

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a inibidores de substrato
lignocelulósico

Anna Laura Bueno de Camargo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2022

Anna Laura Bueno de Camargo
Tecnóloga em Biocombustíveis

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a inibidores de substrato
lignocelulósico

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Camargo, Anna Laura Bueno de

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a inibidores de substrato lignocelulósico / Anna Laura Bueno de Camargo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

88 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Etanol de segunda geração 2. Inibidores 3. Hidrolisado lignocelulósico 4. Fermentação com reciclo de células 5. *Saccharomyces cerevisiae* I. Título

Dedico ao professor e amigo Alessandro Antonio Orelli Junior (in memoriam),
que sempre acreditou em meu potencial e esteve ao meu lado no início dessa
jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amor Fernando, pelo apoio, incentivo, companheirismo e por estar sempre segurando minha mão, longe ou perto, nos momentos bons e nem tão bons assim, tudo fica melhor ao seu lado. Te amo.

A minha mãe Rosa, por tudo que fez e ainda faz por mim, todo cuidado e apoio incondicional.

Ao meu Pai pelo incentivo e disposição a me ajudar a todo momento.

A minha irmã Anna Heloísa, por sempre acreditar em meu potencial. Isso fez toda a diferença.

A toda a minha família, em especial a minha tia Marta, nem eu comemoro minhas conquistas como você as comemora. Muito obrigada por todo incentivo.

A minha amiga Natacha, agradeço a amizade que começou a mais de dez anos, todo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pelo aprendizado, por compartilhar seus conhecimentos e me guiar na execução deste trabalho.

A todos os professores que passaram pela minha vida.

Aos meus amigos de dentro e fora do laboratório.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1. O uso da cana-de-açúcar na produção de etanol	13
3.2. Etanol de segunda geração	15
3.3. Bagaço de cana-de-açúcar	17
3.4. Celulose	18
3.5. Hemicelulose.....	19
3.6. Lignina.....	19
3.7. Inibidores de fermentação em hidrolisado.....	20
3.8. Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.9. Ciclo reprodutivo de leveduras e esporulação	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Material biológico	25
4.2. Reativação e armazenamento das linhagens	25
4.3. Meios de cultura	25
4.4. Avaliação de crescimento em microplacas	27
4.6. Fermentação com reciclo de células em microescala	27
4.6.1. Determinação da viabilidade celular	28
4.6.2. Determinação de trealose	28
4.7. Dissecação de tétrades e obtenção dos haploides	28
4.7.1. Digestão de ascos primeira esporulação.....	29
4.7.2. Procedimento segunda esporulação	29
4.8. Cruzamento direcionado	29
4.9. Cruzamento Massal	30
4.11. Avaliação de híbridos através de microplacas em Tecan	30
4.12. Análises estatísticas	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Avaliação de diferentes meios para escolha do mais seletivo, para pré-seleção de linhagens tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico	33

5.2. Pré-seleção das linhagens tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico	34
5.4. Seleção de linhagens purificadas para fermentação com reciclo de células	56
5.5. Fermentação com reciclo de células	60
5.6. Dissecação de tétrades e obtenção dos haploides.....	61
5.7. Cruzamento direcionado.....	72
5.8. Cruzamento massal.....	77
6. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a inibidores de substrato lignocelulósico

Em busca de novas fontes de matérias primas para a produção de combustíveis, devido as fontes não-renováveis como o petróleo estarem cada vez mais escassas e com o intuito de produzir energia limpa, sem a necessidade de aumento da produção de cana-de-açúcar, surgiu a oportunidade de obtenção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Atualmente na produção de etanol de primeira geração (1G), o bagaço é utilizado na cogeração de energia elétrica na usina, através de sua queima em caldeiras a vapor, porém uma parte desse bagaço produzido não é utilizado, ocasionando o acúmulo desse material, que pode ser utilizado na produção de etanol de segunda geração (2G), produção essa que tem se mostrado uma ótima alternativa para o uso desse resíduo. No entanto, durante o processo de obtenção do etanol 2G, ocorre um processo chamado de hidrólise, onde ocorre a quebra da hemicelulose e celulose em açúcares menores, principalmente glicose e xilose, porém, essa quebra pode ocasionar a liberação de alguns inibidores da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como HM-Furfural e Furfural, esses inibidores prejudicam a fermentação, diminuindo consideravelmente a produção do etanol e conseqüentemente o rendimento pois reduzem a absorção de carboidratos. Portanto, obter sucesso na produção de etanol 2G, depende, dentre outros fatores, da seleção de leveduras que tolerem os inibidores encontrados no hidrolisado lignocelulósico. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, são as mais utilizadas em processos industriais de obtenção de etanol, leveduras essas selecionadas e modificadas geneticamente para que melhor produzissem etanol, sendo assim a melhor opção para utilização no processo de etanol 2G. Este trabalho tem o intuito de obter leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, tolerantes aos inibidores do substrato lignocelulósico, para isso as linhagens foram selecionadas através de seu crescimento (DO_{600nm}) em substrato de xarope e hidrolisado, durante 24 horas e comparadas com as linhagens referências (CAT-1, panificação, PE-2 e SA-1), as linhagens que obtiveram maior crescimento foram reavaliadas em fermentação com reciclo de células, com substrato de xarope e hidrolisado, onde foram determinados viabilidade celular, trealose e desprendimento de CO_2 . As linhagens que obtiveram melhores desempenhos na fermentação com reciclo de células, foram dissecadas para obtenção de haploides, estes haploides foram avaliados através do crescimento (DO_{600nm}) em substrato de melação e hidrolisado, sendo que os que obtiveram melhores resultados, foram submetidos a cruzamentos direcionado e massal, foram obtidos a partir dos cruzamentos 26 híbridos através da avaliação de crescimento (DO_{600nm}) e reservados para futuros estudos.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração, Inibidores, hidrolisado lignocelulósico, Fermentação com reciclo de células, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Obtaining *Saccharomyces cerevisiae* tolerant to lignocellulosic substrate inhibitors

