliermondii* MSL1 showed a cell growth while in the trials with hydrolysate the *S. cerevisiae* CAT-1 showed a decrease in cell growth. In both substrates the yeasts showed sugar consumption and ethanol production of 12.4% v/v for *S. cerevisiae* CAT-1 and 7.4% v/v for the *M. guilliermondii* MSL1 in the wort substrate. In the hydrolysate the *M. guilliermondii* MSL1 showed a production of 6.9% v/v in 36h of fermentation while the *S. cerevisiae* CAT-1 showed 5.5% v/v in 60h of fermentation.

Keywords: Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Meyerozymas guilliermondii*.

4.1 Introdução

Dada a mudança na situação energética do mundo, intensificou-se a necessidade de um biocombustível oriundo de uma fonte ecologicamente correta (Vohra *et al.* 2014), assim o bioetanol se tornou uma das alternativas mais promissoras, devido às diversas fontes de matérias-primas nas quais podem ser utilizadas para produção bem como a disponibilidade (Zabed *et al.* 2017).

No Brasil utiliza-se a cana-de-açúcar como principal matéria-prima para o processo de fermentação, a conversão das moléculas de açúcares em bioetanol se dá pela ação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao bom rendimento fermentativo do mosto (Radecka *et al.* 2015; Lopes *et al.* 2016). No entanto, com o aumento da demanda por produtos sucroenergéticos (bioetanol, açúcar e bioenergia), houve uma crescente oportunidade e possibilidade para desenvolver novas pesquisas e matérias-primas para produção do bioetanol (Martins *et al.* 2019).

Como por exemplo, o reaproveitamento do próprio bagaço da cana-de-açúcar, que antes era considerado um “problema” para indústria, hoje representa uma matéria-prima de elevado valor agregado para a produção do etanol de segunda geração (2G), no qual tem ganhado destaque e aceitação no mercado mundial nos últimos anos (Kuila *et al.* 2016; Branco *et al.* 2019).

O bagaço apresenta diversas possibilidades para o reaproveitamento, sendo um dos principais resíduos reutilizados. Além da obtenção de produtos químicos como, ácidos orgânicos (Schmidt *et al.* 2017; Oonkhanond *et al.* 2017) e dióis (Song *et al.* 2012), são utilizadas como biomassas à base de lignina (Bertolo *et al.* 2019). As biomassas lignocelulósicas, tem como principais componentes a glicose, xilose e lignina, nas quais são convertidas em etanol 2G (Chacón *et al.* 2021).

As biomassas são descritas como compostos de multicamadas formadas por três polímeros principais: celulose, hemicelulose e lignina (Padilha *et al.* 2020). A celulose é um polissacarídeo linear formado por unidades de glicose unidas por ligações β -1.4 (Mood *et al.* 2013).

Já a hemicelulose é um polissacarídeo amorfo de estrutura ramificada, formadas por pentoses (xilose, arabinose e ramnose) e hexoses (glicose, galactose e manose) podendo variar de acordo com a sua origem (Brandt *et al.* 2013). E a lignina é um polímero aromático no qual atua como uma espécie de cola, dando rigidez e proteção aos polissacarídeos contra ataques enzimáticos (Moura *et al.* 2010; Schutyser *et al.* 2018).

Uma das maiores vantagens do bioetanol de segunda geração (2G) são as diversas possibilidades de matérias-primas (Padilha *et al.*, 2020) e a alta disponibilidade, por exemplo, resíduo de bananeira (Ingale *et al.* 2014; Jahid *et al.* 2018; Khaliq *et al.* 2020), palha de cevada (Lara-Serrano *et al.* 2018), palha de milho (Zakir *et al.* 2016; Dhiman *et al.* 2017), palhiço de cana-de-açúcar (Moutta *et al.* 2013).

Em contrapartida, a maior dificuldade para a produção do etanol 2G é a seleção do micro-organismo utilizado na fermentação. A tomada de decisão irá depender das características do processo, levando em consideração não apenas rendimento fermentativo, mas também características que permitem a sobrevivência das cepas em condições de estresse (Lopes *et al.* 2016; Hans *et al.* 2019; Ceccato-Antonini e Covre 2020).

Além da sua capacidade de adaptabilidade aos fatores inibitórios, como temperatura, pH, Brix, subprodutos, contaminação por leveduras selvagens ou bactérias

e pela capacidade fermentativa de diversos substratos (Hans *et al.* 2019). Embora a *S. cerevisiae* seja a levedura comercial mais utilizadas na produção do bioetanol de primeira geração (1G), as mesmas por características, não se aplicam para produção do bioetanol 2G, devido sua incapacidade fermentativa em xilose, principal açúcar encontrado na biomassa lignocelulósica.

Uma das alternativas encontrada é a utilização de leveduras geneticamente modificados (Lugani *et al.*, 2020; Ceccato-Antonini e Covre, 2020), entretando a preocupação ao se utilizar os organismos geneticamente modificados (OGMs) está em relação ao chamado princípio da prudência.

O princípio da prudência foi proposto na Conferência do Rio 92, estabelecido através do Protocolo de Cartagena, sendo uma referência internacional, visando a proteção da diversidade biológica e da saúde humana, diante a utilização dos micro-organismos gerados através da aplicação da tecnologia do DNA recombinante, ou aqueles nos quais não possam ser identificados (Ribeiro e Marin, 2000; Prudente, 2004; Valois, 2016). Além de estabelecer e garantir normas-padrão de biossegurança, como por exemplo, a garantia dos OGMs se materem seguro durante todo o processo industrial (Ribeiro e Marin, 2000), se tornando um dos principais gargalos para a fermentação.

Com isso uma das alternativas mais ideais é a bioprospecção de novos micro-organismos com capacidade fermentativa para xilose. Atualmente há muitos micro-organismos, como bactérias e leveduras, classificados e estudadas com a capacidade do aproveitamento da xilose para a produção do etanol na fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar (Farias e Filho 2021; Antunes *et al.* 2021).

Através do conteúdo exposto o presente trabalho visa realizar a identificação molecular e a caracterização cinética de dois isolados obtidos em processos bioprospectivos, em meio mineral. E aplicabilidade bioetanológica em fermentações utilizando mosto de cana-de-açúcar e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram a *S. cerevisiae* CAT-1 e os isolados MSL1 e MSL2, os micro-organismos foram selecionados baseado em análises de capacidade de assimilação e de fermentação, pois apresentarem capacidade de assimilação e

fermentação em diversos substratos (glicose, frutose, sacarose e xilose) nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C.

4.2.2 Identificação molecular dos isolados

Os isolados MSL1 e MSL2 foram selecionados para a identificação molecular, os micro-organismos foram repicados em meio PDA (infusão de amido de batata 4g/L, dextrose 20g/L, ágar 15 g/L) e incubado a 28 °C até o desenvolvimento das colônias. Foi realizado a análise de viabilidade e pureza das colônias através da coloração de gram e análise microscópica.

Para a identificação do isolado MSL1, foi realizado a extração do DNA através da aplicação de fenol (Aamir *et al.* 2015), em seguida foi realizado à amplificação da região D1/D2 (DNAr 26S) através do método de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram NL-1m e NL-4m, complementares às extremidades da região D1/D2.

Em seguida foi realizado o sequenciamento do DNA onde os fragmentos amplificados foram purificados em coluna (GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciado automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem), os primers utilizados foram o NL-1 e NL-4.

As amostras foram submetidas a análise de distância genética, onde as sequências parciais do gene RNAr 26S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *consensus* (sequência consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao isolado para a construção do dendograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997) dentro do BioEdit 7.2.6 (Hall, 1999) e as análises de distancias genéticas foram conduzidas o programa MEGA versão 6.0 (Tamura *et al.* 2013). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendograma a partir das distâncias genéticas foi realizada pelo método de *Nighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído

no programa MEGA 6.0. A identificação do isolado MSL2 foi semelhante ao do isolado MSL1, porém utilizou-se os *primers* 10 f e 1100r complementares ao trecho do gene 16S, para o PCR.

4.2.3 Estudos cinéticos

Para a realização dos estudos cinéticos utilizou-se o meio mineral, contendo por litro de água destilada: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0 g; KH_2PO_4 , 3,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; 1 mL de elementos-traço (preparada em água desmineralizada, contendo por litro: EDTA, 15 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g; H_3BO_3 , 1,0 g; KI, 0,1 g, com pH final de 6,0. O meio foi autoclavado (121 °C, 15 min), posteriormente adicionou-se ao meio 1 mL L⁻¹ de solução filtro-esterilizada de vitaminas (preparada em água desmineralizada, contendo por litro: D-biotina, 0,05 g; pantotenato de cálcio, 1,0 g; ácido nicotínico, 1,0 g; mio-inositol, 25 g; cloreto de tiamina, 1,0 g; piridoxina, 1,0 g; e ácido para-aminobenzóico, 0,20 g) (Verduyn *et al.* 1992). Os diferentes substratos (glicose, frutose, sacaro e xilose) foram preparadas separadamente na concentração 10 g L⁻¹ e autoclavados a 121°C por 15 min.

Para os pré-cultivos foram transferidas duas alçadas de células da placa de Petri recém crescida, para um frasco tipo Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio mineral estéril e 50 mL da fonte de carbono (10 g L⁻¹) (Verduyn *et al.* 1992) e ajustado o pH para 6,0, em seguida os pré-cultivos foram incubados a 30°C em agitador orbital (Marconi, Brasil) a 200 rpm até atingir a densidade óptica (DO) ($\lambda = 600\text{nm}$) de 5 ± 1 , medidas em espectrofotômetro (Bioespectro, Brasil), em condições de aerobiose. A partir de uma alíquota de quantidade determinada do pré-cultivo para DO inicial ($\lambda = 600\text{nm}$) de 0,1, os cultivos foram realizados em duplicata, em meios e frascos idênticos ao do pré-cultivo à 30° e 40°C.

A fase exponencial de crescimento foi identificada como a região linear da plotagem do ln (DO) pelo tempo para os dados do cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi determinada como a inclinação desta reta, e o tempo de duplicação (TD) pelo quociente do ln (2) pelo μ_{max} . Avaliou-se a formação máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$) obtida por curva de calibração, e a produtividades de biomassa (P_X) foram calculadas de acordo com a Equação 4.1 (Nascimento e Fonseca 2019).

$$P_X = \frac{(X_{max} - X_i)}{t}$$

Equação 4. 1

Onde: X_{max} = concentração celular máxima; X_i = concentração celular inicial. t = tempo final de concentração máxima. Os resultados dos parâmetros do estudo da cinética foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando a versão do software SISVAR (Silva e Azevedo 2009).

4.2.4 Ensaios fermentativos

Para os ensaios fermentativos foram utilizados dois substratos, mosto de cana-de-açúcar e o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar. Os micro-organismos foram a *S. cerevisiae* CAT-1 e o isolado MSL1. O mosto utilizado para o experimento foi obtido em uma usina localizada no estado do Mato Grosso do Sul da safra 2020/2021, e o bagaço utilizado para hidrólise foram cedidos pela usina São Fernando safra 2020/2021 localizada na região de Dourados-MS.

O mosto fermentativo foi utilizado nas características padrões obtidos na indústria, 18 °Brix, pH 5,7, não houve alteração nas características do mosto nem adição de outra solução, pois objetivou-se submeter os micro-organismos ao processo mais próximo da realidade da indústria. Assim como foi empregado a prática do reciclo celular e o tratamento celular com adição de 5% de etanol visando diminuir a contaminação bacteriana.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de mosto fermentativo por 6 ciclos fermentativos, sendo de 9 horas cada ciclo e com reciclo celular, os ensaios foram conduzidos em shakers a 160 rpm a 30 °C em triplicata.

O pré-inóculo, foi transferido duas alçadas de leveduras recém-crescida em placas de Petri contendo YEPD_{sólido} para dois frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de YEPD_{líquido}. Os frascos foram incubados por 24 horas a 30 °C a 160 rpm, em seguida o meio foi centrifugado a 3400 rpm por 6 min, o sobrenadante descartado e a massa celular obtida foi ressuspensa em 50 mL de água destilada estéril para lavagem e novamente centrifugada. Em seguida a massa celular obtida foi inoculada em dois Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de mosto de cana-de-açúcar a 4 °Brix, pH 5,5 por um período de 12 horas a 30 °C, a 160 rpm, até a obtenção de aproximadamente de 2

x 10⁹ células/mL, as contagens das células foram realizadas em câmara de Neubauer com a solução do corante azul de metileno-citrato de sódio (Lee *et al.* 1981).

