



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ADRIANA BERTO DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
LEVEDURAS DA CANA-DE-AÇÚCAR**

**AREIA**  
**2024**

**ADRIANA BERTO DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
LEVEDURAS DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal da Paraíba, como  
requisito para a obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Loise Araujo Costa

**AREIA**

**2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586c Silva, Adriana Berto da.

Caracterização e avaliação do potencial  
biotecnológico de leveduras da cana-de-açúcar / Adriana  
Berto da Silva. - Areia:UFPB/CCA, 2024.

32 f. : il.

Orientação: Loise Araujo Costa.

TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Ciências Biológicas. 2. Fermentação. 3.  
Termotolerância. 4. Resistência a inibidores. I. Costa,  
Loise Araujo. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 573(02)

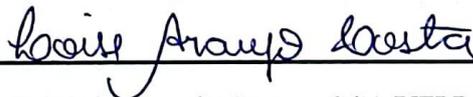
ADRIANA BERTO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DE LEVEDURAS DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal da Paraíba,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

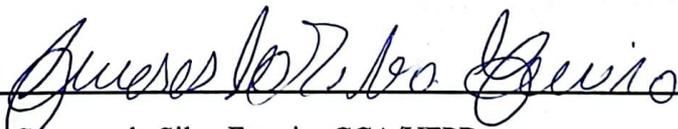
Aprovado em: 14/05/2024.

**BANCA EXAMINADORA**



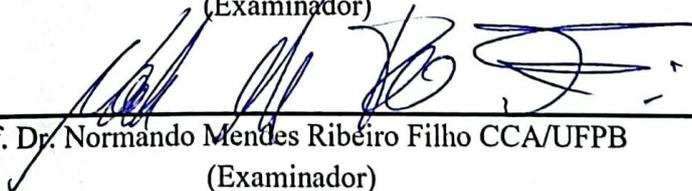
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Loise Araujo Costa – CCA/UFPB  
(Orientadora)



---

Dr. Geneses da Silva Ferreira CCA/UFPB  
(Examinador)



---

Prof. Dr. Normando Mendes Ribeiro Filho CCA/UFPB  
(Examinador)

AREIA, PB

2024

Dedico este trabalho aos meus filhos Vanderson Henrique, Thiago Henrique e Adrielly Maria, meus três amores, por toda compreensão pelos momentos que fui ausente e por todo apoio. Saibam que foram minha fortaleza nos momentos de fraqueza e um dos motivos por ter seguido em frente, por isso, dedico a vocês essa conquista.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me conceder saúde, inteligência, perseverança, fé e força para lutar contra todos os obstáculos enfrentados, que não foram poucos, e conquistar o meu objetivo, a conclusão deste curso.

Agradeço a todos da minha família, por todo apoio que recebi.

Agradeço mais uma vez a meu cunhado Antônio, por todas as vezes que tirei seu sossego e por sua disposição em sempre me ajudar.

Agradeço por todos os professores que fizeram parte da minha vida acadêmica, em especial a professora e orientadora Loise Costa.

Agradeço ao Geneses e Edinaldo, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biociências; e a Maria Clara, do Laboratório de Produtos Agropecuários do Departamento de Solos e Engenharia Rural, por todo acompanhamento, esclarecimentos e aprendizados que me foi passado, durante o período do experimento, e por toda paciência também.

Agradeço aos laboratórios de Biologia Molecular e de Invertebrados, por toda contribuição no decorrer desta pesquisa.

Agradeço ao professor Normando, por ter me proporcionando esta experiência desafiadora ligada as leveduras.

Agradeço à UFPB, pelo oferecimento do curso de Ciências Biológicas, e todas as oportunidades oferecidas.

Enfim, agradeço de coração a todos que fizeram parte de mais esta etapa da minha vida, de forma direta ou indireta.

*“A ciência não pode prever o que vai acontecer. Só pode prever a probabilidade de algo acontecer.”*

*César Lattes*

## RESUMO

As leveduras encontradas durante a fermentação do caldo da cana-de-açúcar, ainda são pouco conhecidas em relação ao potencial biotecnológico que possuem. Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfologicamente leveduras isoladas do mosto da cana-de-açúcar além de avaliar a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas, fontes de carbono e concentrações de ácido acético e etanol, bem como a produção de sulfeto de hidrogênio. Sete leveduras foram reativadas e caracterizadas macro e micro morfologicamente. Para o teste de crescimento em diferentes temperaturas, as leveduras foram inoculadas em meio YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Agar*) e incubadas à 4°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C e 40°C. Para a avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono, foi utilizado o meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) + fonte de carbono específica (frutose, sacarose, maltose, galactose, lactose e xilose). O teste de produção de sulfeto de hidrogênio em meio específico, denominado de LA, foi realizado. A tolerância das leveduras à ácido acético e etanol foi conduzido às concentrações de 10, 15 e 20%, durante 72h, à 30°C; o crescimento e crescimento efetivo foram avaliados a partir das medições de absorbância a 600 nm nos tempos 0 e 72h no espectrofotômetro. As leveduras apresentaram similaridades morfológicas quanto a elevação e cor branca, e diferenças morfológicas quanto a forma, margens, superfície, diâmetro e tamanho das colônias. Na caracterização micromorfológica foram observadas células elipsoidal, subglobosa e oval podendo apresentar formação de pseudohifas, nas leveduras A e E. Todas as leveduras obtiveram uma taxa de crescimento satisfatória nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C. À 37°C apenas as leveduras A, B e D cresceram bem e à 40°C apenas as leveduras B e D. Todas as leveduras cresceram na presença de frutose. As leveduras A, B, D e G cresceram usando sacarose, galactose, lactose e xilose como fontes de carbono. As leveduras A, D, E e F não apresentaram formação de sulfetos de hidrogênio. Apenas a levedura C apresentou crescimento celular nas três concentrações de ácido acético (10%, 15%, 20%), enquanto, para o teste de etanol, apenas a levedura B apresentou crescimento celular na concentração de 20%. Das sete leveduras utilizadas no estudo, as que mais se destacaram na maioria das etapas, foram as cepas A, B e D. Estes resultados indicam um possível potencial biotecnológico de leveduras isoladas do mosto, entretanto mais estudos precisam ser conduzidos.

**Palavras chaves:** fermentação; termotolerância; resistência a inibidores.

## ABSTRACT

The yeasts found during the fermentation of sugarcane juice are still little known in relation to their biotechnological potential. In this perspective, the present work aimed to morphologically characterize yeasts isolated from sugarcane must and to evaluate the growth capacity at different temperatures, carbon sources and concentrations of acetic acid and ethanol, as well as the production of hydrogen sulfide. Seven yeasts were reactivated and characterized macro and micromorphologically. For the growth test at different temperatures, the yeasts were inoculated in YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) and incubated at 4°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C and 40°C. To evaluate growth on different carbon sources, YPD (Yeast Peptone Dextrose) + specific carbon source (fructose, sucrose, maltose, galactose, lactose and xylose) were used. For the hydrogen sulfide production test, a specific medium called LA was used. To verify the tolerance of yeasts to acetic acid and ethanol, concentrations of 10, 15 and 20% were used and after 72h of incubation, growth and effective growth were evaluated based on absorbance measurements at 600 nm at times 0 and 72h in the spectrophotometer. The yeasts showed morphological similarities in terms of elevation and white color, and morphological differences in terms of shape, margins, surface, diameter and size of the colonies. In the micromorphological characterization, ellipsoidal, subglobose and oval cells with pseudohypha formation were observed in yeasts A and E. All yeasts showed a satisfactory growth rate at temperatures of 15°C, 20°C and 30°C. At 37°C only yeasts A, B and D grew well and at 40°C only yeasts B and D did. All yeasts grew in the presence of fructose. Yeast A, B, D and G grew using sucrose, galactose, lactose and xylose as carbon sources. Yeasts A, D, E and F did not show formation of hydrogen sulfides. Only yeast C showed cell growth in the three concentrations of acetic acid (10%, 15%, 20%), while, for the ethanol test, only yeast B showed cell growth at a concentration of 20%. Of the seven yeasts used in the study, yeasts A, B and D stood out in most stages. These results indicate a possible biotechnological potential of yeasts isolated from must, however more studies need to be conducted.