In search of new sources of raw materials to produce fuels, due to non-renewable sources such as oil being increasingly scarce and in order to produce clean energy, without the need to increase sugarcane production, the opportunity arose to obtain ethanol from sugarcane bagasse. Currently, in the production of first-generation ethanol (1G), bagasse is used in the cogeneration of electric energy in the plant, through its burning in steam boilers, but a part of this produced bagasse is not used, causing the accumulation of this material, which can be used in the production of second-generation ethanol (2G), a production that has been shown to be a great alternative for the use of this residue. However, during the process of obtaining 2G ethanol, a process called hydrolysis occurs, where hemicellulose and cellulose are broken down into smaller sugars, mainly glucose and xylose. *Saccharomyces cerevisiae*, such as HM-Furfural and Furfural, these inhibitors impair fermentation, considerably reducing ethanol production and consequently the yield as they reduce the absorption of carbohydrates. Therefore, success in the production of 2G ethanol depends, among other factors, on the selection of yeasts that tolerate the inhibitors found in the lignocellulosic hydrolyzate. *Saccharomyces cerevisiae* yeasts are the most used in industrial processes to obtain ethanol, yeasts selected and genetically modified to better produce ethanol, thus being the best option for use in the 2G ethanol process. This work aims to obtain *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, tolerant to lignocellulosic substrate inhibitors, for which the strains were selected through their growth (OD_{600nm}) in syrup and hydrolyzed substrate for 24 hours and compared with the reference strains (CAT- 1, bakery, PE-2 and SA-1), the lines that obtained the highest growth were re-evaluated in fermentation with cell recycling, with syrup and hydrolysate substrate, where cell viability, trehalose and CO₂ release were determined. The strains that obtained better performances in the fermentation with cell recycling were dissected to obtain haploids, these haploids were evaluated through growth (OD_{600nm}) in molasses and hydrolyzed substrate, and those that obtained better results were subjected to directed crosses and massal, 26 hybrids were obtained from the crosses through the evaluation of their growth (OD_{600nm}) and reserved for future studies.

Keywords: Second generation ethanol, Inhibitors, Lignocellulosic hydrolysate, Fermentation with cell recycling, *Saccharomyces cerevisiae*

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de redução do uso de combustíveis fósseis, devido aos problemas ambientais gerados pela emissão de gases oriundos de sua queima (ERENO, 2007) (AZUBUIKE e NWAFOR, 2015), tem despertado a busca por combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis, como o etanol, biodiesel, biogás e muitos outros, estes denominados biocombustíveis (PARTZSCH, 2017). O uso do etanol como alternativa aos combustíveis fósseis como a gasolina faz com que ocorra uma redução de 90% das emissões de gases do efeito estufa (JANK e NAPPO, 2009), evitando assim, em 2018, que 523 milhões de toneladas de CO₂ fossem emitidos para a atmosfera (UNICA, 2018).

Devido ao grande conhecimento adquirido nas últimas décadas sobre produção de açúcar e etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil, surgiu a oportunidade de desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização do bagaço gerado, sendo uma delas a produção de etanol de segunda geração (SANTOS, BORSCHIVER e COUTO, 2011). Atualmente o bagaço de cana-de-açúcar é utilizado nas usinas para a geração de energia elétrica e térmica (SOARES e VAZ ROSSELL, 2014), essa energia é utilizada na produção de açúcar e álcool, porém uma parte desse bagaço é acumulada, ficando sem utilização.

Um aspecto relevante para o uso do etanol como combustível é seu balanço energético favorável, devido à capacidade fotossintética da cana-de-açúcar, o que resulta em alta produção de biomassa por unidade de área cultivada e alta eficiência no aproveitamento energético de resíduos do processo industrial (VIEIRA e LEAL, 2013).

Para a produção de etanol de segunda geração, o bagaço de cana-de-açúcar que é composto por hemicelulose, celulose e lignina (REZENDE, LIMA, *et al.*, 2011), passa por diversos processos que possuem a função de quebrar esses polímeros em açúcares (OGEDA e PETRI, 2010), possibilitando a fermentação através de microrganismo, como as leveduras. A fração celulósica é quebrada através de enzimas celulasas em glicose (CAMASSOLA e DILLON, 2014), açúcar esse de fácil metabolização de leveduras amplamente utilizadas em processos fermentativos de usinas, geralmente leveduras do gênero *Saccharomyces*, porém a fração hemicelulósica é quebrada principalmente em açúcares de cinco carbonos, sendo o principal a xilose, que ao contrário da glicose, não tem fácil metabolização por

Saccharomyces cerevisiae (BASSO, BASSO e BASSO, 2020). Entretanto, existem cepas geneticamente modificadas, capazes de metabolizar a xilose em etanol.

Por outro lado, durante os processos de produção de etanol de segunda geração, são gerados alguns inibidores, como ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000), estes também interferem na fermentação (PAIVA, LIMA e PAIXÃO, 2009) comprometendo a absorção dos carboidratos pela levedura e reduzindo o rendimento fermentativo. No intuito de reduzir os efeitos inibitórios do hidrolisado, tem-se feito o uso de melaço produzido nas usinas, uma vez que dessa forma o hidrolisado é diluído e em contrapartida, o mosto acaba adquirindo os nutrientes necessários para a fermentação (NOGUEIRA, FERREIRA, *et al.*, 2009).

O presente projeto tem como objetivo, obter leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes aos inibidores presentes no mosto de melaço e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, para a produção de etanol de segunda geração.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo obter linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, tolerantes aos inibidores presentes no mosto de melaço de cana-de-açúcar e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar em condições de fermentação com reciclo de células.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O uso da cana-de-açúcar na produção de etanol

A cana-de-açúcar é uma cultura perene, originária da ilha de Nova Guiné (DANIELS e DANIELS, 1993), que chegou ao Brasil por volta do século XVI e devido às características edafoclimáticas presentes no país (CARNEIRO, CASAROLI e DOS SANTOS, 2015), se tornou um dos cultivos mais importantes, graças a sua utilização na indústria sucroalcooleira.

A cana-de-açúcar possui em sua composição, vários açúcares, sendo o mais abundante a sacarose, que se trata de um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose (LIMA, 2019). A sacarose é amplamente utilizada na produção de açúcar e etanol e devido ao Programa Nacional do Álcool, criado em 1975 (CURSI, HOFFMANN, *et al.*, 2021), houve o incentivo do uso do etanol como combustível, assim como um avanço no desenvolvimento das técnicas de sua produção (ANDRADE, CARVALHO e SOUZA, 2009).

No Brasil, a maior parte da produção de etanol é obtido através da fermentação dos açúcares contidos no caldo de cana-de-açúcar, geralmente o caldo é extraído através de moendas, o caldo é rico em sacarose (ZABED, FARUQ, *et al.*, 2014) e já pode ser utilizado para a produção de etanol ou pode ser evaporado e cristalizado para a fabricação de açúcar (CAVALCANTE e DE ALBUQUERQUE, 2015).

A parte não cristalizada, pode ser destinada a fermentação, para a produção de álcool (figura 1) (LOPES, GABRIEL e BORGES, 2011). E é durante o processo de extração do caldo da cana-de-açúcar, que se obtém o bagaço.