Após a obtenção da massa celular desejada o meio foi centrifugado a 3400 rpm por 6 minutos o sobrenadante foi descartado e a massa foi novamente lavada em água destilada estéril e centrifugada. As células foram ressuspendida em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de mosto de cana-de-açúcar 5,7 °Brix, pH 5,5. Foi retirado 5 mL da amostra contendo o pré-inóculo e vertido em Erlenmeyer de 125 mL contendo 45 mL do mosto fermentativo 5,7 °Brix, pH 5,5 dando início ao primeiro ciclo fermentativo.

Após as 9 horas o mosto fermentado foi centrifugado o sobrenadante armazenado em ultrafreezer (-80 °C). A massa centrifugada foi submetida ao tratamento celular com adição de 5% de etanol (Costa *et al.* 2017), ressuspendida em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de solução ácida (pH 2,5 + 5% de etanol) a 30 °C, 160 rpm por 2 horas. Após o período de tratamento a solução foi centrifugada, a massa lavada duas vezes em água destilada e ressuspendida em novo meio fermentativo para início do próximo ciclo fermentativo.

Para o preparo do hidrolisado, o bagaço foi previamente lavado com água destilada de 4 a 5 vezes para retirada de possíveis resíduos do mosto, em seguida foram colocados em estufa a 60 °C por 48 h. Em seguida o material foi submetido a trituração utilizando moinho de facas no tamanho de 3mm e submetidos ao tratamento ácido utilizando o solvente Organosolov, sendo água, acetona e etanol na proporção 2:1:1 (Kiipper 2009).

Para o preparo do hidrolisado adicionou-se na ordem 123,75 mL de acetona (95%), 123,75 mL de etanol (96%), 247,5 mL de água destilada, 18,75g do bagaço e por ultimo 1% de ácido sulfúrico (H₂SO₄), foi utilizado frascos de vidros com tampa resistente a temperatura e pressão (Boeco) de 1 litro, os frascos foram mantidos a autoclave por 60 minutos a 120 °C e 1 atm. Em seguida os fracos foram resfriados temperatura ambiente, o hidrolisado foi filtrado em papel filtro de 210 mm 80g e o bagaço hidrolisado foi secado em estufa a 60 °C por 48 horas para avaliação do peso seco. Foi feita a correção do pH do hidrolisado para 6,5 utilizando NaOH 6M e centrifugado novamente a 8000 rpm por 10 minutos, para remoção dos precipitados formado durante o ajuste (adaptado Codato 2013).

Os ensaios fermentativos do hidrolisado foram conduzidos a em agitador orbital a 160 rpm a 30 °C, o meio fermentativo utilizado foi padronizado com pH 6,5 e 7 °Brix.

Para o pré-inóculo foram transferidas duas alçadas de micro-organismos recém crescido para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de YEPD_{líquido} e incubados a 30 °C a 160 rpm por 24 h, até a obtenção de aproximadamente de 2×10^9 células/mL, as contagens das células foram realizadas em câmara de Neubauer com a solução do corante azul de metileno-citrato de sódio (Lee *et al.* 1981).

Em seguida o meio foi centrifugado a 3400 rpm por 6 minutos, o sobrenadante descartado, a massa celular obtida foi ressuspensa em 50 mL de água destilada estéril para lavagem e novamente centrifugada. A massa celular obtida foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL o hidrolisado fermentativo pH 6,5, 7 °Brix. Foi retirado 5 mL da amostra contendo o pré-inóculo e vertido em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 45 mL do hidrolisado fermentativo, os ensaios fermentativos foram conduzidos individualmente em diferentes tempos fermentativo sendo de 12, 24, 36, 48 e 60 horas em cada tempo realizado em triplicata a 30 °C, 160 rpm.

4.2.5 Análises

Foram realizadas análises microbiológicas através do método de plaqueamento, onde-se retirou 1 mL de amostra do meio fermentativo no tempo inicial e ao final de cada tempo fermentativo. Para contagem das células de leveduras, realizou-se uma diluição seriada (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) e em seguida foi feito o plaqueamento em placas de Petri contendo meio YEPD_{sólido}, as placas foram incubadas a 30 °C por até o crescimento das colônias de leveduras, o plaqueamento foi feito em duplicata para cada uma das repetições. Após os seis ciclos fermentativos foi analisado a variação logarítmica do crescimento dos micro-organismos, considerando-se os valores de UFC/mL inicial e do final sexto ciclo fermentativo, aplicando a seguinte equação:

$$\text{Variação logarítmica do crescimento} = \log (\text{UFC/mL}) \text{ final} - \log (\text{UFC/mL}) \text{ inicial} \quad \text{Equação 4.2}$$

Após a centrifugação do meio fermentado, foi realizado as análises de pH, ART, etanol do sobrenadante. Para as análises de pH foi utilizado pH-metro digital (TECNOPON).

Para análise de açúcar redutor total (ART), foi realizado pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) segundo Miller (1959), a concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação da curva de calibração ($R^2 = 0,9952$):

$$ART = \left(\frac{\text{absorbância da amostra} + 0,0657}{0,7878} \right) \times \text{diluição} \quad \text{Equação 4.3}$$

O etanol (% v/v), foi realizado através da destilação de 5 mL das amostras em um balão de 50 mL no microdestilador Marconi, a determinação da concentração de etanol foi realizada pelo método de titulação de tiosulfato de sódio (adaptado Caldas 2011; Brasil *et al.* 2020).

Em um Erlenmeyer de 125 mL adicionou 10 mL da solução de dicromato de potássio 0,5% (5 g/L de $K_2Cr_2O_7$) e 10 mL de ácido sulfúrico a solução foi resfriada em temperatura ambiente e adicionado 20 mL da solução hidroalcoólica. Adicionou-se 5 mL da solução de iodeto de potássio 5% (50 g/L de KI) homogeneizado e em seguida realizou-se a titulação com a solução de tiosulfato de sódio 0,1N (24,8 g/L de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) até a coloração amarelo claro e adicionado 1 mL da solução indicadora de amido (5 g/L de amido) dando a continuidade com a titulação vagarosamente até a viragem para coloração azul claro transparente e foi anotado o volume gasto da solução tiosulfato de sódio 0,1N, foi realizado uma prova em branco no qual foi substituído 20 mL de amostra por água destilada, e aplicado a seguinte equação (Caldas 2011):

$$\text{Titulação (Etanol \%v/v)} = (0,01456 \times (V1 - V2)) \times \text{Diluição} \quad \text{Equação 4.4}$$

V1 = Volume gasto da solução de tiosulfato de sódio (mL) da prova em branco.

V2 = Volume gasto da solução de tiosulfato de sódio (mL) da amostra.

Para o cálculo do etanol realizou-se uma curva de calibração nas concentrações 0,1% até 2,5% de etanol ($R^2 = 0,9949$).

$$\text{Etanol \% (v/v)} = \frac{(\text{Titulação} - 0,039)}{0,104} \quad \text{Equação 4.5}$$

4.2.6 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros do estudo da cinética foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando a versão do software SISVAR (Silva e Azevedo 2009).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Identificação molecular

A região sequenciada do isolado MSL1 apresentou 100% de similaridade com sequência da mesma região do operon ribossomal da espécie *Meyerozyma guilliermondii* CBS2030^T, encontradas no banco de dados do CBS-Knaw, atual Westerdijk Institute. Portanto segundo as análises realizadas sugerem que o isolado MSL1 é uma levedura *M. guilliermondii* CBS 2030 (Kurtzman e M. Suzuki 2010), devido sua distância filogenética conforme apresentado na Figura 4.1.

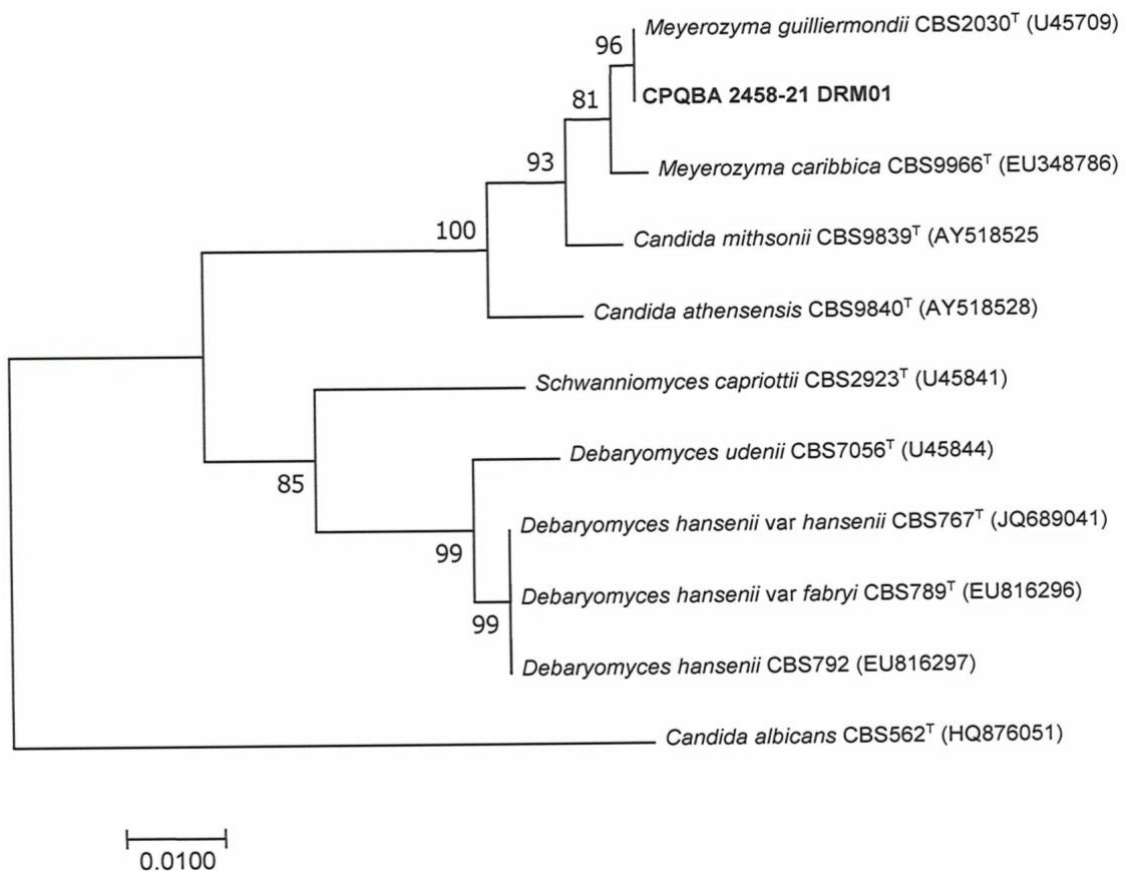


Figura 4.1 - Dendrograma utilizando o método *Neighbor-joining*, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do gene ribossomal 26S da amostra do MSL1 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw. Fonte: do autor.

Por volta dos anos de 1980 a levedura, *M. guilliermondii* era classificada como *Endomyces guilliermondii* (Castellani, 1992), anos depois foi reclassificada para *Candida guilliermondii*, que por muito tempo, e seu teleomorfo de *P. guilliermondii* foi considerado um heterocomplexo genético, composto por vários grupos fenotípicos

indistinguíveis (Yan *et al.* 2021), somente anos depois passou a ser nomeada como *M. guilliermondii* (Kurtzman e Suzuki, 2010).

A levedura *M. guilliermondii* possui várias aplicabilidades desde de produções industriais, do básico até pesquisas científicas, sendo considerável relativamente uma espécie relativamente rara no qual tem a capacidade de assimilar n-alcenos (compostos formados apenas por átomos de carbono e hidrogênio, de cadeia aberta e com ligações simples) como única fonte de carbono (Shchelokova *et al.* 1974; Yan *et al.* 2021).

Além disso a *M. guilliermondii* é considerada uma das leveduras mais adequadas para a produção de xilitol (Canettieri *et al.* 2001; Carvalho *et al.* 2002; Atzmüller *et al.* 2020; Yan *et al.* 2021), além de apresentar um grande potencial para enzimas industriais, como por exemplo, inulinase e lipase (Gong *et al.* 2007; Wah *et al.* 2013; Cai *et al.* 2018).