**Key words:** fermentation; thermotolerance; resistance to inhibitors.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Preparação de placas de petri utilizando a técnica do *spot plate*. L1=levedura 1, L2=levedura 2, L3=levedura 3 e L4=levedura 4.....16
- Figura 2** - Características morfológicas das leveduras isoladas da cana-de-açúcar. A, Visão geral da colônia da levedura A. B, Célula elipsoidal com brotamento multilateral da levedura A e formação de pseudohifa. C, Visão geral da colônia da levedura B. D, Célula elipsoidal com brotamento polar da levedura B. E, Visão geral da colônia da levedura C. F, Célula elipsoidal com brotamento multilateral da levedura C. G, Visão geral da colônia D. H, Célula oval com brotamento polar da levedura D. I, Visão geral da levedura E. J, Célula elipsoidal apresentando brotamento multilateral da levedura E com formação de pseudohifa. L, Visão geral da levedura F. M, Célula subglobosa com brotamento bipolar da levedura F. N, Visão geral da colônia da levedura G. O, Célula subglobosa com brotamento multilateral da levedura G. As barras nas imagens das colônias representam 0,5mm (A, C, E, G, I e L) e 1mm (N).....20
- Figura 3** - Capacidade de crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em diferentes temperaturas. (A) Temperatura de 4°C. (B) Temperatura de 15°C. (C) Temperatura de 20°C. (D) Temperatura de 25°C. (E) Temperatura de 30°C. (F) Temperatura de 37°C. (G) Temperatura de 40°C .....21
- Figura 4** - Capacidade de crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em diferentes fontes de carbono. (A) Frutose. (B) Sacarose. (C) Maltose. (D) Galactose. (E) Lactose. (F) Xilose.....23
- Figura 5** - Crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em ágar LA e YPDA para a observação de produção de sulfeto de hidrogênio. (A) Levedura A. (B) Levedura B. (C) Levedura C. (D) Levedura D. (E) Levedura E. (F) Levedura F. (G) Levedura G.....25
- Figura 6** - Crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em presença de ácido acético e etanol. A. Crescimento de leveduras na presença de 10, 15 e 20% de ácido acético. B. Crescimento de leveduras na presença de 10, 15 e 20% de etanol. C. Crescimento efetivo das leveduras na presença de 10, 15 e 20% de ácido acético. D. Crescimento efetivo das leveduras na presença de 10, 15 e 20% de etanol.....26

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Amostras da cana-de-açúcar utilizadas para o isolamento de leveduras.....	14
<b>Tabela 2</b> - Características macromorfológicas das colônias de leveduras isoladas de diferentes variedades de cana-de-açúcar.....	18
<b>Tabela 3</b> - Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas das leveduras isoladas da cana-de-açúcar .....	21
<b>Tabela 4</b> - Capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono das leveduras isoladas da cana-de-açúcar .....	22

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Meios de cultura.....	13
2.2 Leveduras utilizadas no estudo .....	13
2.3 Reativação e purificação das leveduras .....	14
2.4 Preparo do inóculo.....	15
2.5 Caracterização morfológica das leveduras.....	15
2.6 Técnica do <i>spot plate</i> .....	16
2.7 Teste de temperatura.....	16
2.8 Teste de assimilação de carbono.....	16
2.9 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S).....	17
2.10 Teste de resistência ao etanol e ácido acético .....	17
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
3.1 Reativação, purificação e caracterização morfológica das leveduras.....	17
3.2 Teste de Temperatura .....	20
3.3 Assimilação das fontes de carbono .....	22
3.4 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S) .....	24
3.5 Teste de resistência à etanol e ácido acético .....	25
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>
APÊNDICE 1 – Crescimento, crescimento efetivo e tolerância de leveduras isoladas da cana-de-açúcar. Testes realizados na presença de Ácido acético e etanol nas concentrações de 10, 15 e 20% .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos eucarióticos e unicelulares que pertencem ao Reino Fungi. Tais microrganismos não são um grupo filogenético, mas representam a forma de crescimento unicelular dos fungos que ocorrem nos filos *Murocomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, com os dois últimos filos abrigando a maioria das leveduras (Alexopoulos, 1996; Dzurendova et al., 2021). Apresentam características típicas, como presença de parede celular rígida composta por quitina e beta-glucano, glicogênio como fonte de reserva, forma celular oval ou redonda, não apresentam corpos de frutificação, ausência de motilidade e de pigmentos fotossintéticos, além da capacidade de reprodução assexuada, por brotamento ou fissão, e sexuada, por meio da fusão de duas células haplóides e compatíveis sexualmente (Kurtzman & Fell, 1998).

Estão presentes em vários ambientes como o ar, solo e nos diversos ecossistemas aquáticos - desde rios, lagos e mares – além de manterem interações com outros organismos (p.ex. plantas, outros fungos, animais, algas, entre outros) como mutualistas, parasitas e comensais (Péter et al., 2017). Ambientes extremos com baixo potencial hídrico (alta concentração de açúcar ou sal) e temperatura baixa também podem ser habitados por leveduras, sendo encontradas no ar estratosférico, fontes termais, mares frios e profundos, terras polares, geleiras, desertos, habitats ácidos e alcalinos, ambientes secos, rochas, entre outros (Starmer et al., 2011; Segal-Kischinevzky et al., 2022). As leveduras são principalmente decompositoras de vida livre, que ajudam a acelerar vários processos fundamentais nos ecossistemas, como a decomposição da matéria orgânica, a geração de biomassa como fonte de nutrientes para outros organismos e a mineralização de nutrientes, além de participarem nos ciclos de nitrogênio e enxofre (Starmer et al., 2011; Péter et al., 2017).

As leveduras realizam a fermentação, processo natural no qual converte açúcares em produtos que podem ser úteis aos seres humanos (Araújo, 2015). A fermentação é um dos mais antigos bioprocessos relatados na História da humanidade, apresentando registro histórico que inicia em 10.000 a.C. Por volta de 5.000 anos a.C. os sumérios e os egípcios já produziam muitos alimentos por fermentação, como pão, vinho e cerveja. Entretanto, as primeiras descobertas com relação às leveduras surgiram somente a partir de estudos realizados por Louis Pasteur, no século XIX, ao descobrir, na composição do vinho em fermentação, a existência de tais microrganismos. A partir desse momento foi estabelecido o elo entre as leveduras, como microrganismos vivos, e a conversão de açúcar em álcool (White & Zainasheff, 2020).

No decorrer do século, os estudos sobre as leveduras foram intensificando-se, cada vez mais, devido à sua alta capacidade fermentativa e crescimento rápido, assim como, a busca por novos agentes biotecnológicos (Phaff & Starmer, 1987). Até os dias atuais os setores de panificação e produção de bebidas alcoólicas têm sido uma das áreas mais exploradas no uso das leveduras, embora, mais recentemente, as leveduras têm sido bastante utilizadas na produção de enzimas que são extensivamente aplicadas como biocatalisadores na indústria de alimentos e bebidas, farmacêutica, de biocombustíveis, cosméticos, agroquímicos, têxtil, de papel e oleoquímicos (Araújo, 2015; Segal-Kischinevzky et al., 2022). As leveduras são economicamente importantes pois apresentam elevada taxa de síntese de macromoléculas além do reduzido potencial patogênico (Araújo, 2015).

Apesar desse grande potencial biotecnológico das leveduras, poucas espécies são exploradas economicamente, entre elas, têm-se as espécies do gênero *Saccharomyces* tais como *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (Shurson, 2018). Estima-se que apenas 1% de todas as espécies de leveduras existentes tenha sido descrita até o momento (Mohd Azhar et al., 2017), o que representa aproximadamente 1.500 espécies. A estimativa para o número global de espécies de leveduras é de 150.000 (Barriga et al., 2011). Esse cenário abre uma perspectiva para estudos com leveduras presentes em diversos ambientes com a possibilidade de descoberta de novas espécies ou novas linhagens com potencial industrial. Considerando as leveduras associadas à fermentação da cana-de-açúcar, os estudos são escassos e fragmentados, mesmo o Brasil sendo um dos grandes produtores dessa cultura.

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), pertencente à família das gramíneas (Poaceae), tem presença essencial na economia mundial e impacto significativo na malha econômica brasileira (Rocha, 2022), pois o setor sucroalcooleiro é responsável por 2% do produto interno bruto (PIB) nacional, seja para a produção de açúcar ou de álcool (etanol) como para a exportação desses produtos (Lima et al., 2022). O estado da Paraíba tem como principal cultura a cana-de-açúcar, e esta possui uma grande importância na economia local (Silva et al., 2020), principalmente, com produção de cachaça, que é uma das bebidas mais consumidas no Brasil, ficando atrás apenas da cerveja. A Paraíba está entre os maiores produtores de cachaça do Brasil, com cerca de 12 a 13 milhões de litros por safra (Silva, 2017). Apesar da grande produtividade, ainda há espaço para melhorias no setor com a utilização de novas linhagens de leveduras que podem aumentar a eficiência da fermentação.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente leveduras presentes no mosto da cana-de-açúcar e verificar a capacidade de crescimento em

diferentes temperaturas, fontes de carbono e concentrações de ácido acético e etanol, bem como a produção de sulfeto de hidrogênio.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Meios de cultura

Todos os meios utilizados para a realização do presente trabalho foram devidamente preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Para o crescimento das leveduras foi utilizado a estufa incubadora BOD com a temperatura ajustada de acordo ao experimento.

- *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) - 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de D-glicose.
- *Yeast Peptone Dextrose Agar* (YPDA) - 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de D-glicose, 2% ágar.
- *Yeast Peptone Agar* (YPA) + fonte de carbono específica - 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de ágar, 2% da fonte de carbono específica. Este meio foi utilizado no teste de assimilação de carbono, sendo testado cinco açúcares específicos.
- Ágar LA - 0,5% de extrato de levedura, 0,3% de peptona, 4% de D-glicose, 0,02% de sulfato de amônio, 0,1% de acetato de chumbo neutro, 2% de ágar.