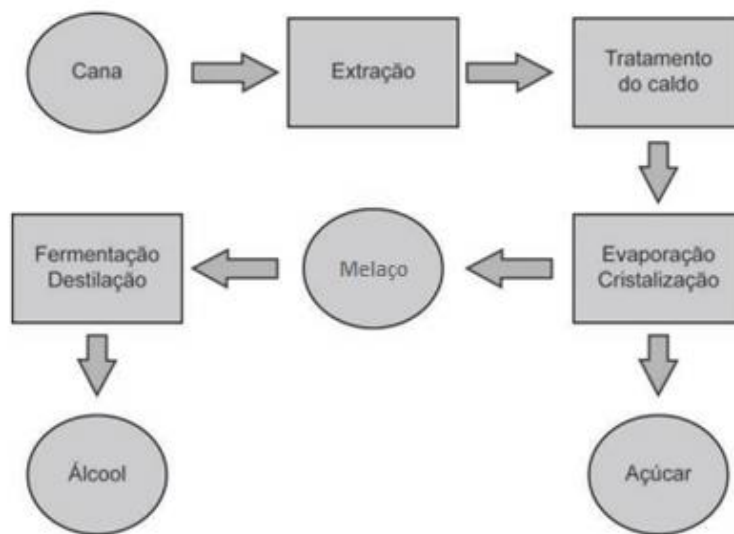


Figura 1: Fluxograma do processo de fabricação de açúcar e álcool, a partir da cana-de-açúcar (LOPES, GABRIEL e BORGES, 2011)

A produção de etanol no Brasil cresceu no período entre 1994 e 1998, devido ao grande estoque do açúcar e a redução do consumo no mercado doméstico, neste período o preço do açúcar no mercado internacional aumentou e em contrapartida a oferta de etanol no mercado interno despencou (figura 2). Esse cenário só foi revertido em meados de 2001, quando motores a etanol começaram a ser produzidos novamente, foi também nesse período que surgiram os motores flex (GUEVARA, SILVA, *et al.*, 2016).

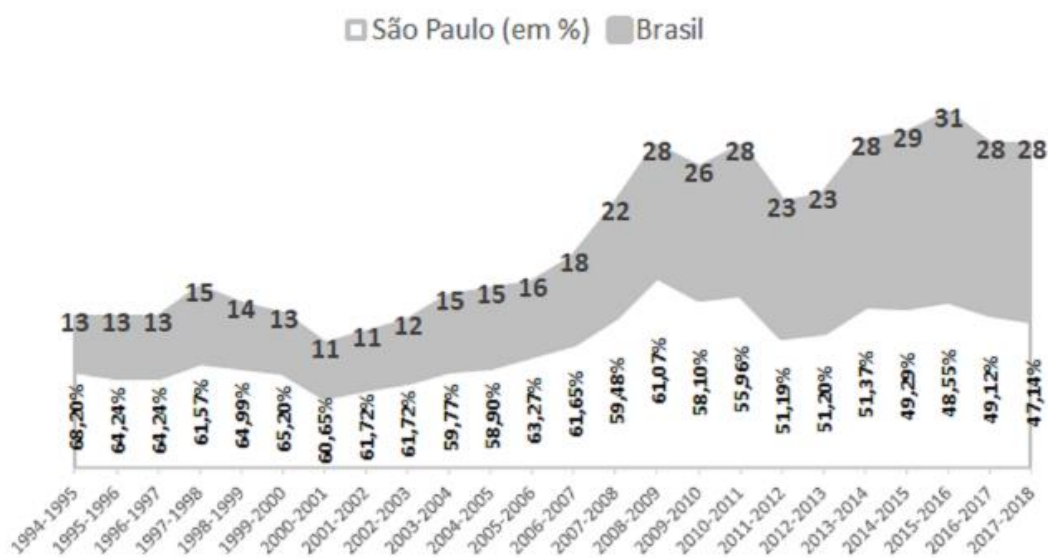


Figura 2: Produção de etanol no Brasil, por safra (em milhões de m³) (MAPA, 2018).

Na safra 2019/20, o Brasil registrou a maior produção de etanol da história, chegando a um total de 34 bilhões de litros, provenientes da cana-de-açúcar, chegando a um aumento de 5,1% em relação à safra passada (Tabela 1) (CONAB, 2020).

Tabela 1: Estimativa da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (CONAB, 2020).

REGIÃO/UF	CANA-DE-AÇÚCAR DESTINADA AO ETANOL TOTAL (Em mil t)	ETANOL TOTAL (Em mil l)
NORTE	3.152,1	233.487,0
NORDESTE	26.978,7	2.115.104,8
CENTRO-OESTE	118.719,6	9.770.530,0
SUDESTE	250.483,5	20.256.671,0
SUL	18.833,8	1.625.825,0
NORTE/NORDESTE	30.130,9	2.348.591,8
CENTRO-SUL	388.036,9	31.653.026,0
BRASIL	418.167,8	34.001.617,8

3.2. Etanol de segunda geração

Depois da crise do petróleo de 1970 (LIMA, 1977), o Brasil tem procurado uma alternativa aos combustíveis fósseis e uma delas é a produção de biocombustíveis, ou seja, combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis e que auxiliam na proteção ambiental (DUAILIBE, 2012), uma vez que o país já possuía domínio no processo de produção de açúcar e álcool desde o início do século XX (SILVA e

FISCHETTI, 2008).

Com o objetivo de produzir de forma mais sustentável, surgiu à oportunidade de utilizar um subproduto na produção de etanol, no sentido de fazer mais com o mesmo, ou seja, aumentar a produção de etanol nas usinas, sem a necessidade de aumentar o plantio de cana-de-açúcar e sem a necessidade de grandes expansões de processo nas usinas (DIAS, CUNHA, *et al.*, 2011). Esse processo é denominado etanol de segunda geração.

Devido à grande produção de etanol de primeira geração no Brasil, também se é gerado grande quantidade de bagaço, onde uma tonelada de cana-de-açúcar gera aproximadamente 250 kg de bagaço (CORTEZ, MAGALHÃES e HAPPI, 1992), ocorrendo acúmulo desse material no ambiente, porém esse material é lignocelulósico, rico em celulose e hemicelulose, podendo assim ser utilizado na produção de etanol de segunda geração (FARIAS, 2014).

O processo de obtenção de etanol de segunda geração (figura 3) consiste em três principais processos, primeiramente é feito o pré-tratamento no bagaço (MANKAR, PANDEY, *et al.*, 2021), com o objetivo de disponibilizar a celulose e quebrar a fração de hemicelulose, principalmente em xilose (DOMINGUEZ, GONG e TSAO, 1996) geralmente o processo combina um banho ácido ou básico, temperatura e pressão. Após o pré-tratamento, ocorre a etapa de hidrólise, onde é feita a quebra da celulose em glicose, finalizando com a conversão desses açúcares em etanol através da fermentação (SANTOS, QUEIRÓZ, *et al.*, 2012).