Quando comparada a outras leveduras conhecidas como *Pichia pastoris* e a *Saccharomyces cerevisiae*, a *M. guilliermondii* também apresenta muitas vantagens para os processos biotecnológicas, como alta capacidade de produção de proteínas com baixa modificação de glicosilação, e habilidade de ser cultivada do modo de fermentação de alta densidade celular a partir de vários substratos. Além de ser considerada um excelente hospedeiro para a produção de metabólitos por meio da modificação genética (Kunze *et al.* 1985; Boretsky *et al.* 1999; Foureau *et al.* 2013; Yan *et al.* 2021).

Vale destacar que a levedura *M. guilliermondii* foi isolada em substratos distintos, como por exemplo inseto Passalidae (*Bess beetles*) (Silveira *et al.* 2019), videira (*Vitis vinifera cv. L.*) (Cordero-Bueso *et al.* 2013), cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata*) (Silva *et al.* 2019) e no mosto de cana-de-açúcar (Martini *et al.* 2016) assim como encontrado no atual trabalho.

Em relação a identificação do isolado MSL2 na Figura 4.2, apresenta as espécies mais próximas de sua identificação, entre elas estão as espécies *B. pacificus*, *B. thuringiensis*, *B. mobilis* e *B. toyonensis*. Cabe salientar que devido a complexidade do grupo *Bacillus*, não foi possível a identificação em nível de espécie do isolado MSL2.

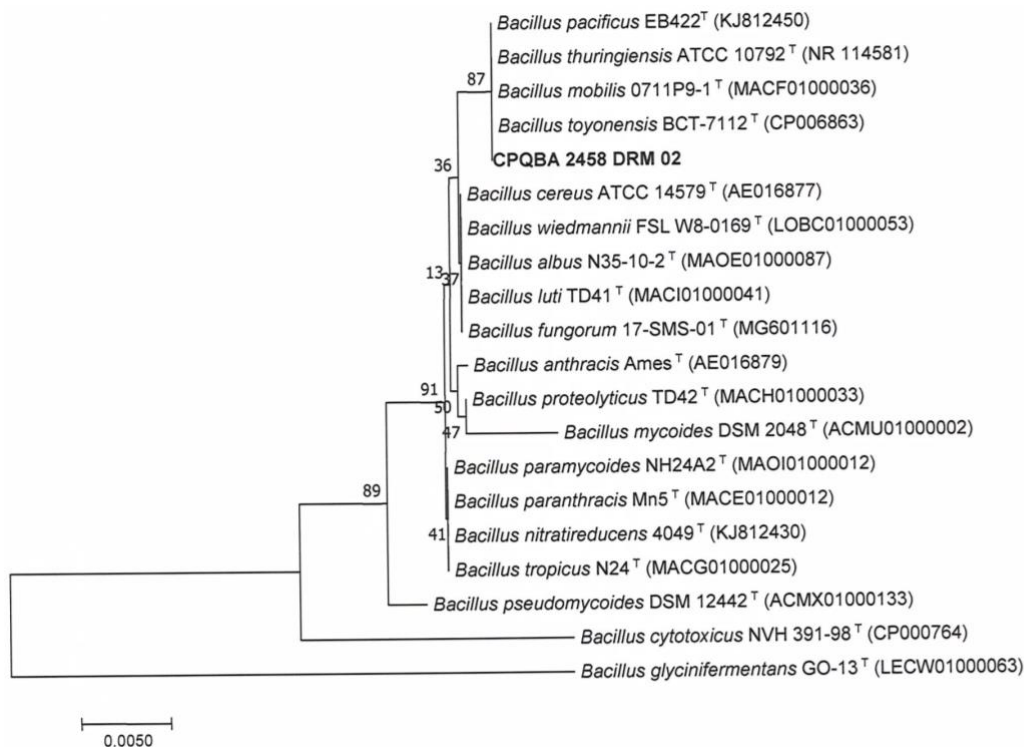


Figura 4.2 – Dendrograma utilizando o método *Neighbor-joining*, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do gene ribossomal 16S da amostra MSL2 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados *Genbank* e *CBS-Knaw*. Fonte: do autor.

As bactérias *B. cereus* são Gram-positiva com uma extensa variedade de aplicabilidade tendo até um papel relevante na agricultura e industrial, como por exemplo, a *B. thuringiensis* no qual é um inseticida biológico bem conhecido (Aronson *et al.* 2001).

Warda *et al.* (2016), em seu estudo isolaram 20 novas cepas de *B. cereus* de produtos alimentícios e ambientes de processamento alimentar. Os micro-organismos foram sequenciados e através do sequenciamento foi possível vincular a capacidade de aproveitamento dos carboidratos, glicose, frutose, maltose, trealose de todas cepas, e algumas cepas também apresentaram capacidade de utilização dos carboidratos xilose, galactose e lactose.

4.3.2 Estudos Cinéticos

A Tabela 4.1 apresenta os parâmetros cinéticos durante a fase exponencial dos cultivos à 30 °C e 40 °C utilizando glicose como fonte de carbono (10 g L⁻¹) em meio mineral, das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp.* MSL2.

Tabela 4.1 - Parâmetros cinéticos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp* MSL2, em cultivos com glicose (10 g L⁻¹) à 30 °C e 40 °C.

Parâmetros	Micro-organismo	Temperatura (°C)			
		30		40	
		T (h)		T (h)	
μ_{\max} (h ⁻¹)	CAT-1	13	0,36±0,01 ^{aB}	13	0,47±0,01 ^{aA}
	MSL1	21	0,22±0,00 ^{bB}	21	0,26±0,02 ^{cA}
	MSL2	21	0,23±0,01 ^{bB}	21	0,31±0,00 ^{bA}
X (g L ⁻¹)	CAT-1	13	3,12±0,04 ^{aA}	13	2,81±0,03 ^{aA}
	MSL1	21	2,36±0,03 ^{aA}	21	2,61±0,08 ^{aA}
	MSL2	21	2,77±0,03 ^{aA}	21	1,74±0,62 ^{bB}
Px (gMCS L ⁻¹ h ⁻¹)	CAT-1	13	0,28±0,00 ^{aB}	13	0,35±0,00 ^{aA}
	MSL1	21	0,11±0,00 ^{bA}	21	0,12±0,00 ^{bA}
	MSL2	21	0,13±0,00 ^{bA}	21	0,08±0,03 ^{cB}
T.D (h)	CAT-1	13	1,91±0,05 ^{bB}	13	2,69±0,00 ^{aA}
	MSL1	21	3,14±0,02 ^{aA}	21	2,60±0,18 ^{aB}
	MSL2	21	2,90 ±0,11 ^{aA}	21	2,17±0,01 ^{bB}

T: Tempo de fermentação; μ_{\max} : Velocidade específica de crescimento máxima; P_X: Produtividade de biomassa; T.D: Tempo de duplicação. X: concentração máxima de células formadas; MCS: massa celular seca; h: horas. Dados apresentados com média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de tukey 0,05 de significância (p<0,05).

Nas análises utilizando glicose como fonte única de carbono à (Tabela 4.1), a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou maior μ_{\max} tanto na temperatura a 30 °C (0,36 h⁻¹) quanto a 40 °C (0,47 h⁻¹) apresentando diferença significativa (p<0,05) quando comparada *M. guilliermondii* MSL1 com μ_{\max} de 0,22 h⁻¹ e da *Bacillus sp.* MSL2 com valor de 0,23 h⁻¹, nota-se que os isolados não apresentaram diferença significativa entre si (p>0,05). Os cultivos conduzidos a 40 °C apresentaram os maiores valores se diferindo estatisticamente (p<0,05), aos cultivos a 30 °C.

O μ_{\max} é um fator importante quando avaliado as cinéticas dos micro-organismos pois significa a adaptação do micro-organismo ao meio, considerando um parâmetro fundamental para a bioprospecção de novos micro-organismos (Gomes *et al.* 2007). Nascimento e Fonseca (2019) analisaram os efeitos de diferentes fontes de carbono na fermentação utilizando a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em diferentes temperaturas (30 e 37 °C). Em seu trabalho os autores observaram maior valor de μ_{\max} de 0,54 h⁻¹ em glicose a 37 °C e 0,44 h⁻¹ a 30 °C, valores próximos encontrados à 40 °C.

Camargo (2013) analisou os parâmetros cinéticos da levedura *M. guilliermondii* Reol 9, onde encontrou-se um valor de μ_{\max} de 0,44 (h⁻¹) em cultivos utilizando glicose

(10 g L⁻¹) como substrato a 30 °C, enquanto Martini *et al.* (2016) obteve um valor 0,07 (h⁻¹) utilizando a levedura *M. guilliermondii* CCT7783 em cultivos utilizando glicose (20 g L⁻¹). Nota-se que há influência em relação ao valor de μ_{\max} para cada variação das leveduras *M. guilliermondii*, assim como foi encontrado neste trabalho no qual o valor de μ_{\max} se diferiu da literatura.

Em relação à concentração máxima de células formadas (X), observou-se que a 30 °C a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou maior valor com 3,12 g L⁻¹, não se diferenciando estatisticamente ($p>0,05$) dos outros micro-organismos, seguido pela *M. guilliermondii* MSL1 com 2,75 g L⁻¹ e a bactéria *Bacillus sp.* MSL2 com 2,36 g L⁻¹. Quando analisado os cultivos à 40 °C a *S. cerevisiae* CAT-1 e a *M. guilliermondii* MSL1 foram os que apresentaram os maiores valores de X, 2,81 g L⁻¹ e 2,61 g L⁻¹ respectivamente, se diferenciando estatisticamente ($p<0,05$) da *Bacillus sp.* MSL2 com valor de 1,74 g L⁻¹. A *S. cerevisiae* CAT-1 e a *M. guilliermondii* MSL1 não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) quando comparado entre temperaturas, somente a *Bacillus sp.* MSL2 apresentou diferença estatística a 40 °C.

Tanimura *et al.* (2012) analisaram o efeito da temperatura na fermentação utilizando levedura *Candida shehatae*, em cultivos à 35, 37, 38 e 39°C utilizando glicose como fonte de carbono. Segundo os autores à 39°C a linhagem apresentou uma queda significativa no crescimento celular comparando a 35°C, obtendo um X próximo a 4,2 g L⁻¹ à 35°C e 1,2 g L⁻¹ à 39°C durante 24 h de fermentação. Portanto o aumento da temperatura pode ser um indicativo da queda do valor de X do isolado MSL2.

Quando analisada a P_x na Tabela 4.1, nota-se que em ambas temperaturas a levedura *S. cerevisiae* apresentou o maior valor de P_x, quando comparado aos outros micro-organismos, sendo de 0,35 gMCS L⁻¹ h⁻¹ a 40 °C e de 0,28 gMCS L⁻¹ h⁻¹ a 30 °C, diferenciando estatisticamente dos micro-organismos estudados e entre temperaturas ($p>0,05$). Já a *M. guilliermondii* MSL1 e a *Bacillus sp.* MSL2 a 30 °C apresentaram valor de P_x de 0,11 gMCS L⁻¹ h⁻¹ e 0,13 gMCS L⁻¹ h⁻¹ respectivamente, enquanto a 40 °C os valores foram de 0,12 gMCS L⁻¹ h⁻¹ e 0,08 gMCS L⁻¹ h⁻¹ respectivamente.

A Figura 4.5 apresenta as curvas de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *M. guilliermondii* MSL1 e da bactéria *B. cereus* MSL2, em glicose 30°C (Figura 4.5A) e 40°C (Figura 4.5B), frutose 30°C (Figura 4.5C) e 40°C (Figura 4.5D), sacarose à 30°C (Figura 4.5E) e 40°C (Figura 4.5F) e xilose à 30°C (Figura 4.5G) e 40 °C (Figura 4.5H).