### 2.2 Leveduras utilizadas no estudo

O presente trabalho foi iniciado em outubro de 2021 utilizando leveduras obtidas de uma pesquisa realizada no ano de 2019, no Laboratório de Produtos Agropecuários do Departamento de Solos e Engenharia Rural (CCA/UFPB), e que foram preservadas pelo método de congelamento, a -80°C, com adição do glicerol (Abreu & Tutunji, 2004).

As leveduras foram isoladas do mosto de dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em um experimento de longa duração na Fazenda Experimental Chã de Jardim, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA-UFPB), no município de Areia-PB. Os colmos das canas-de-açúcar foram divididos em duas partes, superior (metade do colmo para cima) e inferior (metade do colmo para baixo), totalizando 20 amostras (Tabela 1). O caldo de cada parte das variedades da cana-de-açúcar foi extraído, individualmente, utilizando uma moenda (B120, Motor Elétrico 2cv Monofásico Correia e Chave). Após a extração do caldo foi realizado o isolamento das leveduras pela técnica de semeadura por

esgotamento em superfície, utilizando o meio de cultura YPDA, e, então, as placas foram incubadas em estufa BOD à temperatura de 30°C por 96h. Todas as amostras apresentaram crescimento e após verificação da pureza das leveduras foi realizada a preservação. O total de 20 leveduras foi obtido e todas elas foram investigadas no presente trabalho.

**Tabela 1.** Amostras da cana-de-açúcar utilizadas para o isolamento de leveduras

<b>Variedade da cana-de-açúcar</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Número de leveduras</b>
Variedade 1	Superior	212/S
	Inferior	212/I
Variedade 2	Superior	509/S
	Inferior	509/I
Variedade 3	Superior	1011/S
	Inferior	1011/I
Variedade 4	Superior	1443/S
	Inferior	1443/I
Variedade 5	Superior	1541/S
	Inferior	1541/I
Variedade 6	Superior	1754/S
	Inferior	1754/I
Variedade 7	Superior	2162/S
	Inferior	2162/I
Variedade 8	Superior	2506/S
	Inferior	2506/I
Variedade 9	Superior	2754/S
	Inferior	2754/I
Variedade 10	Superior	3129/S
	Inferior	3129/I
<b>TOTAL</b>		
10 variedades	20 amostras	20 leveduras

A presente pesquisa foi realizada em três etapas distintas: (1) reativação das leveduras preservadas em 2019; (2) purificação dos isolados e observação ao microscópio óptico para a confirmação da pureza e caracterização morfológica; e (3) realização dos testes bioquímicos com as leveduras viáveis.

### **2.3 Reativação e purificação das leveduras**

Para a reativação das leveduras, inicialmente foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo YPD, e incubadas em estufa BOD à 28°C por 48h. Após esse período, e atestado o crescimento das leveduras, as mesmas foram transferidas para placas de petri, contendo o meio YPDA e novamente incubadas, em estufa BOD, à 28°C por mais 48h. A purificação das

culturas foi realizada por meio de repiques sucessivos utilizando o meio YPDA. Após o período de incubação o crescimento das leveduras na superfície do meio de cultura sólido foi observado além da visualização microscópica para atestar a pureza das culturas.

#### **2.4 Preparo do inóculo**

Inicialmente as leveduras viáveis foram cultivadas em YPDA em temperatura à 28°C por 24h. Após esse período foi realizada a diluição da suspensão de células de leveduras utilizando o padrão 4 da escala nefelométrica de MacFarland (com aproximadamente  $12 \times 10^8$  cel./mL) (Souza, 2018) para a preparação do inóculo. Este inóculo foi utilizado para as etapas da caracterização morfológica das leveduras e da técnica de *spot plate* para os testes de temperatura e de assimilação de carboidratos.

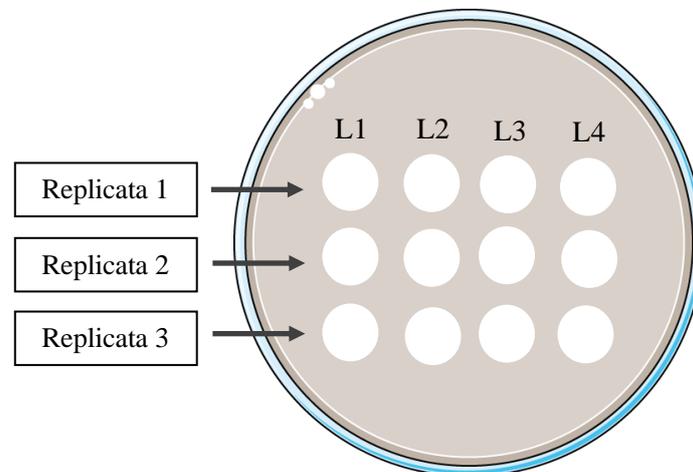
#### **2.5 Caracterização morfológica das leveduras**

Partindo do inóculo foi feita uma diluição seriada para a obtenção de colônias isoladas, pois a partir destas que a caracterização macromorfológica das leveduras deve ser realizada (Kurtzman et al., 2011). A diluição seguiu a metodologia apresentada em Tortora et al. (2012), e na diluição  $10^{-3}$  uma alíquota de 100µL foi transferida para a superfície do meio de cultura YPDA para o plaqueamento. As placas foram incubadas na estufa BOD à temperatura de 28°C por 48h. Após o crescimento das colônias, as leveduras foram observadas no contador de colônia (Phoenix, CP 600 plus) e analisadas quanto ao diâmetro (grande – 5mm, média – 2 a 5mm e pequena – 2mm), forma (circular, irregular, rizóide, filamentosa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa), margem (lisas, laceradas, lobadas, filamentosas ou onduladas), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida ou opaca) e cor (incolor, branca ou pigmentada) (Kurtzman et al., 2011). As imagens das colônias foram obtidas a partir do Estereomicroscópio Discovery V20 Zeiss.

Para a caracterização micromorfológica, lâminas foram confeccionadas em ácido láctico, observadas ao Microscópio de Interferência Olympus BX53 e caracterizadas segundo *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (Kirk et al., 2008). As lâminas foram fotografadas utilizando a câmara Moticam 2500 e software Moticam 2.0.

## 2.6 Técnica do *spot plate*

Com o inóculo na concentração desejada, para cada uma das leveduras, alíquotas de 10 µL foram distribuídas, em triplicatas, na superfície do meio YPDA (Figura 1). Após o procedimento, as placas foram incubadas nas temperaturas e períodos determinados para os testes de temperatura e de assimilação de carboidrato, os quais serão apresentados a seguir.



**Figura 1.** Preparação de placas de petri utilizando a técnica do *spot plate*.  
L1=levedura 1, L2=levedura 2, L3=levedura 3 e L4=levedura 4.

## 2.7 Teste de temperatura

Para o teste da temperatura as leveduras foram inoculadas, a partir do inóculo inicial, em YPDA utilizando a técnica de *spot plate* e foram incubadas à 4°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C e 40°C, durante 96h. As imagens foram capturadas em uma incubadora escura sob luz ultravioleta Loccus Biotecnologia modelo L-Pix Chemi utilizando o software de análise L-Pix Image Chemi.

## 2.8 Teste de assimilação de carbono

Para a observação do crescimento das leveduras em diferentes fontes de carbono foram utilizados os seguintes carboidratos adicionados ao meio YP (*Yeast Peptone*) em uma concentração de 2%: xilose, maltose, lactose, galactose, frutose e sacarose. A técnica utilizada para este teste foi a de *spot plate* e após a inoculação das leveduras, a partir do inóculo inicial, as placas foram incubadas em uma temperatura de 25°C por 96h. As placas foram fotografadas em uma incubadora escura sob luz ultravioleta Loccus Biotecnologia modelo L-Pix Chemi utilizando o software de análise L-Pix Image Chemi.

## **2.9 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

Para a realização dessa etapa as leveduras foram inoculadas em ágar LA utilizando a técnica de semeadura por esgotamento, com estrias compostas. As placas foram incubadas na estufa BOD à temperatura de 30°C por um período de 10 dias. As leveduras que apresentaram uma coloração marrom foram consideradas produtoras de H<sub>2</sub>S e as que não apresentaram pigmentação foram consideradas não produtoras. O controle foi inoculado em meio YPDA. O teste foi realizado em triplicata. Após o crescimento os registros foram realizados utilizando a câmera SONY ALPHA A6100.