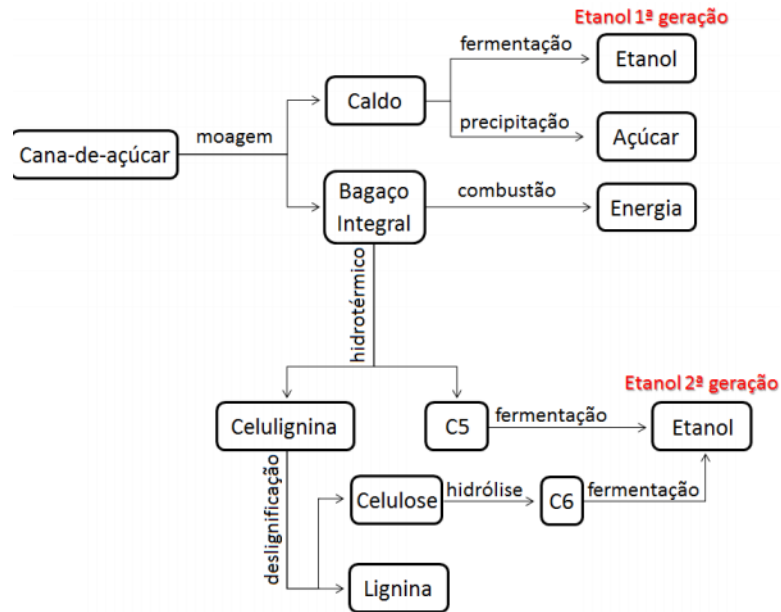


Figura 3: Fluxograma de produção de etanol reunindo a 1ª e a 2ª gerações. (C5 representam pentoses – principalmente xilose e C6 representa glicose) (CURVELO, 2015)

3.3. Bagaço de cana-de-açúcar

Segundo LOH, SUJAN, *et al.*, 2013, o bagaço de cana-de-açúcar é um composto biodegradável muito atrativo, devido a sua composição química e suas características naturais, o bagaço é um subproduto gerado nas usinas sucroalcooleiras, durante o processo de extração de caldo de cana-de-açúcar (NAZATO, SILVA, *et al.*, 2011), atualmente em grande parte das usinas, é queimado em caldeira para a geração de energia elétrica e térmica, ambas utilizadas nos processos da usina.

Por se tratar de uma biomassa lignocelulósica, o bagaço tem em sua composição química celulose 32 – 48%, hemicelulose 19 – 24% e lignina 23 – 32% (figura 4) e outros componentes como cinzas, proteínas e pectinas, podendo assim ser utilizado como matéria-prima na produção de etanol de segunda geração (SANTOS *et al.*, 2013).

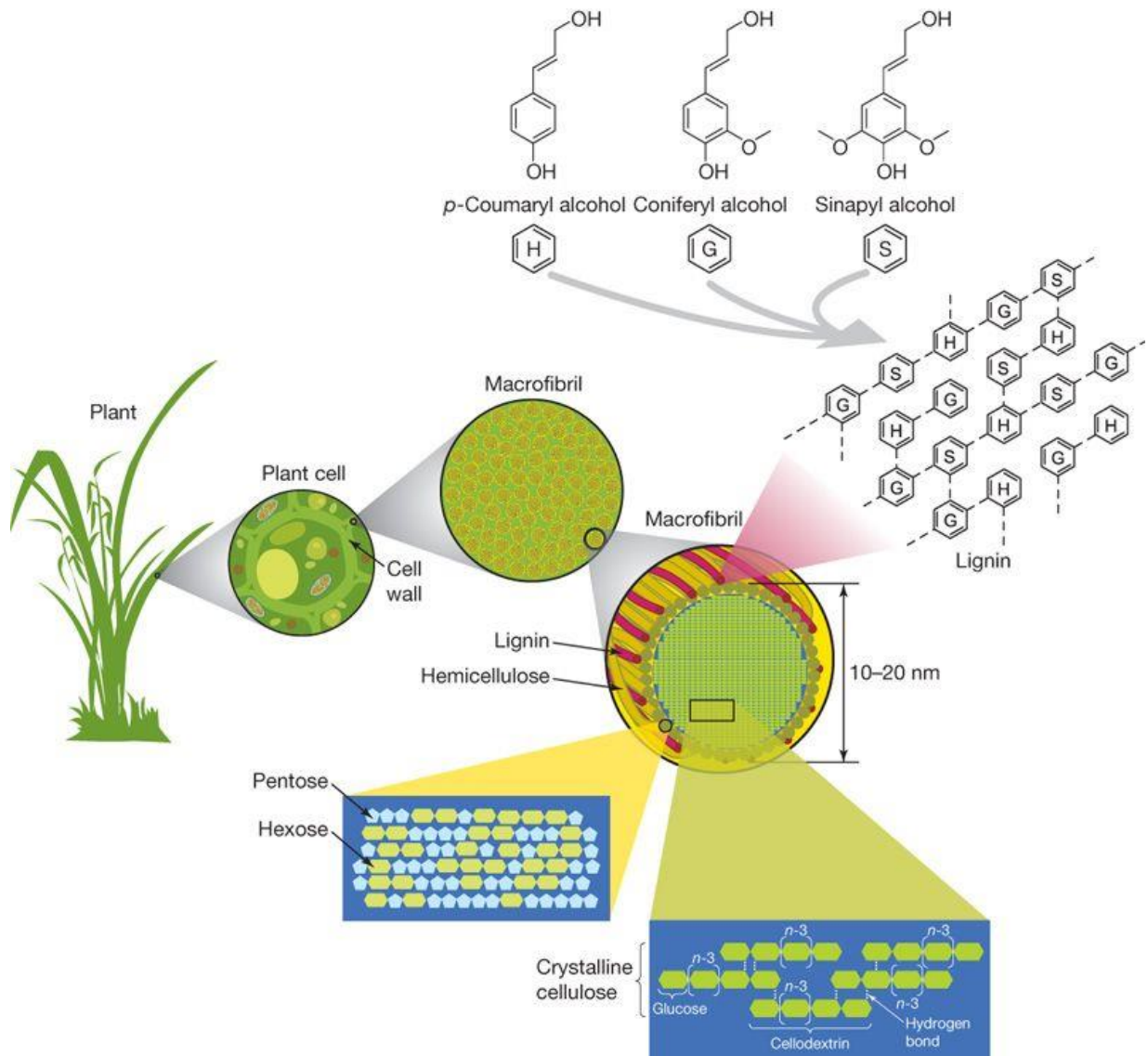


Figura 4: Estrutura da lignocelulose (RUBIN, 2008).

3.4. Celulose

A celulose é o carboidrato mais abundante na natureza, sendo que representa de 20-40% da matéria seca de todas as plantas superiores (PAIVA, LIMA e PAIXÃO, 2009), é um polímero rígido e difícil de quebrar, devido a sua estrutura fibrosa formada pela condensação de D-glicoses unidas por enlaces B 1-4 glicosídicos (LORA e VENTURINI, 2012) (KLOCK e ANDRADE, 2013). Através da hidrólise a celulose é degradada em glicose que é facilmente fermentado por leveduras, podendo ampliar a produção de etanol nas usinas de cana-de-açúcar (ERENO, 2007).