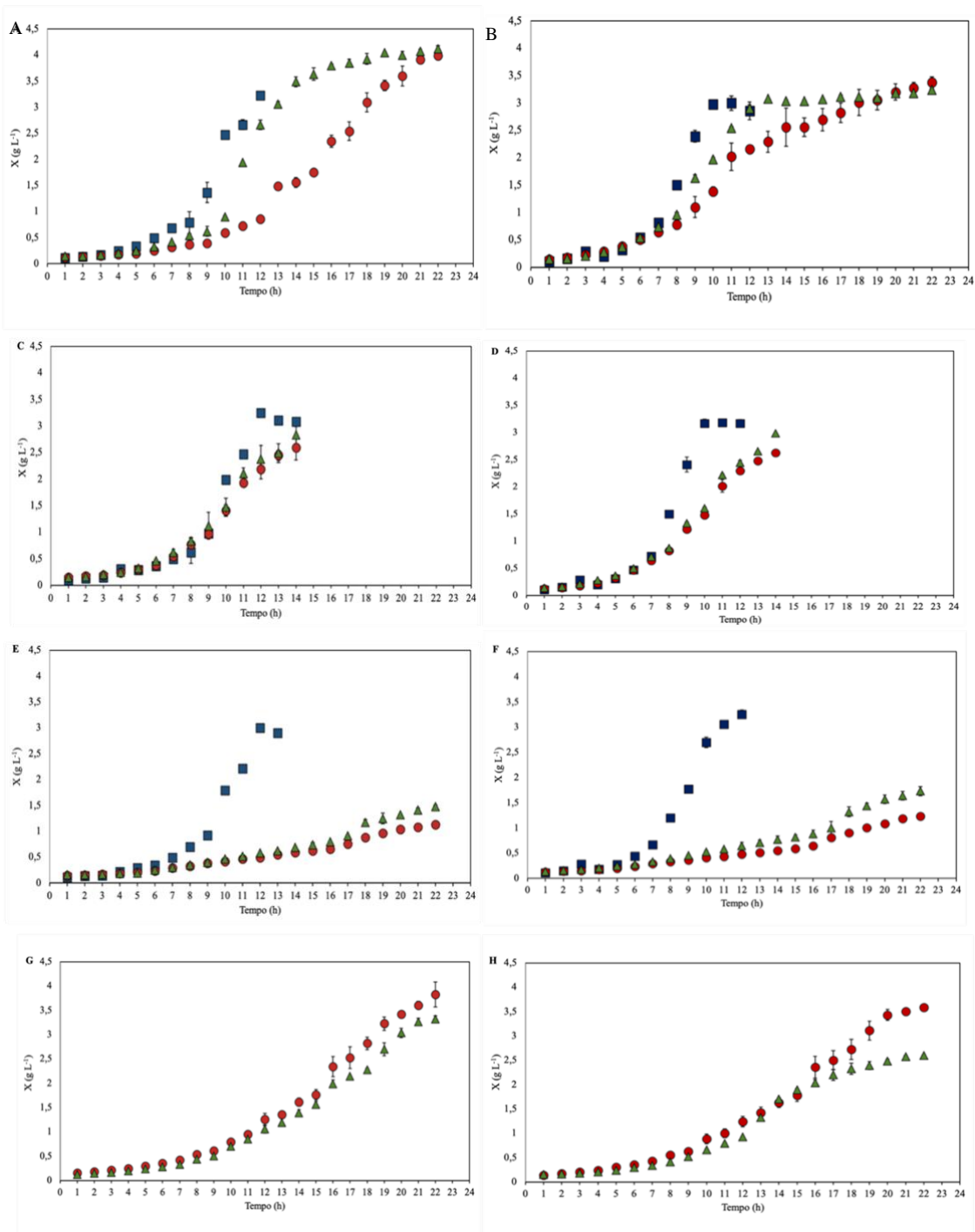


Figura 4.3 - Curva de crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■), *M. guilliermondii* MSL1 (●) e da bactéria *Bacillus sp* MSL2 (▲) em glicose (A e B), frutose (C e D), sacarose (E e F). E somente da levedura *M. guilliermondii* MSL1 (●) e da bactéria *Bacillus sp* MSL2 (▲) em xilose (G e H) como fonte única de carbono (10 g L^{-1}) à 30°C (coluna esquerda) e 40°C (coluna direita).

A Figura 4.3A apresenta a curva cinética das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1, *M. guilliermondii* MSL1 e da bactéria *B. cereus* MSL2 em meio mineral utilizando a glicose como única fonte de carbono à 30°C e Figura 4.3B à 40°C , por 23 h de ensaio para *M.*

guilliermondii MSL1 e *Bacillus sp.* MSL2 e de 12 h para *S. cerevisiae* CAT-1. Para as análises a 30°C (Figura 4.3A) nota-se que até a 5 h de cultivo os três micro-organismos apresentaram comportamento semelhante, após as 5 horas a *S. cerevisiae* CAT-1 e a *Bacillus sp.* MSL2 apresentaram um desenvolvimento mais rápido em relação a *M. guilliermondii* MSL1, somente em 21 h de cultivo a *M. guilliermondii* MSL1 se igualou a *Bacillus sp.* MSL2.

Observa-se que a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou uma fase exponencial maior quando comparado aos outros micro-organismos, iniciando a fase estacionária em aproximadamente 12 h de cultivo, enquanto a *Bacillus sp.* MSL2 alcançou a fase estacionária em aproximadamente 17 h de cultivo e a *M. guilliermondii* MSL1 em 21 h. Nos ensaios à 40°C (Figura 4.3B) observou que a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou um comportamento semelhante à 30 °C, enquanto a *Bacillus sp.* MSL2 apresentou a fase exponencial menor do que encontrado à 30 °C, apresentando a fase estacionaria entre 22 a 23 h de cultivo.

A Tabela 4.2 apresenta os parâmetros cinéticos das leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e *M. guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp.* em frutose (10 g L⁻¹) como fonte de carbono à 30 e 40°C.

Tabela 4.2 - Parâmetros cinéticos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp* MSL2, em cultivos com frutose (10 g L⁻¹) à 30°C e 40°C.

Parâmetros	Micro-organismo	Temperatura (°C)			
		30		40	
		T (h)		T (h)	
μ_{max} (h ⁻¹)	CAT -1	13	0,32±0,01 ^{aB}	15	0,48±0,00 ^{aA}
	MSL1	13	0,28±0,00 ^{bB}	15	0,30±0,01 ^{bA}
	MSL2	13	0,28±0,00 ^{bA}	15	0,29±0,00 ^{cA}
X (g L ⁻¹)	CAT -1	13	3,14±0,07 ^{aA}	15	3,02±0,08 ^{aA}
	MSL1	13	1,08±0,10 ^{cA}	15	0,88±0,01 ^{cB}
	MSL2	13	1,50±0,05 ^{bB}	15	2,16±0,01 ^{bA}
P _x (gMCS L ⁻¹ h ⁻¹)	CAT -1	13	0,28±0,01 ^{aB}	15	0,37±0,01 ^{aA}
	MSL1	13	0,08±0,01 ^{cA}	15	0,06±0,00 ^{cB}
	MSL2	13	0,11±0,00 ^{bB}	15	0,16±0,00 ^{bA}
T.D (h)	CAT -1	13	2,10±0,05 ^{bA}	15	1,43±0,01 ^{bB}
	MSL1	13	2,40±0,01 ^{aA}	15	2,33±0,01 ^{aB}
	MSL2	13	2,41±0,02 ^{aA}	15	2,35±0,02 ^{aA}

T: Tempo de fermentação; μ_{max} : Velocidade específica de crescimento máxima; P_x: Produtividade de biomassa; T.D: Tempo de duplicação. X: concentração máxima de células formadas; MCS: massa celular seca; h: horas. Dados apresentados com média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas

iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de tukey 0,05 de significância ($p < 0,05$).

Segundo às análises em frutose (Tabela 4.2) os maiores valores de μ_{\max} obteve-se nos cultivos à 40 °C para os 3 micro-organismos, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) entre as temperaturas. Em ambas temperaturas a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou os maiores valores de μ_{\max} sendo de 0,32 h⁻¹ a 30 °C e 0,48 h⁻¹ a 40 °C, se diferenciando estatisticamente ($p < 0,05$) da *M. guilliermondii* MSL1 e da *Bacillus sp.* MSL2 sendo que os dois micro-organismos obtiveram um μ_{\max} de 0,28 h⁻¹ a 30 °C e de 0,30 h⁻¹ e 0,29 h⁻¹ a 40 °C respectivamente.

Silva et al. (2019) analisaram a fisiologia de 13 isolados, sendo uma *M. guilliermondii* (Recol 9) e da *S. cerevisiae* CAT-1 utilizando frutose (10 g L⁻¹) como única fonte de carbono a 30°C. Em seus trabalhos a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou um μ_{\max} de 0,45 h⁻¹ enquanto a *M. guilliermondii* (Recol 9) apresentou um μ_{\max} de 0,34 h⁻¹. Valores próximos encontrados neste trabalho a 40°C sendo de 0,48 h⁻¹ para *S. cerevisiae* CAT-1 e de 0,30 h⁻¹ pela *M. guilliermondii* MSL1.

Em relação concentração máxima de biomassa, a *S. cerevisiae* CAT-1 obteve valores acima obtidos pelos outros micro-organismos, sendo de 3,14 g L⁻¹ à 30°C e 3,02 g L⁻¹ à 40°C, seguido pela *Bacillus sp.* MSL2 de 1,50 g L⁻¹ à 30°C e 2,16 g L⁻¹ à 40°C e a *M. guilliermondii* MSL1 1,08 g L⁻¹ à 30°C e 0,88 g L⁻¹ à 40°C. Nota-se que os micro-organismos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si e entre as temperaturas.

Ainda em relação a X a Figura 4.3C apresenta a curva cinética dos micro-organismos a 30°C e a Figura 4.3D a 40°C em frutose. Um dos destaques é o tempo de cultivo, no qual foi mais rápido quando comparado aos outros substratos. Os três micro-organismos apresentaram comportamento semelhante até 7 h de cultivo nas duas temperaturas, após 7h de cultivo a *S. cerevisiae* CAT-1 se sobressaiu em relação aos outros micro-organismos. Tanto a 30 quanto a 40 °C *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou a fase estacionária por volta de 11 h de cultivo, enquanto os outros micro-organismos foi em aproximadamente 13 h.

Em relação ao Px, a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou a maior produtividade nas duas temperaturas, sendo de 0,28 gMCS L⁻¹ h⁻¹ a 30 °C e de 0,37 gMCS L⁻¹ h⁻¹ em 40 °C, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) entre os micro-organismos. Somente a *M. guilliermondii* MSL1 não apresentou um aumento em sua produtividade a 40 °C, sendo de 0,06 gMCS L⁻¹ h⁻¹ e de 0,08 gMCS L⁻¹ h⁻¹ a 30 °C.

A Tabela 4.3 apresenta as análises cinéticas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp.* MSL2 utilizando sacarose como única fonte de carbono à 30°C e 40°C.

Tabela 4.3 - Parâmetros cinéticos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp.* MSL2, em cultivos com sacarose (10 g L⁻¹) à 30°C e 40°C.

Parâmetros	Micro-organismo	Temperatura (°C)			
		30		40	
		T (h)		T (h)	
μ_{\max} (h ⁻¹)	CAT-1	13	0,33±0,02 ^{aB}	13	0,47±0,01 ^{aA}
	MSL1	21	0,12±0,00 ^{bA}	21	0,14±0,00 ^{bA}
	MSL2	21	0,12±0,00 ^{bA}	21	0,14±0,01 ^{bA}
X (g L ⁻¹)	CAT -1	13	2,89±0,07 ^{aA}	13	2,84±0,11 ^{aA}
	MSL1	21	0,83±0,03 ^{cA}	21	0,74±0,00 ^{cA}
	MSL2	21	1,06±0,03 ^{bB}	21	1,28±0,05 ^{bA}
P _X (gMCS L ⁻¹ h ⁻¹)	CAT -1	13	0,26±0,01 ^{aB}	13	0,31±0,01 ^{aA}
	MSL1	21	0,03±0,00 ^{bA}	21	0,03±0,00 ^{cA}
	MSL2	21	0,05±0,00 ^{bA}	21	0,06±0,00 ^{bA}
T.D (h)	CAT -1	13	2,10±0,12 ^{bA}	13	1,47±0,03 ^{cB}
	MSL1	21	5,59±0,10 ^{aA}	21	5,72±0,02 ^{aA}
	MSL2	21	5,38±0,06 ^{aA}	21	4,90±0,25 ^{bB}

T: Tempo de fermentação; μ_{\max} : Velocidade específica de crescimento máxima; P_X: Produtividade de biomassa; T.D: Tempo de duplicação. X: concentração máxima de células formadas; MCS: massa celular seca; h: horas. Dados apresentados com média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de tukey 0,05 de significância (p<0,05).

Segundo os dados a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou o maior μ_{\max} de 0,33 h⁻¹ e 0,47 h⁻¹, à 30 e 40 °C, respectivamente, se diferenciando estatisticamente (p>0,05) dos outros micro-organismos, seguido pela levedura *M. guilliermondii* MSL1 e a bactéria *Bacillus sp.* MSL2 ambos com valor de μ_{\max} 0,12 h⁻¹ à 30°C e 0,14 h⁻¹ à 40°C.