## **2.10 Teste de resistência ao etanol e ácido acético**

Para investigar a tolerância e capacidade de crescimento das leveduras em diferentes concentrações de etanol e ácido acético, utilizou-se o protocolo Michel (2017), com algumas adaptações. Em ambos os testes foram utilizados tubos de ensaio com o meio YPD acrescido de etanol e de ácido acético nas concentrações de 10%, 15% e 20%. Para o teste do etanol, o agente químico foi acrescido após o processo de esterilização do meio YPD. A calibração e determinação da concentração do inóculo,  $15 \times 10^6$  células de leveduras em suspensão, foi realizada utilizando a Câmara de Neubauer segundo a metodologia de Alfenas et al. (2007). A inoculação das leveduras ocorreu em triplicatas para cada concentração utilizada, em ambos os testes.

Após a inoculação os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 72h. Foram realizadas medições de absorvância a 600 nm nos tempos 0 e 72h no espectrofotômetro IL-593 KASUAKI para verificar o crescimento e o crescimento efetivo. Com base nos valores obtidos as leveduras foram classificadas em tolerante e não tolerante. Gráficos de barras foram construídos utilizando o software Microsoft Excel®.

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Reativação, purificação e caracterização morfológica das leveduras**

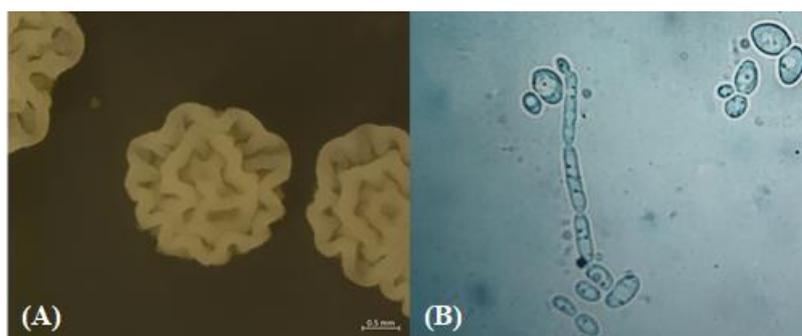
Durante o processo de reativação das leveduras nas placas de petri, foi possível observar o crescimento de outros microrganismos na superfície do meio YPDA, como bactérias e fungos filamentosos, tornando mais difícil e repetitivo o processo da purificação. Apenas sete leveduras apresentaram crescimento intenso dando prosseguimento ao trabalho com os testes

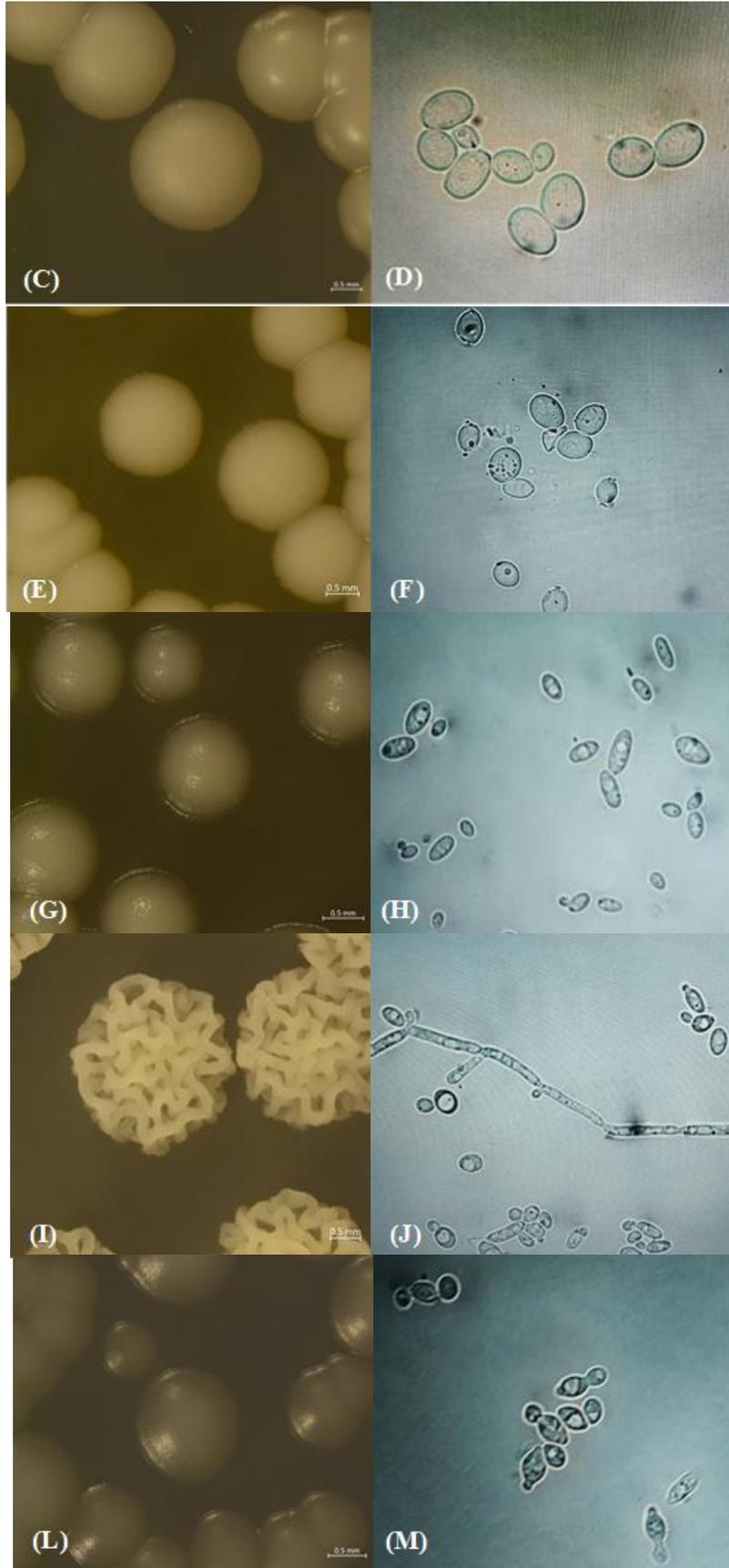
bioquímicos, sendo elas 2754/S, 1754/S, 2506/I, 3129/I, 1754/I, 3129/S e 2506/S, as quais foram designadas de A, B, C, D, E, F e G, respectivamente.

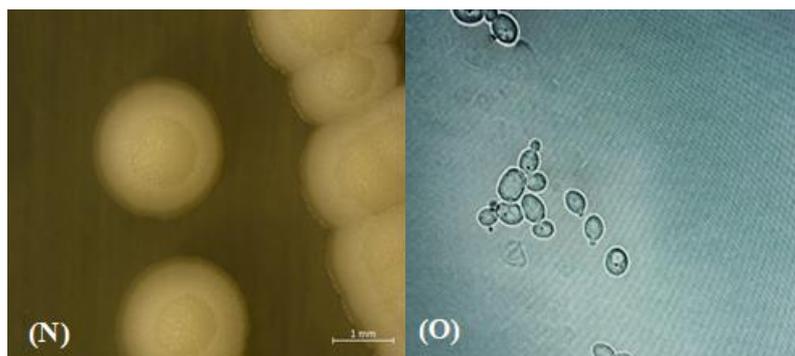
A maioria das leveduras (71,4%) apresentaram colônias de tamanho médio (diâmetro variando de 2 a 3 mm), forma circular com textura lisa e margem regular. Todas as leveduras apresentaram colônias com elevação convexa e coloração branca. O percentual de 85,7% das leveduras apresentou colônias com brilho opaco, com exceção da levedura F que foi translúcida. Com relação a caracterização micromorfológica, baseada em Kirk et al. (2008), as células leveduriformes apresentaram as formas elipsoidal (leveduras A, B, C e E), subglobosa (leveduras F e G) e oval (levedura D), além da formação de pseudohifas nas leveduras A e E. A formação de blastoconídios por brotamento também foi visualizada nas leveduras, que segundo Kurtzman et.al. (2011) apresentaram os seguintes tipos: brotamento polar sobre uma base estreita (leveduras B e D), brotamento multilateral (leveduras A, C, E e G) e brotamento bipolar sobre uma base larga (levedura F). A Tabela 2 e a Figura 2 apresentam as características morfológicas das leveduras estudadas.

**Tabela 2.** Características macromorfológicas das colônias de leveduras isoladas de diferentes variedades de cana-de-açúcar.

Leveduras	Tamanho (mm)	Forma	Textura	Cor	Margem	Elevação	Brilho
A	média (3)	irregular	rugosa	branca	ondulado	convexa	opaca
B	pequena (1,6)	circular	lisa	branca	regular	convexa	opaca
C	média (2,8)	circular	lisa	branca	regular	convexa	opaca
D	média (2)	circular	lisa	branca	regular	convexa	opaca
E	média (2,9)	irregular	rugosa	branca	ondulado	convexa	opaca
F	média (2,2)	circular	lisa	branca	regular	convexa	translúcida
G	pequena (1,9)	circular	lisa	branca	regular	convexa	opaca







**Figura 2.** Características morfológicas das leveduras isoladas da cana-de-açúcar. A, Visão geral da colônia da levedura A. B, Célula elipsoidal com brotamento multilateral da levedura A e formação de pseudohifa. C, Visão geral da colônia da levedura B. D, Célula elipsoidal com brotamento polar da levedura B. E, Visão geral da colônia da levedura C. F, Célula elipsoidal com brotamento multilateral da levedura C. G, Visão geral da colônia D. H, Célula oval com brotamento polar da levedura D. I, Visão geral da levedura E. J, Célula elipsoidal apresentando brotamento multilateral da levedura E com formação de pseudohifa. L, Visão geral da levedura F. M, Célula subglobosa com brotamento bipolar da levedura F. N, Visão geral da colônia da levedura G. O, Célula subglobosa com brotamento multilateral da levedura G. As barras nas imagens das colônias representam 0,5mm (A, C, E, G, I e L) e 1mm (N).