3.5. Hemicelulose

A hemicelulose, também conhecida por poliose é uma mistura de polímeros de polissacarídeos de baixa massa molecular podendo ser formado por vários açúcares (Figura 5) (KLOCK e ANDRADE, 2013). Formada principalmente por xiloglucanas, a hemicelulose geralmente está ligada a microfibrilas de celulose, pectinas e lignina, o que possibilita a estabilização da parede celular (PAIVA, LIMA e PAIXÃO, 2009).

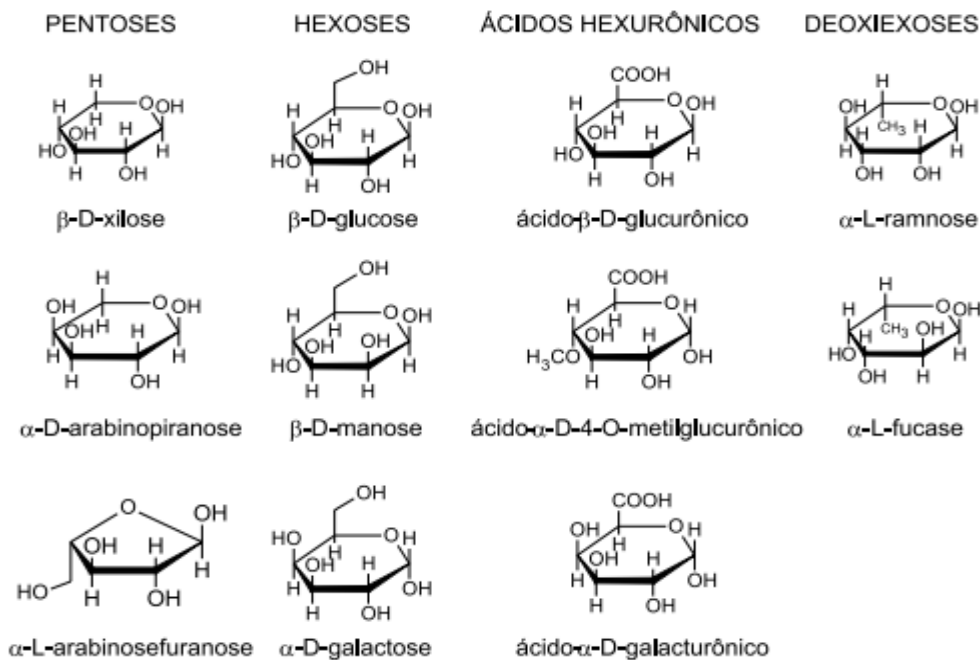


Figura 5: Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses (MORAIS, NASCIMENTO e MELO, 2005)

3.6. Lignina

A lignina é formada por uma estrutura que proporciona as plantas maior resistência mecânica, por ser uma estrutura resistente, ela dificilmente é degradada nos processos químicos e enzimáticos utilizados na produção de etanol de segunda geração, chegando ao final do processo, porém existem microrganismos que degradam a lignina, podendo se extrair ceras, álcoois, lipídeos, esteroides, ácidos graxos, hidrocarbonetos e flavonoides (SOARES, 2012). As moléculas da lignina são formadas por um sistema aromático de fenilpropano (KLOCK e ANDRADE, 2013).

3.7. Inibidores de fermentação em hidrolisado

Para a fermentação de hidrolisado lignocelulósico, deve-se levar em consideração a fração de hemicelulose existente no bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que esse polímero degradado no pré-tratamento, produz açúcares, como a xilose, que é uma pentose, pois as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, dificilmente são capazes de assimilar ou fermentar pentoses (ALVES, 2014). Outros fatores que também inibem a fermentação de hidrolisado, a presença de compostos inibidores como ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos (ALMEIDA, MODIG, *et al.*, 2007) (Figura 6) gerados durante a hidrólise do material lignocelulósico (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).

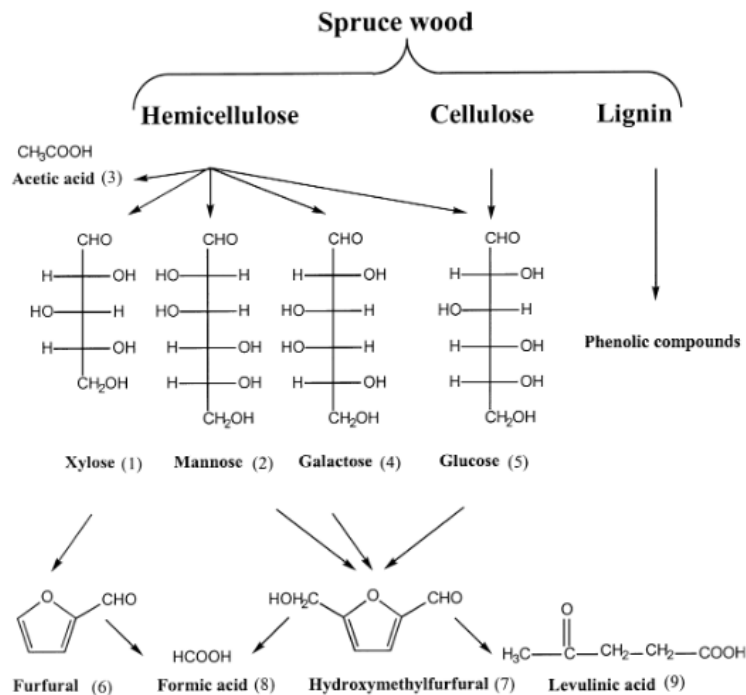


Figura 6: Inibidores gerados durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).

3.8. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são amplamente utilizadas em diferentes processos, como no preparo de pães, bebidas alcoólicas e combustíveis. São microrganismos eucarióticos e estão espalhados pela natureza (COPERSUCAR, 1987). Pertencem ao reino Fungi e podem sobreviver tanto em condições aeróbias como anaeróbias

(LIMA, AQUARONE, *et al.*, 2001). Com o objetivo de conseguir energia química, a levedura realiza a fermentação do açúcar, para sua sobrevivência, crescimento e perpetuação da espécie (BASSO, BASSO e BASSO, 2020).

As leveduras do gênero *Saccharomyces*, são as mais utilizadas em fermentações industriais para a produção de álcool, a utilização desse microrganismo é devida a capacidade de conversão rápida de açúcares em etanol e a alta tolerância aos inibidores de fermentação, encontrados em mostos industriais (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2006).