Observou-se que o aumento da temperatura beneficiou a *S. cerevisiae* CAT-1, obtendo o μ_{\max} de 0,47 h⁻¹, apresentaram diferença significativa (p>0,05) entre as temperaturas. Ressalta-se que *M. guilliermondii* MSL1 e a *Bacillus sp.* MSL2 tiveram o menor μ_{\max} em sacarose, quando comparado aos demais substratos. No entanto Silva (2017) obteve um μ_{\max} de 0,01 h⁻¹ produzido pela *M. guilliermondii* Recol 09, enquanto neste trabalho a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou um μ_{\max} de 0,12 h⁻¹, muito superior ao encontrado por Silva (2017).

Em relação à concentração máxima de célula a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou o maior X sendo 2,89 g L⁻¹ à 30°C e 2,84 g L⁻¹ a 40°C seguido pela *Bacillus sp.* MSL2 com 1,06 g L⁻¹ à 30°C e 1,28 g L⁻¹ à 40°C e a *M. guilliermondii* MSL1 com 0,83 g L⁻¹ à 30°C e 0,74 g L⁻¹ à 40°C. Houve diferença significativa (p<0,05) entre os micro-organismos à 30 e 40°C, no entanto não houve diferença significativa (p>0,05) quando entre temperaturas.

A Figura 4.3E apresenta a curva cinética dos micro-organismos utilizando sacarose como fonte de carbono à 30°C e Figura 4.3F à 40°C. A *M. guilliermondii* MSL1 e a *Bacillus sp.* MSL2 apresentaram uma dificuldade de adaptação ao substrato sacarose, caracterizando o crescimento semelhante a uma reta, e não a curva padrão de crescimento, como apresentado pela *S. cerevisiae* CAT-1.

A *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou o maior P_x em 30 °C e 40 °C sendo de 0,26 gMCS L⁻¹ h⁻¹ e 0,31 gMCS L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, enquanto *M. guilliermondii* MSL1 apresentou valor de 0,03 nas duas temperaturas analisadas, e a *Bacillus sp.* MSL2 de 0,05 a 30 °C e 0,06 em 40 °C. Nas duas temperaturas os micro-organismos apresentaram diferença significativa (p<0,05). Vale ressaltar que de todos os substratos analisados os cultivos em sacarose, a *M. guilliermondii* MSL1 e a *Bacillus sp.* MSL2 apresentaram o menor P_x.

A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros cinéticos da levedura *M. guilliermondii* MSL1 e a *Bacillus sp.* MSL2 a 30 e 40 °C em cultivos utilizando xilose. Ressalta-se que, não foi utilizado a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, devido não apresentar capacidade fermentativa em xilose (Gírio *et al.* 2010; Claassen *et al.* 1999).

Tabela 4.4 - Parâmetros cinéticos da levedura *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 e da bactéria *Bacillus sp* MSL2, em cultivos com xilose (10 g L⁻¹) à 30°C e 40°C.

Parâmetros	Micro-organismo	Temperatura (°C)			
		30		40	
		T (h)		T (h)	
μ_{max} (h ⁻¹)	MSL1	21	0,18±0,00 ^{bA}	21	0,18±0,00 ^{bA}
	MSL2	21	0,19±0,02 ^{aB}	21	0,21±0,00 ^{aA}
X (g L ⁻¹)	MSL1	21	2,61±0,17 ^{aA}	21	2,60±0,03 ^{aA}
	MSL2	21	2,01±0,05 ^{bA}	21	1,99±0,00 ^{bA}
P _x (gMCS L ⁻¹ h ⁻¹)	MSL1	21	0,12±0,01 ^{aA}	21	0,12±0,00 ^{aA}
	MSL2	21	0,10±0,002 ^{bA}	21	0,09±0,00 ^{bA}
T.D (h)	MSL1	21	3,77±0,003 ^{aA}	21	3,67±0,03 ^{aB}
	MSL2	21	3,57±0,03 ^{bA}	21	3,30±0,04 ^{bB}

T: Tempo de fermentação; μ_{\max} : Velocidade específica de crescimento máxima; P_x : Produtividade de biomassa; T.D: Tempo de duplicação. X: concentração máxima de células formadas; MCS: massa celular seca; h: horas. Dados apresentados com média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de tukey 0,05 de significância ($p < 0,05$).

Em relação ao μ_{\max} a *Bacillus sp.* MSL2 apresentou o maior em ambas temperaturas, sendo de $0,19 \text{ h}^{-1}$ à 30°C e $0,21 \text{ h}^{-1}$ à 40°C , enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 obteve um μ_{\max} de $0,18 \text{ h}^{-1}$ a 30°C e $0,19 \text{ h}^{-1}$ à 40°C . Os isolados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si nas duas temperaturas analisadas.

Em relação a concentração máxima de biomassa, a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou valores semelhantes em ambas temperaturas, sendo em 30°C valor de X $2,61 \text{ g L}^{-1}$ e à 40°C valor de X $2,60 \text{ g L}^{-1}$ o mesmo ocorreu com a *Bacillus sp.* MSL2 onde apresentou um valor de X de $2,01 \text{ g L}^{-1}$ em 30°C e $1,99 \text{ g L}^{-1}$ em 40°C . Os micro-organismos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si nas duas temperaturas.

A curva de crescimento dos micro-organismos em cultivos com xilose a 30°C (Figura 4.3G) e a 40°C (Figura 4.3H) apresentaram características semelhante em sua fase de adaptação, exponencial e a fase estacionária sendo esta a 20 h de cultivo.

Quanto à P_x a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou a maior valor $0,12 \text{ gMCS L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à 30°C e 40°C enquanto o isolado MSL2 apresentou P_x de $0,10 \text{ gMCS L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à 30°C e $0,09 \text{ gMCS L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à 40°C . Os isolados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si nas duas temperaturas.

Vale ressaltar que a levedura *M. guilliermondii* tem por características realizar fermentação em diversos substratos, principalmente em xilose, sendo esse seu grande diferencial quando comparada com outras leveduras industriais (Yan *et al.* 2021). Corroborando com o este trabalho pois, assim como apresentado a levedura *M. guilliermondii* MSL1, apresentou desenvolvimento em todos os substratos estudados, principalmente em xilose.

Como dito o aproveitamento da xilose é uma das principais características da *M. guilliermondii*, e é considerada uma das leveduras mais adequadas para fermentação em xilose para produção do etanol e xilitol (Canettieri *et al.* 2001; Carvalho *et al.* 2002; Atzmüller *et al.* 2020; Yan *et al.* 2021).

Diferente das *S. cerevisiae*, por exemplo, a *M. guilliermondii* é capaz de metabolizar tanto hexoses, como por exemplo a glicose, e pentoses como a xilose, com a mesma eficiência (Hermansyah *et al.* 2019; Yan *et al.* 2021).

A característica para assimilação e fermentação do substrato xilose não é comum na maioria dos isolados (Kuhad *et al.* 2011), somente 1,5% dos isolados apresentam capacidade para se multiplicar em xilose e produzir etanol utilizando a mesma fonte de carbono (Valinhas *et al.* 2018). No ponto de vista biotecnológico a levedura *M. guilliermondii* MSL1 e a bactéria *Bacillus sp.* MSL2 apresentaram dados promissores para substrato xilose, sendo assim consideradas um grande diferencial.

4.3.3 Ensaio fermentativos

Para os ensaios fermentativos em mosto de cana-de-açúcar e o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, foram selecionadas as leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e a *M. guilliermondii* MSL1.

Não se foi utilizado a *Bacillus sp.* MSL2 nos ensaios fermentativos, devido ser identificada como bactérias e assim, apresentar riscos a eficiência fermentativa devido a produção de outros sub-produtos, como ácidos orgânicos (butírico, acético, fórmico, láctico) (Andrietta *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2018).

Em relação as análises microbiológicas dos ensaios fermentativos em mosto, a Figura 4.4 apresenta que os ensaios iniciaram com aproximadamente 2×10^9 UFC/mL, e segundo os dados houve crescimento em todos os ciclos fermentativo.

A *M. guilliermondii* MSL1 apresentou um crescimento superior a *S. cerevisiae* CAT-1, atingindo a $7,35 \times 10^{13}$ UFC/mL no terceiro ciclo fermentativo, e apresentando uma queda no quinto ciclo ($1,58 \times 10^{13}$ UFC/mL) e novamente ao final do sexto ciclo fermentativo um aumento ($7,92 \times 10^{13}$). A *S. cerevisiae* CAT-1 obteve o maior valor de UFC/mL somente no quinto ciclo fermentativo sendo de $1,07 \times 10^{13}$ UFC/mL.

Segundo a variação logarítmica do crescimento das leveduras, considerando o valor inicial e o final do sexto ciclo fermentativo, os dados confirmam que a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou o maior crescimento celular 4,61 ciclos log enquanto a *S. cerevisiae* CAT-1 obteve um crescimento de 3,06 ciclos log.

Batistote *et al.* (2010) analisaram o perfil fermentativo da *S. cerevisiae* CAT-1 em mosto de cana-de-açúcar a 15 °Brix a 30 °C por 16h. Segundo os autores a levedura apresentou uma formação de biomassa próxima a 18 mg/mL em 16 h de fermentação e se manteve com uma viabilidade celular de 88%.

Carvalho et al. (2020) analisaram *S. cerevisiae* CAT-1 em co-cultura com a bactéria *Lactobacillus fermentum* em mosto de cana-de-açúcar. Segundo os autores a levedura atingiu cerca de 9×10^8 UFC/mL ao final de 30 h de fermentação.

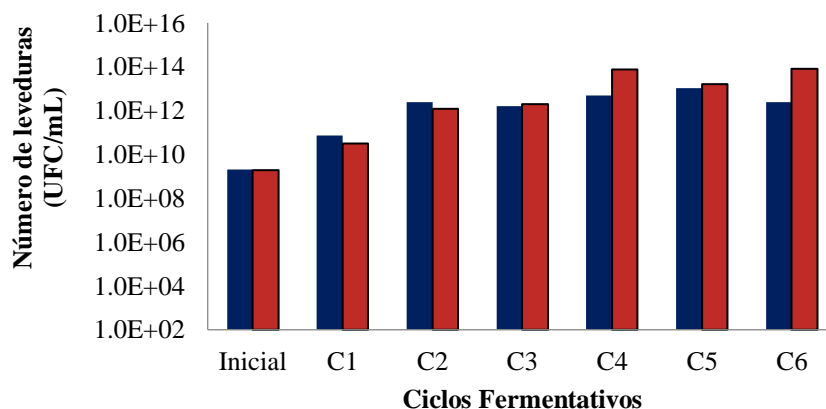


Figura 4.4 - Número de leveduras (UFC/mL) ao final de cada ciclo dos ensaios fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) e *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■), durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada, com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo. *Inicial se refere ao início do primeiro ciclo fermentativo.

Em relação as análises microbiológicas em hidrolisado a Figura 4.5A apresenta a contagem inicial de UFC/mL e a Figura 4.5B a contagem ao final dos tempos fermentativo.

Os dados mostram que a concentração inicial foi próxima de 2×10^8 UFC/mL em todos os ensaios fermentativos (Figura 4.5A). Em relação a contagem de UFC/mL (Figura 4.5B) a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou um ligeira superioridade na fermentação com duração de 24 h sendo de $6,18 \times 10^9$ UFC/mL, quando comparado a *M. guilliermondii* MSL1 tendo um crescimento de $6,00 \times 10^9$ UFC/mL também em 24h de fermentação.

Contudo o aumento na duração dos ensaios fermentativos foi prejudicial para a *S. cerevisiae* CAT-1, pois os ensaios com mais de 24 h de fermentação, a levedura apresentou uma queda gradual no número de UFC/mL, sendo de 6×10^7 UFC/mL em 36 h, $2,23 \times 10^7$ UFC/mL em 48 h e 9×10^6 UFC/mL a 60 h de fermentação.

Enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 demonstrou um comportamento inverso a *S. cerevisiae* CAT-1, pois quanto mais longo o tempo fermentativo, maior é número de UFC/mL. Em 12 e 24 h ambas leveduras apresentaram um crescimento próximo, no

entanto após 24 h de fermentação a *M. guilliermondii* MSL1 tem um aumento no número de UFC/mL sendo de $1,77 \times 10^{11}$ UFC/mL em 36 h, em 48 h sendo de $7,24 \times 10^9$ UFC/mL, e a 60 h, maior UFC/mL, sendo de $2,18 \times 10^{11}$ UFC/mL.