As leveduras A e E apresentaram as mesmas características morfológicas (colônias, células e tipo de brotamento), sendo isoladas da mesma parte vegetal, colmo superior, de diferentes variedades da cana-de-açúcar (Tabela 1).

### 3.2 Teste de Temperatura

Os resultados demonstram que todas as leveduras cresceram nas temperaturas de 15°C, 20°C e 30°C, por outro lado, nenhuma delas cresceu à 4°C (Tabela 3, Figura 3). As leveduras A, B e D cresceram na temperatura de 37°C; enquanto as leveduras C, E e F apresentaram pouco crescimento e a levedura G, nenhum crescimento. Na temperatura de 40°C apenas as leveduras B e D apresentaram crescimento satisfatório, por outro lado as leveduras A, C e E tiveram baixa capacidade de crescimento que, no entanto, não foi considerado no trabalho (Tabela 3, Figura 3).

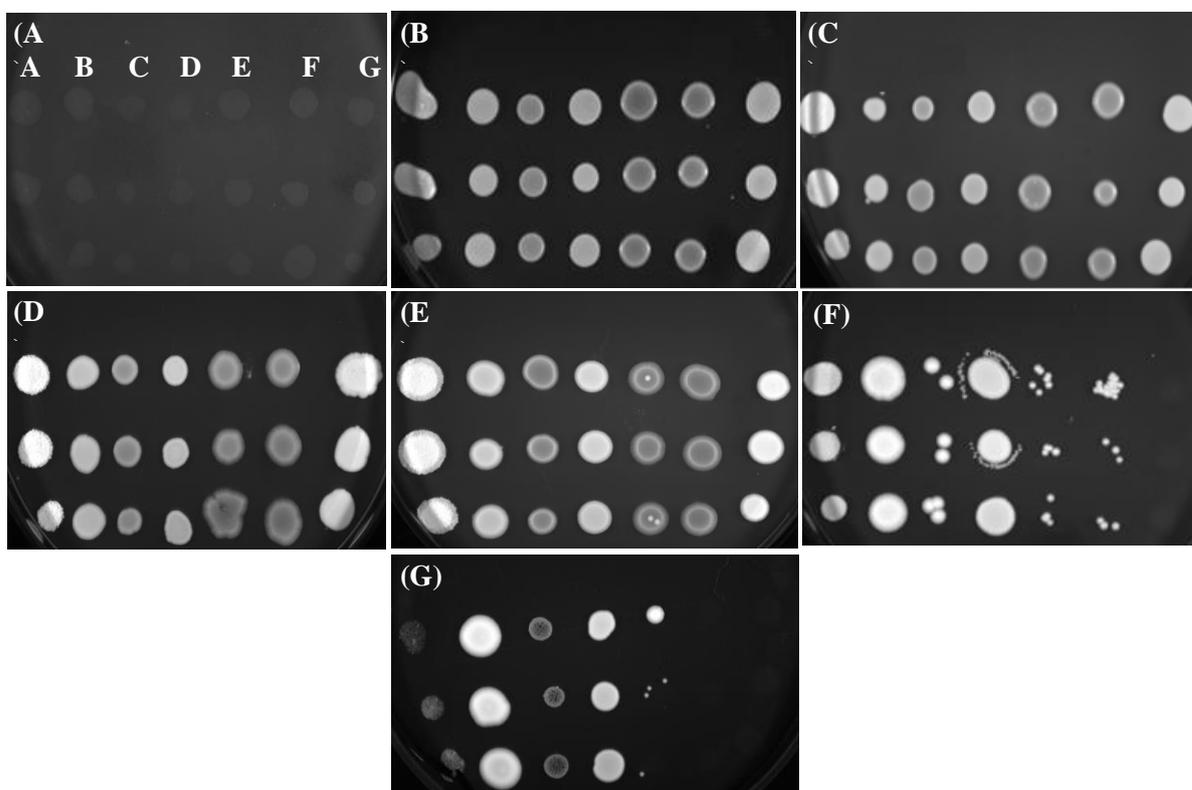
A temperatura é dos fatores que exerce grande influência no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos microrganismos, incluindo as leveduras, por desencadear efeitos nos processos celulares como a síntese de proteínas e atividade enzimática (Tai et al., 2007). A temperatura também é importante na manutenção da fluidez e produção da membrana, pois os fosfolipídios também são afetados pela mudança de temperatura (Feng et al., 2018). À medida que a temperatura diminui, há maior produção de lipídios na membrana, tornando-a

mais rígida, e quando a temperatura aumenta, a difusão ocorre a uma taxa aumentada (Tortora et al. 2012), devido a maior fluidez.

**Tabela 3.** Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas das leveduras isoladas da cana-de-açúcar

Temperaturas	Leveduras						
	A	B	C	D	E	F	G
4°C	-	-	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+
20°C	+	+	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-
40°C	-	+	-	+	-	-	-

(+) crescimento satisfatório, (+/-) pouco crescimento, (-) nenhum crescimento



**Figura 3.** Capacidade de crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em diferentes temperaturas. (A) Temperatura de 4°C. (B) Temperatura de 15°C. (C) Temperatura de 20°C. (D) Temperatura de 25°C. (E) Temperatura de 30°C. (F) Temperatura de 37°C. (G) Temperatura de 40°C.

Considerando processos industriais envolvendo leveduras, a temperatura é uma variável que influencia diretamente o processo fermentativo (Feng et al., 2018). Leveduras que

apresentam capacidade de crescimento em temperaturas mais elevadas são importantes para as indústrias, pois durante o processo de fermentação as leveduras produzem energia levando ao aumento da temperatura no sistema. Segundo De-Barros et al. (2023), linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que crescem a uma temperatura de 40°C são importantes em processos fermentativos que são conduzidos por um curto período (até 24h), pois a temperatura controlada de 28-32°C pode alcançar temperaturas superiores como 38°C.

### 3.3 Assimilação das fontes de carbono

Apenas na fonte de carbono frutose as leveduras cresceram satisfatoriamente (Tabela 4, Figura 4). Nas fontes de carbono sacarose, lactose e xilose, embora todas as leveduras tenham crescido, as leveduras C, E e F apresentaram um crescimento baixo. Na fonte de carbono maltose as leveduras A, B, D e G cresceram, no entanto, apenas em B e G foi satisfatório, e nenhum crescimento ocorreu para as leveduras C, E e F. As leveduras A, B, D e G cresceram satisfatoriamente na fonte de carbono galactose e, por outro lado, nenhum crescimento foi observado para as leveduras C, E e F (Tabela 4, Figura 4)

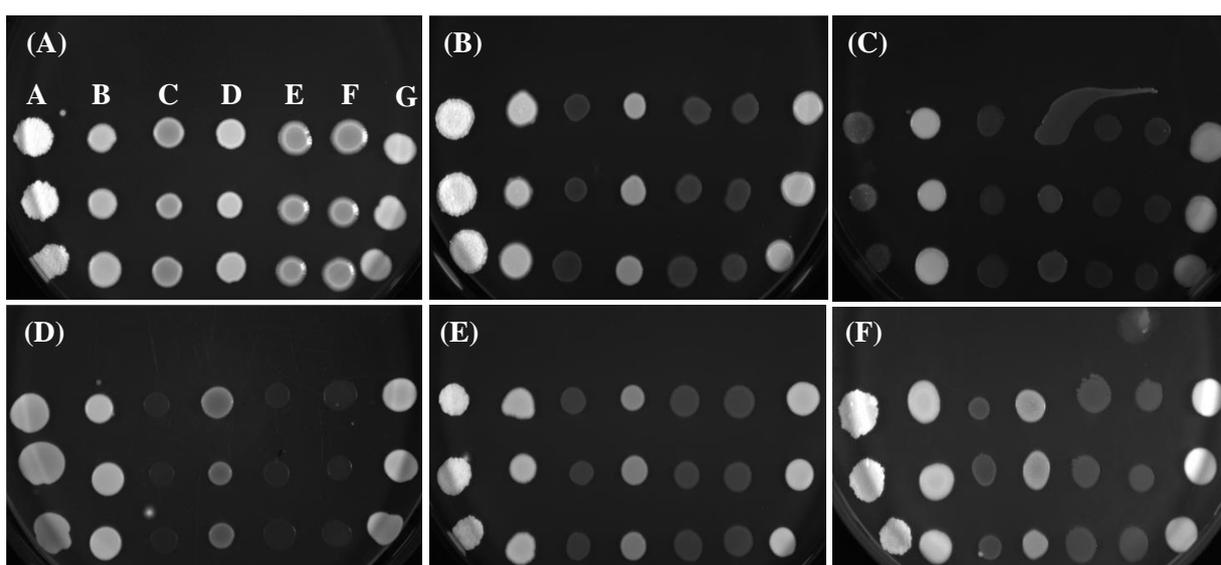
**Tabela 4.** Capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono das leveduras isoladas da cana-de-açúcar