Durante a fermentação de açúcares, ocorre a glicólise, onde uma molécula de glicose é metabolizada em duas moléculas de piruvato e em condições anaeróbicas, libera CO_2 , reduzindo o piruvato a etanol, tendo um rendimento de aproximadamente 0,511 em etanol e 0,489 em CO_2 , sendo que parte da energia gerada, também é utilizada para renovação celular (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008) conforme pode ser visto na figura 7.

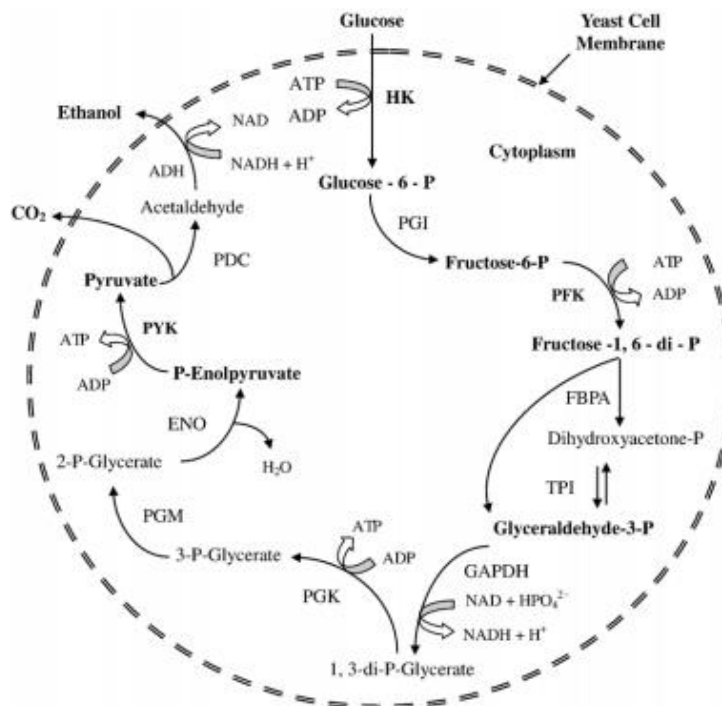


Figura 7: Via metabólica da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae* (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008)

3.9. Ciclo reprodutivo de leveduras e esporulação

As leveduras *S. cerevisiae*, sob condições de crescimento e concentração de nutrientes adequadas brotam (precedido por processo de mitose), produzindo novas

células, no entanto, quando os nutrientes são escassos (EZOV, CHANG, *et al.*, 2010), as células diploides são submetidas a esporulação, gerando esporos, processo este conhecido como meiose (OHKURA, 2015).

Diferente do crescimento vegetativo, ao ocorrer a meiose, a célula diploide forma uma estrutura chamada de asco, constituída de quatro ascósporos, originados pelo empacotamento do núcleo (NEIMAN, 2005). Diante disso, ocorre a formação de células haploides (figura 8) (PIEKARSKA, RYTKA e REMPOLA, 2010).

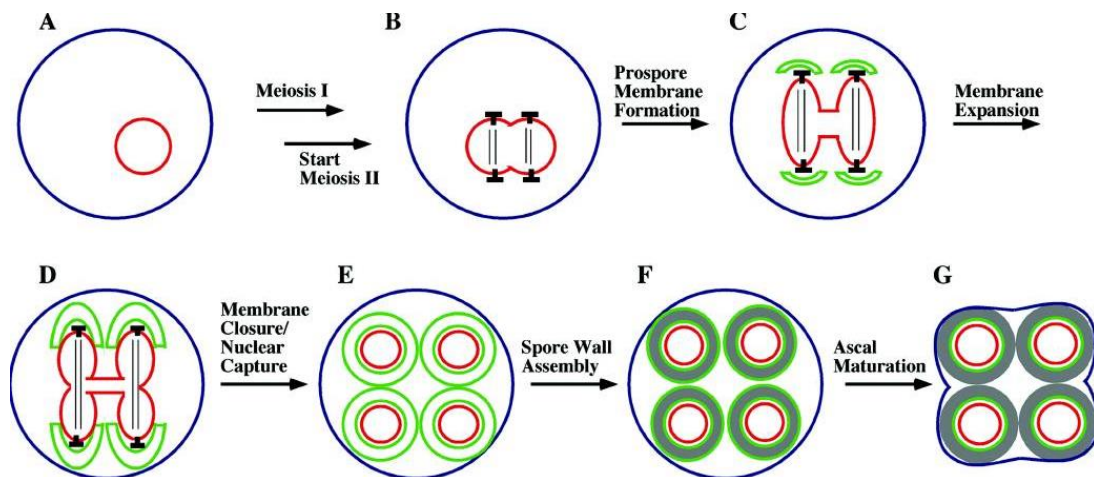


Figura 8: Visão geral dos estágios de formação de esporos e ascos (NEIMAN, 2005)

A finalização do processo ocorre com a formação de uma parede celular, fazendo com que os esporos possam sobreviver a condições de estresse, devido a resistência que a parede celular lhe confere (morfogênese) (PIEKARSKA, RYTKA e REMPOLA, 2010). Para a levedura, a esporulação é um processo muito importante, pois ele garante que ela sobreviva se adaptando aos estresses proporcionados pela variação do meio ambiente que se encontra (GREIG, LOUIS, *et al.*, 2002).

Os quatro esporos produzidos, possuem “mating types” (tipos de acasalamento) diferentes (dois possuem α e dois a), denominados de MAT a e MAT α , sendo que a reprodução sexuada da célula ocorre através da conjugação entre dois haploides de “mating types” distintos, ou seja, a fusão de dois citoplasmas celular e dos dois núcleos (KNOP, 2011), isso é possível, devido a presença de feromônios sintetizados pelas células, leveduras com MAT a , possuem feromônios de Fator a e leveduras MAT α possuem Fator α . A conjugação entre as células ocorre através de receptores específicos, presentes nos feromônios, onde o Fator a liga ao Ste2p e o Fator α liga ao Ste3p (EZOV, CHANG, *et al.*, 2010; MONTELONE, 2015).

Após a conjugação das leveduras, são formados híbridos, que proporcionam variabilidade genética, ou seja, pode-se transmitir das duas linhagens parentais, características que as tornam mais resistentes aos estresses provocados pelo ambiente que se encontram, para evitar sua extinção (STELKENS, BROCKHURST, *et al.*, 2014).

Como demonstrado por SÍPICZKI (2019), o melhoramento das linhagens de leveduras, permitiu a obtenção de diversas cepas, provenientes de duas ou mais espécies, isso faz com que as linhagens provenientes desses cruzamentos, tenham sua genética melhorada e maior resistência aos processos e a manipulação do genoma das leveduras que são encontradas nos processos fermentativos, pode acarretar na obtenção de cepas tolerantes a vários tipos de estresses encontrados nesses processos (ARGUESO, CARAZZOLLE, *et al.*, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba – SP.