Dionísio et al. (2021) avaliaram o peso seco da biomassa da *S. cerevisiae* CAT-1 em ensaios fermentativos com hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar, com reciclo celular, sendo ciclos de 10h. Segundo os autores a levedura iniciou os ensaios com $0,83 \text{ g/L}^{-1}$ e ao final das 10h de fermentação a levedura obteve uma produção do peso seco de $4,73 \text{ g/L}^{-1}$.

Segundo Jansen et al. (2017) há diversas cepas de *S. cerevisiae* capazes de realizar produção de produzir bioetanol 2G, ou seja, por meio da fermentação de biomassa lignocelulósica, como por exemplo, TMB3400 (Karhumaa et al. 2007), GLBRCY87 (Sato et al, 2016) e SR8 (Wei et al. 2013).

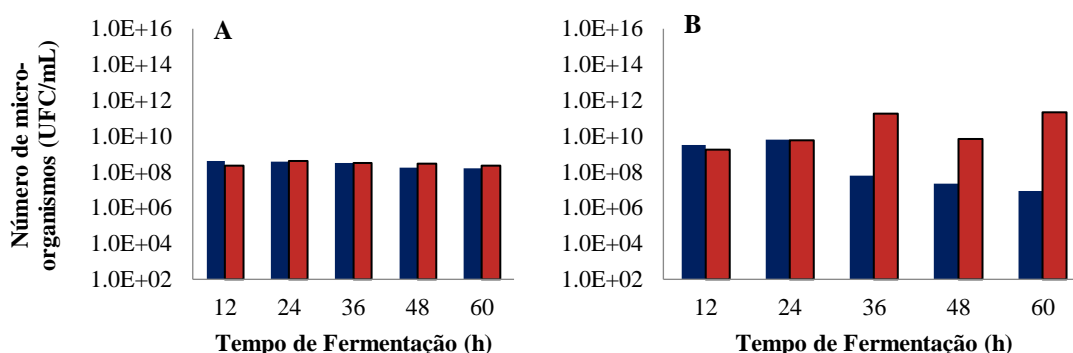


Figura 4.5 - Número de leveduras (UFC/mL) ao final dos ensaios fermentativos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) sendo no início de cada ensaio fermentativo e (B) ao final do tempo fermentativo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH inicial 6,50, $7 \text{ }^\circ\text{Brix}$.

A Figura 4.6A apresenta os dados de pH ao final de cada ciclo fermentativo em mosto, segundo os dados a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou o menor a maior queda do pH em todos os ciclos fermentativo, sendo o menor pH no sexto ciclo de 4,09. Enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 obteve o menor valor de pH no quarto ciclo fermentativo sendo de 4,29.

Embora a faixa ideal de pH seja entre 4,0 a 5,0 (Lima et al., 2001), a utilização do mosto com pH de 5,70 teve por objetivo não influenciar nas características padrões do mosto obtidos pela indústria durante a extração. Conduzindo os ensaios fermentativos próximo das condições realizadas pela industria.

Costa et al. (2017) realizaram fermentações com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 com reciclo celular (9 h cada ciclo), com pH inicial de 4,50. Segundo os autores, a maior queda do pH foi no terceiro ciclo fermentativo de 0,90. Neste trabalho houve-se uma queda maior da *S. cerevisiae* CAT-1 sendo de 1,61 (sexto ciclo) e 1,41 (quinto ciclo).

Os resultados do presente estudo sugerem que o pH pode ter sido um fator influenciador para o alto crescimento da *M. guilliermondii* MSL1, indicando que a levedura apresenta uma faixa de pH diferente da levedura *S. cerevisiae* CAT-1.

Em relação as análises de pH em hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar (Figura 4.6B), a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou uma queda maior, quando comparada *M. guilliermondii* MSL1 em todos os tempos fermentativos. A *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou a maior queda de pH em 48 h de fermentação sendo de 5,10, enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 foi em 60 h com 5,59.

Segundo Perna et al. (2018) o pH tem um efeito fundamental no crescimento da levedura *M. guilliermondii*. Segundo os autores o baixo pH se tornar prejudicial para as leveduras, pois a alteração do pH de 5,5 para 3,5 inibiu totalmente o crescimento das células. Sendo assim o pH de 6,5 utilizado nos ensaios em hidrolisado neste estudo, foi um dos fatores no qual beneficiou o alto crescimento da levedura *M. guilliermondii* MSL1 e prejudicial para *S. cerevisiae* CAT-1.

A variação do valor do pH ao longo do processo fermentativo é um indicativo fundamental para a fermentação alcoólica e ocorre devido à excreção de ácidos orgânicos, absorção de aminoácidos básicos, excreção de dióxido de carbono e absorção de fosfato (Coote e Kirsop 1976).

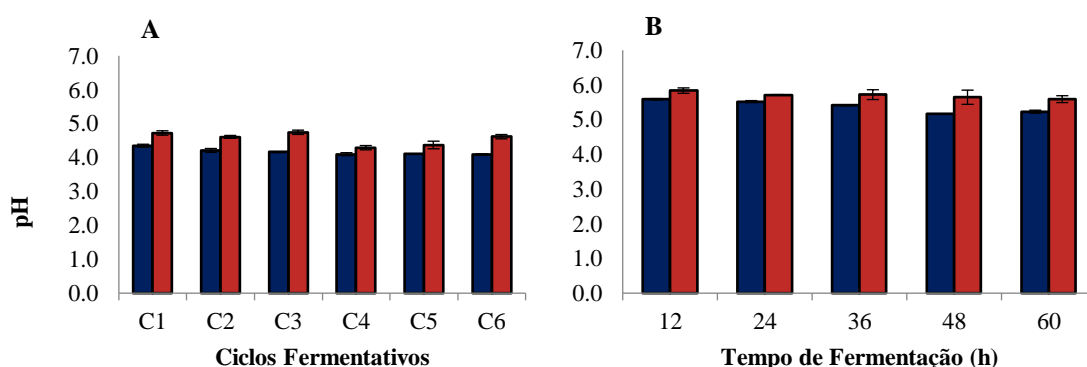


Figura 4.6 - Valor do pH ao final dos ensaios fermentativos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) e da *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) ao final de cada ciclo fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento

ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo. **(B)** Ao final de cada tempo de fermentação, em cultivos de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 °C, pH inicial 6,50, 7 °Brix.

A Figura 4.7A apresenta os dados de ART (açúcar redutor total) residual em mosto. Comparando os dois micro-organismos, a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou o menor ART total em todos os ciclos fermentativos. Dentre os seis ciclos a *S. cerevisiae* CAT-1 teve o maior ART residual (62,72 g/L⁻¹) no primeiro ciclo e o menor ART residual (10,56 g/L⁻¹) no sexto ciclo.

Entretanto vale resaltar que após o segundo ciclo fermentativo, houve uma baixa variação no ART residual, da *S. cerevisiae* CAT-1. O comportamento de consumo do substrato apresentado pela levedura nos ensaios fermentativos, é devido a sua rápida adaptação ao mosto possibilitando assim o constante consumo dos açúcares.

A *M. guilliermondii* MSL1, assim como a *S. cerevisiae* CAT-1, teve o maior ART residual (111,92 g/L⁻¹) no primeiro ciclo fermentativo e o menor ART residual no segundo ciclo fermentativo (76,05 g/L⁻¹). Ao contrário da *S. cerevisiae* CAT-1 após o segundo ciclo a *M. guilliermondii* MSL1 obteve uma maior variação no ART sendo de 76,05 g/L⁻¹ (segundo ciclo) a 97,75 g/L⁻¹ (quinto ciclo).

Comparada a *S. cerevisiae* CAT-1 a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou um alto valor de ART residual ao final da fermentação (9h). No entanto considerando os dados dos ensaios cinéticos (Figura 4.5), sugere-se que a *M. guilliermondii* MSL1 requer um tempo maior que 9h de fermentação para se adaptar e consumir todo o substrato.

Francischetti (2017), analisou o perfil fermentativo da linhagem *S. cerevisiae* CAT-1 em mosto com alta concentração de açúcar, sendo ART inicial de 300 g/L⁻¹. Segundo o autor a *S. cerevisiae* CAT-1 obteve um ART residual de 29,30 g/L⁻¹ ao final da fermentação, corroborando sua alta eficiência de consumo em mosto também encontrado no atual trabalho.

Batistote et al. (2010), analisaram o desempenho de diferentes linhagens comerciais em mostos de cana-de-açúcar com 15 °Brix e sem correção de pH, a 30 °C durante 16 horas de fermentação. Onde obtiveram cerca de 50% de consumo do açúcar presente no substrato em aproximadamente 8 horas de fermentação. Valores próximos obtido em nossos estudos pela *S. cerevisiae* CAT-1 no primeiro ciclo fermentativa, aproximadamente 62% do consumo do açúcar.

Maxwell et al. (2017) avaliaram o consumo de açúcar das leveduras *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae* em meio elaborado (extrato de levedura 6 g/L⁻¹, peptona 10 g/L⁻¹ e extrato de malte 6 g/L⁻¹) utilizando a glicose em diferentes concentrações (5 g/L⁻¹, 10 g/L⁻¹, 20 g/L⁻¹ e 30 g/L⁻¹). Segundo os dados nos ensaios utilizando 30 g/L⁻¹, a levedura *M. guilliermondii* apresentou o menor ART residual, tendo um consumo de aproximadamente 57,50%.

A Figura 4.7B apresenta os dados dos ensaios fermentativos em hidrolisado. Segundo os dados, a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou o menor ART residual. Embora a *M. guilliermondii* MSL1 tenha apresentado uma queda gradual no ART residual, foi baixa a variação do ART residual, menor de 10,97 g/L⁻¹ em 60 h e maior 12,59 g/L⁻¹ em 24 h. Já a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou um comportamento diferente, apresentando uma relação do consumo de açúcar com o tempo fermentativo. Nota-se que o menor ART residual foi em 12h de 13,04 g/L⁻¹ e o maior em 60 h ART 24,62 g/L⁻¹.

Vale destacar que a *S. cerevisiae* CAT-1 teve um consumo dos açúcares de 93,59% nos ensaios fermentativo com mosto e de 87,43% nos ensaios com hidrolisado, enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 em mosto foi de 53,84% e em hidrolisado foi de 89,43%.

Martini et al. (2016) realizaram estudos fermentativos da levedura *M. guilliermondii* em meio sintético com xilose, sendo a única fonte de carbono, a 30 °C, pH 5,5, 160 rpm por 120h. Segundo os autores a levedura apresentou capacidade de consumir 98,1% dos açúcares do substrato. O fato da *M. guilliermondii* MSL1 ter apresentado um melhor desempenho no consumo dos açúcares em hidrolisado, pode estar associado a presença da xilose, pois é um dos principais açúcares obtidos na hidrólise de materiais lignocelósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar.

Dionísio et al. (2021) utilizaram a *S. cerevisiae* CAT-1 em ensaios fermentativos com hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar em diversos ciclos fermentativos de 10h de fermentação. Segundo os autores no primeiro ciclo fermentativo (10 h de fermentação) a levedura apresentou um açúcar residual de 33 g/L⁻¹ correspondendo cerca de 40,5% de açúcar residual inicial.

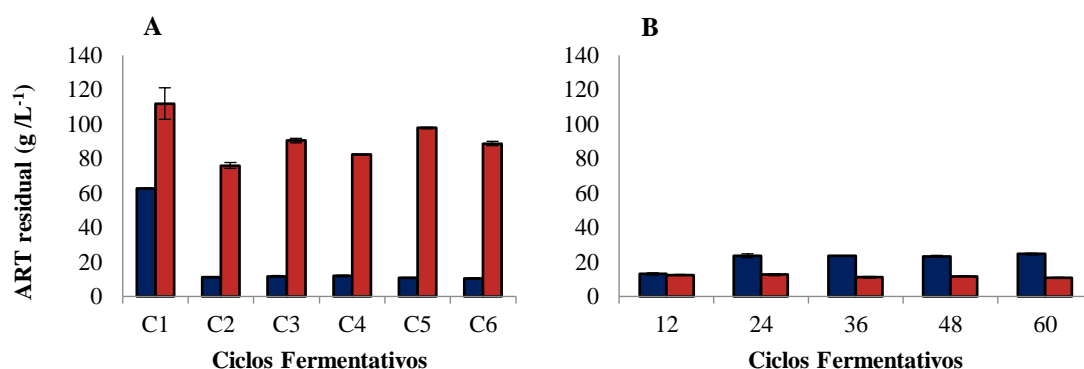


Figura 4.7 - Valor de ART (g/L^{-1}) ao final dos ensaios fermentativos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (■) da *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) ao final de cada ciclo fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo (*ART Inical = $164,75\text{ g/L}^{-1}$). (B) Ao final de cada tempo de fermentação, em cultivos utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH inicial 6,50, 7 °Brix (*ART Inical = $103,77\text{ g/L}^{-1}$).