Açúcares	Leveduras						
	A	B	C	D	E	F	G
<b>Frutose</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sacarose</b>	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+
<b>Maltose</b>	+/-	+	-	+/-	-	-	+
<b>Galactose</b>	+	+	-	+	-	-	+
<b>Lactose</b>	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+
<b>Xilose</b>	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+

(+) crescimento satisfatório, (+/-) pouco crescimento (-) nenhum crescimento

As leveduras crescem em uma variedade de fontes de carbono, incluindo monossacarídeos e dissacarídeos (Boulton & Quain, 2001; Galdieri et al., 2014), mas a glicose é a fonte preferida de carbono e energia (Rolland et al., 2002). As leveduras também crescem bem na presença do monossacarídeo frutose pois utilizam as mesmas proteínas carreadoras de glicose presentes na membrana plasmática para o transporte até o citosol (Galdieri et al., 2014). Nem todas as leveduras foram capazes de crescer no meio com monossacarídeo galactose e isso tem sido observado em outros estudos (Nascimento, 2021). Este resultado é devido ao catabolismo desse açúcar pela célula envolver muitas reações metabólicas em relação a outros

substratos (Nascimento, 2021; Nascimento et al., 2019), como a glicose e a frutose. A xilose é uma pentose, e pouco é conhecido sobre as espécies que fermentam tais açúcares (Hahn-Hagerdal et al., 2006). É o segundo monossacarídeo mais abundante nos resíduos vegetais, presente na fração hemicelulósica, e encontrar uma levedura capaz de metabolizar esse açúcar tem uma grande importância para a produção de bioetanol (Mignoni & Alves-Júnior, 2011; Nascimento, 2021). Dentre as leveduras investigadas no presente trabalho, as leveduras A, B, D e G cresceram bem na presença de xilose, demonstrando que são bons espécimes para estudos futuros.

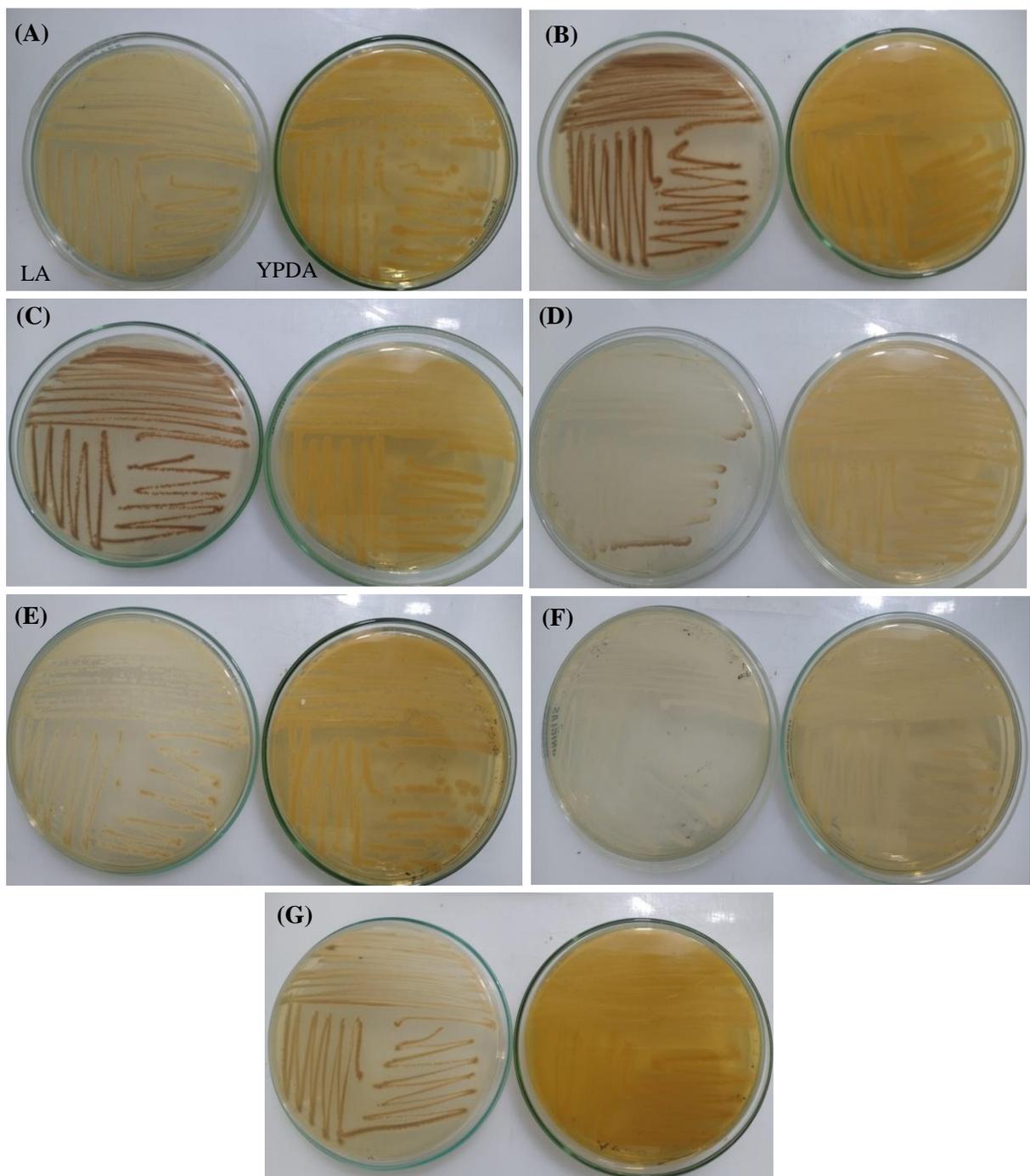


**Figura 4.** Capacidade de crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em diferentes fontes de carbono. (A) Frutose. (B) Sacarose. (C) Maltose. (D) Galactose. (E) Lactose. (F) Xilose.

Os açúcares sacarose (genes invertase codificados SUC 1-5 e SUC 7), maltose (genes codificados MAL 1-4 e MAL 6) e lactose são dissacarídeos que podem ser convertidos em glicose e frutose, os monossacarídeos preferenciais pelas células (Nascimento et al., 2019). Na presença de sacarose e lactose houve um melhor crescimento das leveduras quando comparado a fonte de carbono maltose. As leveduras B e G tiveram um crescimento satisfatório em todas as fontes de carbono utilizadas no presente trabalho, demonstrando que possuem grande capacidade de produzir uma diversidade de enzimas. Leveduras que apresentam tais habilidades têm despertado interesse na produção de enzimas para aplicação em escala industrial (Alves-Prado et al., 2010; Araújo, 2015; Segal-Kischinevzky et al., 2022).

### 3.4 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

Após o período determinado de incubação das leveduras em ágar LA, a produção de sulfeto de hidrogênio foi observada pela variação da cor no perfil de pigmentação quando comparado com o controle, em YPDA. Com base nessa comparação foi possível verificar que as leveduras B e C apresentaram colônias mais pigmentadas, indicando que dentre as leveduras investigadas no presente estudo são as que mais produzem sulfeto de hidrogênio (Figura 5). A levedura G apresentou uma pigmentação mais clara e as leveduras A, D, E e F não apresentaram formação de sulfeto de hidrogênio (Figura 5).



**Figura 5.** Crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em ágar LA e YPDA para a observação de produção de sulfeto de hidrogênio. (A) Levedura A. (B) Levedura B. (C) Levedura C. (D) Levedura D. (E) Levedura E. (F) Levedura F. (G) Levedura G.