4.1. Material biológico

Foram utilizadas linhagens de leveduras *S. cerevisiae* pertencentes à coleção do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de leveduras, do Departamento de Ciências Biológicas ESALQ/USP, mantidas em glicerol 20% a -80°C. As linhagens a serem selecionadas foram isoladas de destilarias de etanol combustível e produção de cachaça/aguardente tanto do Brasil como do exterior.

Como referências foram utilizadas linhagens largamente empregadas no processo industrial brasileiro, tanto linhagens com alto potencial de implantação (PE-2 e CAT-1) como linhagens de pouca capacidade de sobrevivência (linhagens de panificação).

4.2. Reativação e armazenamento das linhagens

Para reativação das linhagens obtidas e as referências utilizadas na avaliação de crescimento e ensaios fermentativos em bateladas, foram reativadas pela centrifugação dos microtubos contendo a linhagem, descartado o sobrenadante e adicionado 900µL de YPD líquido estéril, seguindo de incubação a 28°C por 24 horas.

Culturas obtidas nesse trabalho foram transferidas para microtubos de 1,5mL contendo YPD e 20% de glicerol, em freezer a -80°C.

4.3. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram descritos a seguir:

YPD para crescimento de leveduras

1% de extrato de levedura

1% de peptona bacteriológica

2% de glicose.

Para meio YPD-A foi adicionado 2% de ágar

Meio seletivo para avaliação de crescimento e μ Máximo em microplacas

Foram feitos testes para obtenção de um meio com poder discriminatório, utilizando melaço e hidrolisado, onde possibilitou que as linhagens fossem selecionadas de acordo com a tolerância aos inibidores.

Meio para esporulação

0,02% de Rafinose

0,03% de Acetato de potássio

2% Ágar

Meio para micromanipulação

Consiste no meio YPD com redução dos componentes para melhorar a transparência.

0,3% de extrato de levedura

0,3% de peptona bacteriológica

2% de glicose

2% de ágar

Tampão de micromanipulação

1 M Sorbitol

10 mM TRIS pH 7,5

10 mM Na₂PO₄

10 mM EDTA

Esterilizado por filtração em filtro de 0,22 μ M mantido a -20°C.

Solução Zimoliase

Zimoliase 100T USB Biological diluída 100 vezes (1U mg⁻¹ de célula) em água purificada, esterilizada (através de filtração) e mantida a -20°C.

4.4. Avaliação de crescimento em microplacas

As linhagens obtidas do banco foram submetidas a testes de crescimento medido através da absorbância (DO_{600nm}), as células foram inoculadas em placas com 96 poços (10 μ l de inóculo (obtido através a reativação descrita no item 4.2.) para 90 μ l de meio seletivo) em triplicata, chegando a um total de 27 linhagens do banco, 4 linhagens referência e 1 branco (somente o meio). As placas foram incubadas em um espectrofotômetro Tecan (GENios microplate reader), com leituras a cada 2 horas e agitações de 5 minutos antes das leituras a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas.

4.5. Propagação de biomassa de levedura para ensaio de fermentação com reciclo de células em microescala

Para a propagação, as linhagens selecionadas na avaliação por crescimento, que estavam armazenadas em ultrafreezer a -80°C, foram descongeladas e transferidas 1mL de cultura (foi transferido todo o conteúdo presente no microtubo) para Erlenmeyer de 125mL previamente esterilizados, contendo meio de mel a 10% de ART, sob incubação a temperatura ambiente, por 24 horas, com agitação de 150 RPM. Após o crescimento, os frascos resultantes da propagação foram mantidos em geladeira por aproximadamente 12 horas, para que a biomassa decantasse e fosse possível o descarte do sobrenadante, para aumento da concentração da suspensão de células. O conteúdo resultante foi totalmente transferido para tubos de centrifuga de 15mL, previamente esterilizados a 121°C por 20 minutos, identificados e tarados. Os tubos foram centrifugados e corrigidos para que todas as linhagens começassem a fermentação com 0,6g de biomassa úmida.

4.6. Fermentação com reciclo de células em microescala

As linhagens que obtiveram maiores crescimentos foram avaliadas em fermentações com reciclo, utilizando-se o mesmo meio da etapa anterior e simulando o processo industrial.

Ao todo, foram testadas 10 linhagens (Tabela 3), primeiramente as linhagens, que estavam armazenadas em ultrafreezer a -80°C, foram reativadas em microtubos de 1,5 mL utilizando 900 μ L de YPD com antibiótico e 100 μ L de inóculo, contendo a

linhagem selecionada, os microtubos foram incubados por 24 horas em incubadora B.O.D, a 28°C. Essas linhagens foram comparadas com as referências que são amplamente utilizadas nas usinas (SA1 e PE2) (FERMENTEC, 2021).

O inóculo obtido foi transferido para Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de mel com 10% de ART, os frascos foram incubados sob agitação de 100 RPM, a temperatura ambiente, por 24 horas, esse procedimento foi executado para que se obtivesse biomassa suficiente para iniciar a fermentação com reciclo de células.

Passadas as 24 horas de incubação, os frascos foram deixados em geladeira, durante uma noite, para que as leveduras decantassem para o fundo do frasco, parte do sobrenadante foi descartado, para que ocorresse a concentração da biomassa, o restante foi transferido para o tubo de centrifuga de 15 mL, previamente identificado e tarado, obteve-se um valor de 0,6 g de biomassa em cada tubo o que equivale a 8% (m/v). Foi adicionado 5 mL de meio nos tubos de centrifuga, contendo hidrolisado e mel, em cada ciclo fermentativo.

4.6.1. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através da microscopia óptica, em objetiva de 40x, considerando a contagem de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas de rosa), presentes em retículos da câmara de Neubauer, através da coloração diferencial das células pela solução de eritrosina em tampão fosfato. A viabilidade foi expressa através de porcentagem, calculado através da função de proporção de células viáveis sobre o total de células contadas (VARIZE, 2018).

4.6.2. Determinação de trealose

A quantificação da trealose, foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.7. Dissecação de tétrades e obtenção dos haploides

As melhores linhagens selecionadas na fermentação com reciclo de células (no mínimo 2), foram submetidas à esporulação, suas tétrades dissecadas. Para isso as

linhagens foram estriadas em YPD-A e incubadas a 30°C por 48 horas, posteriormente as células foram estriadas em meio de esporulação (0,02% de rafinose, 0,3% de acetato de potássio e 2% de ágar) e incubadas a 30°C durante 7 dias para esporulação.