A Figura 4.8A apresenta os dados da produção de etanol nos ensaios fermentativos em mosto, nota-se que há uma predominância na produção de etanol da *S. cerevisiae* CAT-1, em todos os ciclos fermentativos.

A maior produção de etanol da *S. cerevisiae* CAT-1, foi sexto ciclo fermentativo com (12,4% v/v), no entanto a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou pouca variação de produção entre os ciclos sendo de 10,97% v/v no primeiro ciclo fermentativo a 12,4% v/v no sexto ciclo fermentativo.

Já a levedura *M. guilliermondii* MSL1 apresentou a maior produção de etanol no quarto ciclo fermentativo sendo de 7,4% v/v. Oposto da *S. cerevisiae* CAT-1 a *M. guilliermondii* MSL1 obteve uma produção gradual de etanol até o quarto ciclo (11,5% v/v) fermentativo onde-se a partir daí, apresentou uma constância de produção.

Os dados de produção de etanol em mosto corroboram com as análises de pH (Figura 4.6) uma vez que os fatores estão correlacionados durante o processo fermentativo. Como dito a maior produção de etanol da *S. cerevisiae* CAT-1 foi no sexto ciclo, onde se obteve o menor pH, enquanto a *M. guilliermondii* MSL1 foi no quarto ciclo, onde também se obteve o menor pH.

Maxwell et al., (2017), realizaram ensaios fermentativos da levedura *M. guilliermondii* em caldo elaborado (6g / L de Extrato de levedura; Peptona 10g / L; Extrato de malte 6g / L; Glicose 2g / L), com adição de 25 mL de melão, pH 5,50, 30

°C, 120 rpm por 96 h. Segundo os autores a produção de etanol da *M. guilliermondii* foi de 10 ± 0.2 mg/ml e de 9 ± 0.2 mg/ml para *S. cerevisiae*.

Batistote et al. (2010) analisaram o perfil fermentativo de linhagens de *S. cerevisiae* em fermentações a 30 °C, 15 °Brix no período de 16h. Segundo os autores a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou a melhor eficiência de produção sendo de 16% v/v, comparada as *S. cerevisiae* Pedra-2, Fleischman e a Barra Grande. A diferença de produção de produção encontrada nestes estudos (12,4% v/v sexto ciclo), pode estar relacionado à diferença dos diferentes graus Brix utilizados nos estudos.

Nas fermentações em hidrolisado (Figura 4.8B) a *M. guilliermondii* MSL1 teve uma produção maior que a *S. cerevisiae* CAT-1, sendo de 6,9% v/v em 36h de fermentação e a menor produção de 4,5% v/v em 60h. Embora a *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou o menor UFC/mL (Figura 4.7) em 60h de fermentação, a levedura obteve a maior produção de etanol na fermentação de 60h com 5,5% v/v.

Dionísio et al. (2021) utilizaram a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 para realizar fermentação em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com reciclo celular (10h o ciclo). Segundo os autores a levedura industrial obteve uma produção de etanol de 19.50 ± 0.42 g/L⁻¹ no primeiro ciclo fermentativo e de 35.5 ± 1.64 g/L no segundo ciclo fermentativo, consumindo a maioria dos açúcares presentes.

Perna et al. (2018) utilizaram a levedura *M. guilliermondii* em ensaios fermentativos com meio semi-sintético (5 g/L⁻¹ di-hidrogenofosfato de potássio, 1 g/L⁻¹ cloreto de potássio, 1,5 g/L⁻¹ cloreto de amônio, 1 g/L⁻¹ sulfato de magnésio heptahidratado, 6 g/L⁻¹ extrato de levedura, 3 g/L⁻¹ glicose, 3 g/L⁻¹ arabinose e 6 g/L⁻¹ xilose) a 30 °C, pH 5,5 por 96h. Segundo os autores a levedura apresentou capacidade fermentativa tendo uma produção de aproximadamente 5 g/L⁻¹ de etanol, corroborando com o atual estudo, uma vez que se comprovou a capacidade de produção de etanol da *M. guilliermondii* MSL1 nos substratos utilizados.

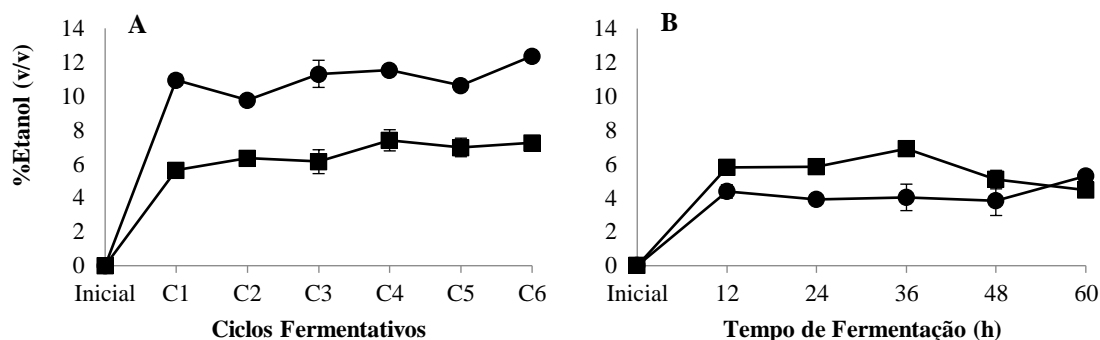


Figura 4.8 - Valor da produção do etanol (g/L^{-1}) ao final dos ensaios fermentativos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (●) e da *Meyerozyma guilliermondii* MSL1 (■) (A) ao final de cada ciclo fermentativos em mosto de cana-de-açúcar, durante seis ciclos fermentativos de 9 horas cada com reciclo celular, a 30 °C, pH inicial 5,70, 18 °Brix, aplicando o tratamento ácido (com 5% de etanol) de 2 horas ao final de cada ciclo. (B) Ao final de cada tempo de fermentação, em cultivos de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 °C, pH inicial 6,50, 7 °Brix.

4.4 Conclusões

Foi possível a identificação com 100% de certeza somente do isolado MSL1, identificado como a levedura *Meyerozyma guilliermondii*. Enquanto o isolado MSL2 não foi possível realizar a identificação a nível de espécie, sugerindo que é uma bactéria do gênero *Bacillus sp.*

Embora seja uma bactéria e sabe-se apenas a sua espécie, a bactéria *Bacillus sp.* MSL2 mostrou potencial nos estudos cinéticos, pois a mesma obteve-se resultados satisfatório em todos substratos e temperaturas analisadas durante os estudos cinéticos.

Entretanto destaca-se a *M. guilliermondii* MSL1, uma vez que a levedura apresentou dados promissores, comparado a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, apresentando um grande potencial biotecnológico. Principalmente nos cultivos com xilose, fator importante considerando a dificuldade de se bioprospectar obter micro-organismos fermentadores de xilose.

Corroborando o potencial da *M. guilliermondii* MSL1 quando submetidas nos estudos de fermentação alcoólica, pois a levedura realizou um alto crescimento celular nos dois substratos utilizados (mosto de cana-de-açúcar e hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar), além do consumo dos açúcares presente no substrato e principalmente para produção do etanol, apresentando um grande diferencial nas fermentações em hidrolisado.

Embora a *S. cerevisiae* CAT-1 tenha apresentado queda na UFC/mL nas fermentações em hidrolisado, a mesma realizou o consumo dos açúcares presentes no mosto e uma produção de etanol.

4.5 Referências

- Amir, S., Sutar, S., Singh, S.K., Baghela, A. (2015) A rapid and efficient method of fungal genomic dna extraction, suitable for pcr based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine* 5, 74-81.
- Andrietta, M. G. S.; Steckelberg, C.; Andrietta, S. R. (2006) Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. In: *Multiciência: Construindo A História Dos Produtos Naturais*, Anais. Campinas: UNICAMP, 1-16.
- Antunes, F.A.F., Thomé, L.C., Santos, J.C., Ingle, A.P., Costa, C.B., Anjos, V., Bell, M.J.V., Rosa, C.A. and Da Silva, S.S. (2021) Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. *Renewable Energy* 163, 1343-1355.
- Aronson, A.I. and Shai, Y. (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol Lett* 195, 1-8.
- Batistote, M., Cardoso, C.A.L., Ramos, D.D. and Ernandes, J.R. (2010) Desempenho de leveduras obtidas em indústria de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. *Ciência e Natura* 2, 83-95.
- Bertolo, M.R.V., Paiva, L.B.B., Nascimento, V.M., Gandin, C.A., Neto, M.O., Driemeier, C.E. and Rabelo, S. (2019) Lignins from sugarcane bagasse: renewable source of nanoparticles as Pickering emulsions stabilizers for bioactive compounds encapsulation. *Industrial Crops and Products* 140, 111591.
- Boretsky, Y., Voronovsky, A., Tehlivets, O.L., Hasslacher, M., Kohlwein, S.S. and Shavlosky. (1999) Identification of an ARS element and development of a high efficiency transformation system for *Pichia guilliermondii*. *Curr. Genet.* 36, 215–221.
- Branco, R.H., Serafim, L.S. and Xavier, A.M. (2019) Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. *Fermentation* 5, 4.
- Brandt, A., Grasvik, J., Hallet, J.P. and Welton, T. (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry* 15, 550-583.
- Brasil, M.A.S., Gomes, L.H., Kamogawa, M.Y. and Basso, L.C. (2020) Ethanol determination in fermented sugarcane substrates by a diffusive micro-distillation device. *Journal of Microbiological Methods* 178, 106085.
- Caldas, C. (2011) *Novo manual para laboratórios sucroalcooleiros*. 1 ed. Maceió: Moura Ramos, 697p.

Camargo, J.Z. (2013) Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na Região Centro-Oeste. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Dourados.

Canettieri, E.V., Silva, J.B.A. and Felipe, M.G.A. (2001) Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94, 159–168.

Carvalho, R.S., Cruz, I.A., Américo-Pinheiro, J.H.P., Soriano, R.N., Souza, R.L., Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Bharagava, R.N. and Ferreira, L.F.R. (2020) Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* during co-culture fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 29, 101756.

Ceccato-Antonini, S.R. and Covre, E.A. (2020) From baker's yeast to genetically modified budding yeasts: the scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. *Fems Yeast Research* 20, 8.

Chacón, S.J., Matias, G., Ezeji, T.C., Filho, R.M. and Mariano, A.P. (2021) Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation to produce butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* 321, 1-9.

Claassen, P.A.M., Van Lier, J.B., Lopez-Contreras, A.M., Van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., Weusthuis, R.A. (1999) Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 741-755.

Codato, C.B. (2013) Produção de etanol de 2 geração por *Dekkera bruxellensis* a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São Carlos, Araras.

Codato, C.B., Martini, C., Ceccato-Antonini, S. R. and Bastos, R.G. (2018) Ethanol production from *Dekkera bruxellensis* in synthetic media with pentose. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 35, 11-17.

Coote, N., Kirsop, B.H. (1976) Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *J. Inst. Brew.* 82, 149-153.

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M. and Arroyo, T. (2013) Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur Food Res Technol* 236,193–207.

Costa, M.A. de S.; Cerri, B.C.; Ceccato-Antonini, S.R. (2017) Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology* 65, 1-1.

Dhiman, S.S., David, A., Braband, V.W., Hussein, A., Salem, D.R. and Sani, R.K. (2017) Improved bioethanol production from corn stover: role of enzymes, inducers and simultaneous product recovery. *Applied Energy* 208, 1420-1429.

Dionísio, R., Santoro, D.C.J., Bonan, C.I.D.G., Soares, L.B., Biazi, L.E., Rabelo, S.C. and Ienczak, J.L. (2012) Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse, *Fuel* 304, 121290,

Farias, D. and Filho F.M. (2021) Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar. *Fuel* 288, 1-11.