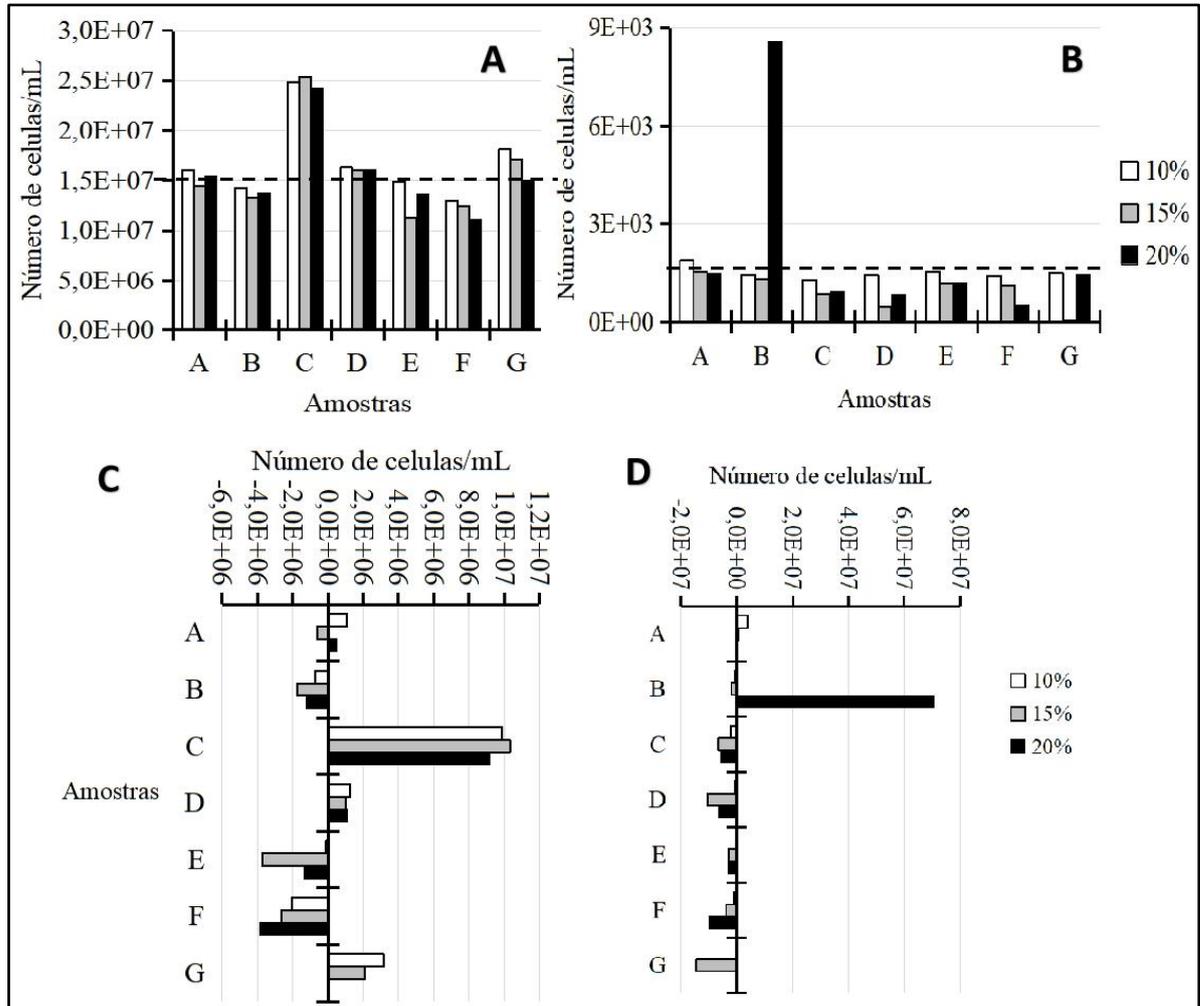
As leveduras superprodutoras de sulfeto de hidrogênio são indesejáveis para o processo fermentativo, pois agregam odor e sabor desagradáveis às bebidas, semelhante a ovo podre e esgoto, como relatado por alguns autores (Ribeiro & Horii, 1999; Ugliano et al., 2011). O sulfeto de hidrogênio é altamente volátil e sabe-se que este pode originar compostos mais estáveis, reduzindo ainda mais a qualidade do produto final (Pretorius, 2000). Segundo Neto e Mendes-Ferreira (2005), a quantidade de sulfetos produzido durante a vinificação é influenciada pela cepa de levedura e pela composição do mosto. Na fermentação da cerveja, o sulfeto de hidrogênio produzido pelas leveduras é removido durante a maturação. No entanto, o uso de cepas de leveduras que produzem menor capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio favorece a redução do tempo exigido no processo (Ribeiro & Horii, 1999).

### 3.5 Teste de resistência à etanol e ácido acético

Os resultados demonstraram que a maioria das leveduras (85,7%) não cresceram na presença de ácido acético, em nenhuma das concentrações utilizadas, exceto a levedura C que apresentou crescimento ( $2,5 \times 10^7$  cell/mL) e crescimento efetivo ( $1 \times 10^7$  cell/mL) similar na presença de 10, 15 e 20% de ácido acético (Figura 6A, Figura 6C, APÊNDICE 1). Quando observado o crescimento das leveduras na presença de 10, 15 e 20% de etanol, apenas a levedura B apresentou crescimento ( $8,6 \times 10^7$  cell/mL) e crescimento efetivo ( $7,1 \times 10^7$  cell/mL) na presença de etanol à 20% (Figura 6B, Figura 6D, APÊNDICE 1).

O ácido acético é uma substância potencialmente tóxica para as leveduras que, dependendo da concentração presente no meio, pode causar a morte da célula (Furlan, 2021). Desta forma, estudos sobre a metabolização do ácido acético tornam-se necessários devido à sua ação inibitória nas leveduras causando redução na produção de etanol durante a fermentação (Huang et al., 2011). Leveduras tolerantes ao ácido acético são importantes para a produção de bioetanol, de primeira e segunda geração, visto que o ácido acético é um dos fatores de estresse comumente presente, seja pela contaminação de bactérias fermentadoras ou pelo tratamento da biomassa vegetal para a decomposição de ligninas (Graves et al., 2006). Essa tolerância é

gerada por meio da interação de um conjunto de proteínas que protege a levedura dos efeitos deletérios ocasionados por este composto dentro da célula (Furlan, 2021).



**Figura 6.** Crescimento das leveduras isoladas da cana-de-açúcar em presença de ácido acético e etanol. A. Crescimento de leveduras na presença de 10, 15 e 20% de ácido acético. B. Crescimento de leveduras na presença de 10, 15 e 20% de etanol. C. Crescimento efetivo das leveduras na presença de 10, 15 e 20% de ácido acético. D. Crescimento efetivo das leveduras na presença de 10, 15 e 20% de etanol.

O etanol é outro fator de estresse químico para os microrganismos devido a sua toxicidade, em concentrações relativamente baixas inibe a divisão celular, diminuindo o volume celular e a taxa de crescimento, sob condições de elevadas concentrações pode reduzir a viabilidade celular e aumentar a morte (Birch & Walker, 2000). Os principais sítios para os efeitos do etanol em leveduras são membranas celulares, algumas proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas e o retículo endoplasmático (Walker, 1998). A membrana plasmática parece ser o primeiro alvo do etanol nas células, por outro lado a tolerância ao etanol em leveduras tem sido relacionada à sua capacidade de modificar a composição lipídica para responder ao efeito

provocado por esta substância (Pina et. al., 2004). Tais leveduras tolerantes são importantes para as destilarias e produção de biocombustível devido ao aumento da eficiência fermentativa.

## 5 CONCLUSÃO

Foram isoladas e caracterizadas sete leveduras da cana-de-açúcar. As leveduras avaliadas apresentaram similaridades morfológicas quanto a elevação e cor branca, e diferenças morfológicas quanto a forma, margens, superfície, diâmetro e tamanho das colônias. Quanto ao crescimento em diversas temperaturas, todas as leveduras cresceram as temperaturas de 15, 20 e 30°C. As leveduras A, B e D cresceram bem na temperatura de 37°C. Apenas as leveduras B e D apresentaram crescimento à 40°C. Todas as leveduras cresceram quando inoculadas em meio contendo frutose como fontes de carbono. As leveduras B e G cresceram bem usando maltose como fonte de carbono. As leveduras A, B, D e G cresceram usando sacarose, galactose, lactose e xilose como fontes de carbono. As leveduras A, D, E e F não apresentaram formação de sulfetos de hidrogênio. Quando ao crescimento na presença de 10, 15 e 20% de ácido acético, apenas a levedura C apresentou crescimento ( $2,5 \times 10^7$  cell/mL) e crescimento efetivo ( $1 \times 10^7$  cell/mL). Quanto observado o crescimento das leveduras na presença de 10, 15 e 20% de etanol, apenas a levedura B, quando na presença de etanol à 20%, apresentou crescimento ( $8,6 \times 10^7$  cell/mL) e crescimento efetivo ( $7,1 \times 10^7$  cell/mL).

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB**. Universitas: Ciências da Saúde. v.02, n.2, p.236-25, 2004.
- ALEXOUPoulos, C. J.; MIMS, C. W; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. John Wiley & Sons, 1996. 880 p.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. Produção, Determinação e Calibração da Concentração de Inóculo em Suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p.103-116.
- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; et al. **Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado**. Applied Biochemistry Biotechnology. v.161. p.333-346, 2010.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Conceitos de Biologia**. vol 2. São Paulo: Editora Moderna, 2001.
- ARAÚJO, M. A. M. **Isolamento e seleção de leveduras para a produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande. 2015.
- BARRIGA EJC, LIBKIND D, BRIONES AI, IRANZO J, PORTERO P, ROBERTS I, ET AL. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. *Chang Divers Chang Environ* 2011:55–86.
- BOULTON, C; QUAIN, D; **Brewing Yeast Fermentation**, 1 ed. Londres, Inglaterra, Blackwell Science, 2001
- DE-BARROS, M. C.; BIZERRA-SANTOS, J.; MAIA, L.; et al. **Industrial Yeast Characterisation for Single Cell Protein Application**. Food Science and Engineering. v.4. p.116-129, 2023.
- DZURENDOVA, S.; LOSADA, C.B.; DUPUY-GALET, B.X.; et al. **Mucoromycota fungi as powerful cell factories for modern biorefinery**. Applied Microbiology Biotechnoogyl. v.106. p.101–115, 2022.
- FENG, L.; JIA, H.; QIN Y.; et al. **Rapid Identification of Major QTLs Associated With Near- Freezing Temperature Tolerance in Saccharomyces cerevisiae**. Frontiers in Microbiology. v.9. p.2110, 2018.
- GALDIERI, L.; ZHANG, T.; ROGERSON, D.; et al. **Protein Acetylation and Acetyl Coenzyme A Metabolism in Budding Yeast**. Eukaryotic Cell. v.13. p.1472–1483, 2014.

- GOWDAK, D.; MARTINS, E. **Ciências: novo pensar**. 2 ed. São Paulo: FTD, 2006.
- HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; et al. **Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today**. Trends in Biotechnology. v.24, n.12. p.549-56, 2006.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; et al. 2008. 10 ed. CABI, Wallingford.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; et al. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In. KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (eds.) **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier. p.87-110, 2011.
- LIMA, A.T.; MARJOTTA-MAISTRO, M.C.; SANTOS, J.A. 2022. Setor sucroenergético: dinâmica produtiva e econômica do açúcar no Brasil. Studies in Social Sciences Review, Curitiba, v.3, n.1, p. 362-388.
- MICHEL, M. **Use of non- Saccharomyces yeast for beer fermentation as illustrated by Torulaspora delbrueckii**. Technische Universität München Forschungszentrum. 2017.
- MIGNONI, Y. C. **Metabolização da galactose e xilose por leveduras isoladas de frutas cítricas em decomposição**. 2016. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó. 2016.
- MOHD AZHAR, S. H.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; et al. **Yeasts in sustainable bioethanol production: A review**. Biochemistry and Biophysics Reports. v.10. p.52–61, 2017.
- 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.
- NASCIMENTO, V. M. **Avaliação do potencial biotecnológico de leveduras industriais**. 2021. 89f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade). Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2021.
- NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. **Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica**. Ciências e Tecnologia de Alimentos. v.25, n.2. p.275-278, 2005.
- PÉTER, G.; TAKASHIMA, M.; CADEŽ, N. Yeast Habitats: Different but Global. In ~ Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 39–71.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil, pp. 123- 180 in SER, H; HARRISON, J. S. (Eds): **The Biology of Yeasts**, vol. 1. Academic Press, London, 1987.

PRETORIUS, I. S. **Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking**. Institute for Wine Biotechnology, University of Stellenbosch, África do Sul, v.16, n.8. p.675-729, 2000.

TAI, S. K.; DARAN-LAPUJADE, P.; LUTTIK, M. A.; et al. **Control of the glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature: a multi-level analysis in anaerobic chemostat cultures**. Journal of Biological Chemistry, v.282, n.14. p.10243-10251, 2007.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. **Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana**. Scientia Agrícola. v.56, n.2. 1999.

ROCHA, B. M.; FONSECA, U. A.; PEDRINI, H.; et al. **Automatic detection and evaluation of sugarcane planting rows in aerial images**. Information Processing in Agriculture, 2022.

STARMER, W.T.; LACHANCE, M.-A. Yeast ecology. In *The Yeasts: A Taxonomic Study*; Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Eds.; Elsevier Science: London, UK; Burlington, MA, USA, 2011; pp. 65–83.

SEGAL-KISCHINEVZKY, C.; ROMERO-AGUILAR, L.; ALCARAZ, L.D.; LÓPEZ-ORTIZ, G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, B.; TORRES-RAMÍREZ, N.; SANDOVAL, G.; GONZÁLEZ, J. Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. *Microorganisms* 2022, 10, 794.

SILVA, W. K. D. M.; MEDEIROS, S. E. L.; SILVA, L. P.; et al. **Sugarcane production and climate trends in Paraíba state (Brazil)**. Environmental Monitoring and Assessment, v.192. p.1-12, 2020.

SHURSON, G. C. **Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods**. *Animal Feed Science and Technology*. v.235. p.60-76, 2018.

UGLIANO, M. FEDRIZZI, B.; SIEBERT, T.; et al. Effect of Nitrogen Supplementation and *Saccharomyces* Species on Hydrogen Sulfide and Other Volatile Sulfur Compounds in Shiraz Fermentation and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.57, n.11, p.4948-4955, 2009. \_\_\_\_\_; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P. **Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v.38, n.3, p.423-429, 2011.

VANDENBERGHE, L. P. S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; BITTENCOURT, G. A.; et al. **Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v.167, p.112721, 2022.

WARD, O. P; YOUNG, S. S. **Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeasts.** Enzyme Microbiology Technology. v.12. p.492-493, 1990.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Levedura: guia prático para a fermentação de cerveja.** 1.ed. Porto Alegre: Krater, 2020. 327 p.

**APÊNDICE 1** – Crescimento, crescimento efetivo e tolerância de leveduras isoladas da cana-de-açúcar. Testes realizados na presença de Ácido acético e etanol nas concentrações de 10, 15 e 20%.

	Crescimento em ácido acético			Crescimento efetivo			Tolerância		
	cell/mL						10%	15%	20%
	10%	15%	20%	10%	15%	20%			
A	1,6E+07 ± 1,0E+05	1,4E+07 ± 1,0E+02	1,6E+07 ± 1,0E+01	1,1E+06	-6,0E+05	5,1E+05	-	-	-
B	1,4E+07 ± 1,0E+05	1,3E+07 ± 1,5E+06	1,4E+07 ± 5,7E+05	-7,2E+05	-1,7E+06	-1,2E+06	-	-	-
C	2,5E+07 ± 1,0E+05	2,5E+07 ± 7,3E+06	2,4E+07 ± 5,1E+06	9,9E+06	1,0E+07	9,2E+06	+	+	+
D	1,6E+07 ± 1,0E+05	1,6E+07 ± 3,2E+06	1,6E+07 ± 1,4E+06	1,3E+06	9,9E+05	1,1E+06	-	-	-
E	1,5E+07 ± 1,0E+05	1,1E+07 ± 4,0E+06	1,4E+07 ± 8,7E+05	-1,3E+05	-3,7E+06	-1,4E+06	-	-	-
F	1,3E+07 ± 1,0E+05	1,2E+07 ± 6,2E+06	1,1E+07 ± 4,6E+05	-2,0E+06	-2,6E+06	-3,9E+06	-	-	-
G	1,8E+07 ± 1,0E+05	1,7E+07 ± 5,0E+06	1,5E+07 ± 1,5E+06	3,2E+06	2,1E+06	1,6E+04	-	-	-
	Crescimento em etanol			Crescimento efetivo			Tolerância		
	cell/mL						10%	15%	20%
	10%	15%	20%	10%	15%	20%			
A	1,9E+07 ± 1,0E+05	1,5E+07 ± 5,1E+04	1,5E+07 ± 1,1E+06	3,9E+06	2,5E+05	-1,5E+05	-	-	-
B	1,4E+07 ± 1,0E+05	1,3E+07 ± 1,9E+06	8,6E+07 ± 1,3E+08	-7,2E+05	-2,0E+06	7,1E+07	-	-	+
C	1,3E+07 ± 1,0E+05	8,2E+06 ± 2,4E+06	9,3E+06 ± 1,4E+06	-2,2E+06	-6,8E+06	-5,7E+06	-	-	-
D	1,4E+07 ± 1,0E+05	4,6E+06 ± 1,4E+06	8,2E+06 ± 7,0E+05	-7,9E+05	-1,0E+07	-6,8E+06	-	-	-
E	1,5E+07 ± 1,0E+05	1,2E+07 ± 1,7E+06	1,2E+07 ± 8,4E+05	4,4E+05	-3,1E+06	-3,1E+06	-	-	-
F	1,4E+07 ± 1,0E+05	1,1E+07 ± 4,4E+05	4,9E+06 ± 1,0E+02	-9,0E+05	-3,9E+06	-1,0E+07	-	-	-
G	1,5E+07 ± 1,0E+05	4,4E+05 ± 1,0E+01	1,4E+07 ± 9,2E+05	-6,8E+04	-1,5E+07	-5,6E+05	-	-	-

(A) RB002754 superior, (B) RB1754 superior, (C) RB992506 inferior, (D) RB863129 inferior, (E) RB1754 inferior, (F) RB863129 superior, E (G) RB992506 superior.