Foureau, E., Courdavault, V., Rojas L.F., Dutilleul C, Simkin, A.J., Crèche, J., Atehortúa, L., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre M. and Papon, N. (2013) Efficient gene targeting in a *Candida guilliermondii* non-homologous end-joining pathway-deficient strain. *Biotechnol. Lett.* 35, 1035–1043.

Francischetti, G. (2017) Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar em sistema descontínuo alimentado. 83p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Girio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101, 4775-4800.

Gomes, F.C.O., Silva, C.L.C., Marini, M.M., Oliveira, E.S. and Rosa, C.A. (2007) Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2438–2447.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

Hans, M., Kumar, S., Chandel, A.K. and Polikarpov, I. (2019) A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation. *Process Biochem* 85, 125-134.

Hermansyah, Fachrijal, Miksusanti, Fatma, Kasmiarti, G. and Panagan, A.T. (2019) Xylose and arabinose fermentation to produce ethanol by isolated yeasts from durian (*Durio zibethinus* L.) fruit. *Molekul.* 14, 133–139.

Ingale, S., Joshi, S.J. and Gupte, A. (2014) Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 885-892.

Jahid, M., Gupta, A. and Sharma, D.K. (2018) Production of bioethanol from fruit wastes (banana, papaya, pineapple and mango peels) under milder conditions. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 8, 327.

Jansen, M.L.A., Bracher, J.M., Papapetridis, I., Verhoeven, M.D., de Bruijn, H., de Waal, P.P., van Maris, A.J.A., Klaassen, P., Pronk, J.T. (2017) *Saccharomyces cerevisiae* strains

for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res.* 17, fox044.

Karhumaa, K., Sanchez, R.G., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. (2007) Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 5, 6-5.

Khaliq, A.B., Achmad, C., Lukman, M. and Kholil, I. (2020) Making of bioethanol banana weevil as renewable energy. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* 722.

Kiipper, P.G. (2009) Estudo da pré-hidrolise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*. 100 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Mol. Evolu* 16, 111-120.

Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh, A., Zhang, Y.H.P. (2011) Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 15, 4950–4962.

Kuila, A., Sharma, V., Garlapati, V.K., Singh, A., Roy, L. and Banerjee, R. (2016) Present status on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Adv Biofeedstocks Biofuels* 1, 85.

Kunze, G., Petzoldt, C., Bode, R., Samsonova, I., Hecker, M. and Birnbaum, D. (1985) Transformation of *Candida maltosa* and *Pichia guilliermondii* by a plasmid containing *Saccharomyces cerevisiae* ARG4 DNA. *Curr. Genet.* 9, 205.

Kurtzman, C.P. (2010) *Meyerozyma Kurtzman* & M. Suzuki (2010). In *The Yeasts*, 5 ed. Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. pp. 621-624. Elsevier: London, UK.

Lara-Serrano, M., Sáez Angulo, F., Negro, M.A.J., Morales-dela Rosa, S., Campos-Martin, J.M. and Fierro, J.L. (2018) Second-generation bioethanol production combining simultaneous fermentation and saccharification of IL-Pretreated Barley Straw. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6, 7086–7095.

Lee, S.S., Robinson, F.M. And Wang, H.Y. (1981) Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 11, 641-649.

Lima, U. A., Basso, L. C., Amorim, H. V. Produção De Etanol. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquirone, E.; Borzani, W. (2001) (Ed.). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, 3. São Paulo: Editora Edgard Blucher.

Lopes, M.L., Paulillo, S.C.L., Godoy, A., Cherubin, R.A., Lorenzi, M.S., Giometti, F.H.C., Bernardino, C.D., Neto, H.B.A. and Amorim, H.V. (2016) Ethanol production in

Brazil: a bridge between science and industry. *Biotechnology And Industry Microbiology* 47, 64–76.

Lugani, Y., Rai, R., Prabhu, A.A., Maan, P., Hans, M., Kumar, V., Kumar, S., Chandel, A.K. and Sengar, R.S. (2020) Recent advances in bioethanol production from lignocelluloses: a comprehensive review with a focus on enzyme engineering and designer biocatalysts. *Biofuel Research Journal* 28, 1267-1295.

Martini, C., Tauk-Tornisielo, S.M., Codato, C.B., Bastos, R.G., Ceccato-Antonini, S.R. (2016) A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World J Microbiol Biotechnol* 32, 80.

Martini, C.; Tauk-Tornisielo M.; Codato, C. B.; Bastos, R. G.; Ceccato-Antonini, S. R. (2016) A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and fermentation pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World Journal Microbiology Biotechnology* 32, 1 – 9.

Martins, L.H.S., Neto, J.M., Gomes, P.W.P., Oliveira, J.A.R., Penteadó, E.D. and Komesu, A. (2019) Potential feedstocks for second-generation ethanol production in Brazil, *In: A. Kuila (Ed.), Sustainable Biofuel and Biomass Advances and Impacts*, p. 822. New York Imprint Apple Academic Press.

Maxwell, G.R.S., Akpan, E.G., Anna, O.O., Nennaya, I.R., Josiah, H. and Ogbe, S.B. (2017) Preliminary Analysis of Sugar Supplementation on Alcoholic Fermentation by *Meyerozyma guilliermondii*, *Ecology and Evolutionary Biology* 2, 68-77.

Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 , 426–428.

Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabael, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M. and Ardjmand, M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pre-treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 77–93.

Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, O.F., Dornelas, M.C. and Mazzafera, P. (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 360–376.

Moutta, R., Silva, M., Corrales, R., Cerullo, M., Ferreira-Leitao, V. and Bon, E. (2013) Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 01.

Nascimento, V.M. and Fonseca, G. G. (2019) Effects of the carbon source and the interaction between carbon sources on the physiology of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 50, 349-356.

- Nascimento, V.M.; Fonseca, G.G. (2019) Effects of the carbon source and the interaction between carbon sources on the physiology of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50, 349-356.
- Oonkhanond, B., Jonglertjanya, W., Srimarut, N., Bunpachart, P., Tantinukul, S., Nasongkla, N. and Sakdaronnarong, C. (2017) Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and ex-situ nanofiltration. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 2533–2541.
- Padilha, C.E.A., Nogueira, C.C., Oliveira Filho, M.A., Sousa Júnior, F.C., Assis, C.F., Souza, D.F.S., Oliveira, J.A. and Santos, E.S. (2020) Fractionation of green coconut fiber using sequential hydrothermal/alkaline pre-treatments and Amberlite XAD-7HP resin. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7, 103474,
- Perna, M., Bastos, R.G. and Ceccato-Antonini, S.R. (2018) Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *3 Biotech* 8, 119.
- Perna, M.S.C., Bastos, R.G. and Ceccato-Antonini, S.R. (2018) Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *3 Biotech* 8, 119.
- Prudente, A. S. (2004) Transgênicos, biossegurança o Princípio da Precaução. *Revista CEJ*, 5, 11–18.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R.Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M.R. and Thevelein, J.M. (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research* 15, 1 – 13.
- Ribeiro, C.A.F. and Horii, J. (1999) Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. *Scientia Agricola* 56, 255-263.
- Ribeiro, I. G.; Marin, V. A. A (2000) A falta de informação sobre os Organismos Geneticamente Modificados no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, 17, 359 – 368.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sato, T.K., Tremaine, M., Parreiras, L.S., Hebert, A.S., Myers, K.S., Higbee, A.J., Sardi, M., McIlwain, S.J., Ong, I.M., Breuer, R.J., Avanasí, N.R., McGee, M.A., Dickinson, Q., La Reau, A., Xie, D., Tian, M., Reed, J.L., Zhang, Y., Coon, J.J., Hittinger, C.T., Gasch, A.P. and Landick, R. Directed evolution reveals unexpected epistatic interactions that alter metabolic regulation and enable anaerobic xylose use by *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 2016;12:e1006372.

Schmidt, L.M., Mthembu, L.D., Reddy, P., Deenadayalu, N., Kaltschmitt, M. and Smirnova, I. (2017) Levulinic acid production integrated into a sugarcane bagasse based biorefinery using thermal-enzymatic pretreatment. *Industrial Crops and Products* 99, 172–178.

Schutyser, W., Renders, T., Van den Bosch, S., Koelewijn, S.F., Beckham, G.T., Sels, B.F. (2018) Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chemical Society Reviews* 47, 852–908.

Silva, C.A.A. (2017) Fisiologia de 15 leveduras em diferentes condições de cultivo. 2017. 148 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

Silva, C.A.A., Oka, M.L. and Fonseca, G.G. (2019) Physiology of yeast strains isolated from Brazilian biomes in a minimal medium using fructose as the sole carbon source reveals potential biotechnological applications. *3 Biotech* 9, 191.

Silva, F.A.S. and Azevedo, C.A.V. (2009) Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: *WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE*, 7., 2009, Reno. Proceedings... St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Silva, H.J.T., Santos, P.F.A., Nogueira Junior, E.C. and Vian, C.E.F. (2020) Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. *Revista Política Agrícola*, 29, 142-159. Disponível em: <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/1567/pdf>.

Song, Y., Li, Q., Zhao, X., Sun, Y. and Liu, D. (2012) Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse. *BioResources*, 7, 4517–4530. Disponível em: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/production-of-23-butanediol-by-klebsiella-pneumoniae-from-enzymatic-hydrolyzate-of-sugarcane-bagasse/>.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular and Evolution* 30, 2725-2729.

Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., Ogawa, J. and Shima, J. (2012) Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *Springer Plus* 1, 1-7.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Ac Res* 24, 4876-4882.

Valinhas, R.V., Pantoja, L.A., Maia, A.C.F., Miguel, M.G.C.P., Vanzela, N.P.F.C., Nelson, D.L. and Santos, A.S. (2018) Xylose fermentation to ethanol by new *Galactomyces geotrichum* and *Candida akabanensis* strains. *PeerJ* 6, 1-16.

Valois, A. C. C. (2016) O princípio da precaução em OGMs e recursos genéticos. Revista RG News, 2, 40-42.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J. P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration an alcoholic fermentation. *Yeast*. 8, 501–517.

Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S. and Patil, S. (2014) Bioethanol proudction: Feedstock and current technologies. *J Environ Chem Eng* 2, 573–84.

Warda, A.K., Sieze, R.J., Boekhorst, J., Wells-Bennik, M.H.J., Jong, A., Kuipers, O.P., Groot, M.N.N. and Abee, T. (2016) Linking *Bacillus cereus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Capacity. *PLoS ONE* 11, e 0156796.

Wei. N., Quarterman, J., Kim, S.R., Cate, J.H.D. and Jin, Y. (2013) Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. *Nat Commun* 4, 2580.

Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N. and Faruq, G. (2017) Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev* 71, 475–501.

Zakir, H., Hasan, M., Shahriar, S., Ara, T. and Hossain, M. (2016) Production of biofuel from agricultural plant wastes: corn stover and sugarcane bagasse. *Chemical Engineering and Science* 4, 5-11.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL

Em relação aos experimentos aplicados destaca-se:

A temperatura foi um fator limitante para o isolamento dos micro-organismos, pois houve crescimento de micro-organismo somente à 30 °C.

O meio de cultura proposto (Mosto-Ágar) se mostrou eficiente, pois houve desenvolvimento de dois micro-organismos (MSL1 e MSL2), sendo estes os únicos micro-organismos que apresentaram capacidade de assimilação e fermentação para xilose.

Um dos fatores de destaque do atual trabalho é a bioprospecção dos micro-organismos, pois se obteve uma taxa de 25% de sucesso no isolamento de micro-organismos fermentadores de xilose.

Dos 8 micro-organismos isolados somente dois foram submetidos a identificação molecular, sendo a MSL1 no qual apresentou 100% compatibilidade com a levedura *Meyerozyma guilliermondii* e o MSL2 que não foi possível a identificação a nível de espécie somente gênero, apresentando similaridade com a bactéria *Bacillus sp.*

Embora a levedura *M. guilliermondii* MSL1 ser um micro-organismos estudado o atual trabalho foi de fundamental importância para o entendimento do comportamento da levedura.

Vale destacar também que o potencial no qual a *M. guilliermondii* MSL1 apresentou nas fermentações em mosto e principalmente em hidrolisado, pois a levedura apresentou uma boa produção de etanol, sendo superior a produção da *S. cerevisiae* CAT-1, nas fermentações em hidrolisado.

ANEXO I

Normas utilizadas no artigo do capítulo 3 publicado pela *Editor Atena*.

Diretrizes para autores, link de acesso:

https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2019/10/Instru%C3%A7%C3%B5es-aos-Autores_Atena-Editora-7.pdf