4.7.1. Digestão de ascos primeira esporulação

Para a digestão dos ascos, colocou-se 1mL da cultura para um microtubo estéril de 1,5 mL e centrifugou, para que houvesse a separação da cultura do meio, o sobrenadante foi descartado e a cultura foi ressuspensa em uma solução composta por 480µL de água, 80U de Zymoliase, 10µL de Beta Mercaptoetanol e deixado overnight a 37°C, após esse período o microtubo foi novamente centrifugado para a separação dos esporos da solução e descartado o sobrenadante.

Ressuspendeu-se as células em 500µL de SDS 1% estéril e manteve na solução por 1 hora a 37°C, após esse período as células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em água, para remoção da solução de SDS 1% e novamente centrifugadas e descartado o sobrenadante.

A cultura resultante foi ressuspensa em água e plaqueada em YPD-A para obtenção de colônias isoladas.

4.7.2. Procedimento segunda esporulação

Uma porção de células esporuladas foram adicionadas em 1 µL de solução zimoliase, 3 µL de beta-mercaptano e 296 µL de tampão de micromanipulação em um microtubo de 1,5mL e incubado em temperatura ambiente até ocorrer a digestão dos ascos (BASSO, 2014). As tétrades foram dissecadas utilizando um micromanipulador (Carl Zeis, Scope A1, AXIO) e foi feita a determinação do “mating type” dos esporos isolados, os haploides resgatados foram incubados por 48 horas a 30°C. Os haploides foram selecionados em Tecan (GENios microplate reader) conforme item 4.4.

4.8. Cruzamento direcionado

Para a realização do cruzamento direcionado, duas porções de células, com diferentes “mating type” (a e α) foram incubadas em placa contendo meio YPD-A a

30°C, após 4 horas uma porção foi estriada em uma nova placa com meio YPD-A para isolamento dos zigotos (LINDEGREN e LINDEGREN, 1943).

4.9. Cruzamento massal

Os haploides obtidos foram empregados em cruzamentos massais, para isso, os haploides que estavam congelados a -80°C em ultrafreezer, foram descongelados e os microtubos centrifugados, feito o descarte do sobrenadante e foi adicionado 1mL de YPD com antibiótico ampicilina. As amostras foram incubadas por 24 horas em B.O.D a 28°C para que ocorresse a reativação dos haploides, porém, durante esse processo, alguns microtubos abriram devido a formação de gás carbônico durante o crescimento da biomassa e perdemos o conteúdo do microtubo, foi então colocado novamente dentro do tubo meio novo, para que não fosse perdido o haploide. Após a reativação, todos os haploides foram transferidos para um Erlenmeyer de 1000mL, previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos, todo conteúdo foi centrifugado, para a separação da biomassa, contendo todos os haploides obtidos (sem distinção de “mating type”, ploidia ou seleção através do crescimento), na biomassa foi adicionado 400mL de meio YPD com antibiótico e deixou-se ocorrer o cruzamento a 30°C por 48 horas, para favorecer a hibridação (SILVELLO, 2016).

4.10. Seleção de possíveis híbridos do cruzamento massal através de tolerância ao mosto com hidrolisado

Os possíveis híbridos obtidos através do cruzamento massal, foram expostos ao meio utilizado nas seleções do item 4.4., foi acompanhado sua viabilidade como descrito no item 4.6.2. e feito a troca do meio a cada queda brusca de viabilidade, no intuito de restar somente híbridos resistentes aos inibidores do hidrolisado.

4.11. Avaliação de híbridos através de microplacas em Tecan

Após a obtenção de híbridos, os mesmos foram avaliados segundo o item 4.4.

4.12. Análises estatísticas

Com o intuito de verificar diferenças significativas entre as linhagens selecionadas, os dados obtidos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias de Tukey no software PAST, utilizando médias referentes a triplicatas de cada linhagem. As linhagens foram consideradas diferentes ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de diferentes meios para escolha do mais seletivo, para pré-seleção de linhagens tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico

Para a primeira etapa de seleção de linhagens de *S. cerevisiae*, foram testados meios que seriam utilizados no “screening”, para isso foram utilizadas as linhagens referências, sendo três amplamente utilizadas em usinas (CAT-1, PE-2 e SA-1) e uma de panificação (PAN - Itaiquara).

Os parâmetros utilizados para a diferenciação dos meios foram, quantidade de hidrolisado, quantidade de melaço, pH e concentração de inibidores como ácido acético, furfural e HMF (hidroximetilfurfural) (estes já encontrados no substrato lignocelulósico e/ou adicionados).

Também foram adicionados ao meio, nutrientes necessários para o crescimento das leveduras e antibióticos para não haver interferências de outros microrganismos no resultado da seleção. Chegando as quantidades descritas na tabela 2.

Tabela 2: Valores referentes a quantidade de cada composto presente no meio utilizado para pré-seleção de linhagens tolerantes aos inibidores de hidrolisado (valores obtidos através de cálculo de diluição)

Composto	Quantidade (g/L)
Sacarose	103,43
Frutose	2,93
Glicose	7,46
Xilose	52,81
Arabinose	4,5
Ácido fórmico	0,94
Ácido acético	10,75
Furfural	1,05
HMF-Furfural	0,12

5.2. Pré-seleção das linhagens tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico

Inicialmente a estratégia utilizada para realizar o “screening” das linhagens armazenadas no banco, foi submetê-las a testes de crescimento, medido através da absorbância (DO600nm), as células foram inoculadas em placas com 96 poços (10 μ l de inóculo para 90 μ l de meio contendo melaço e hidrolisado) em triplicata, chegando a um total de 27 linhagens, 4 linhagens referência e 1 branco (somente o meio).

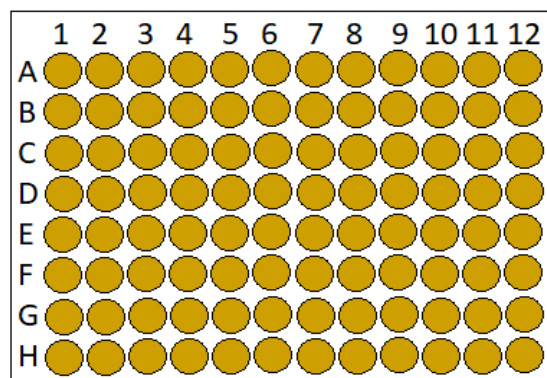


Figura 9: Esquema referente a placa utilizada em Tecan (poços A – 1 a 3 branco; poços A – 4 a G – 12 linhagens em triplicata e H – 1 a 12 referencias em triplicata).

As placas foram incubadas em um Tecan (GENios microplate reader), com leituras a cada 2 horas e agitações de 5 minutos antes das leituras a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas. Através da análise de crescimento (DO600nm), comparando as linhagens isoladas com as linhagens referências, foi possível diferenciar dentre as linhagens, as mais tolerantes ao hidrolisado, uma vez que ele possui inibidores (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000) que afetam o crescimento das leveduras e conseqüentemente a fermentação (figuras de 10 a 26).

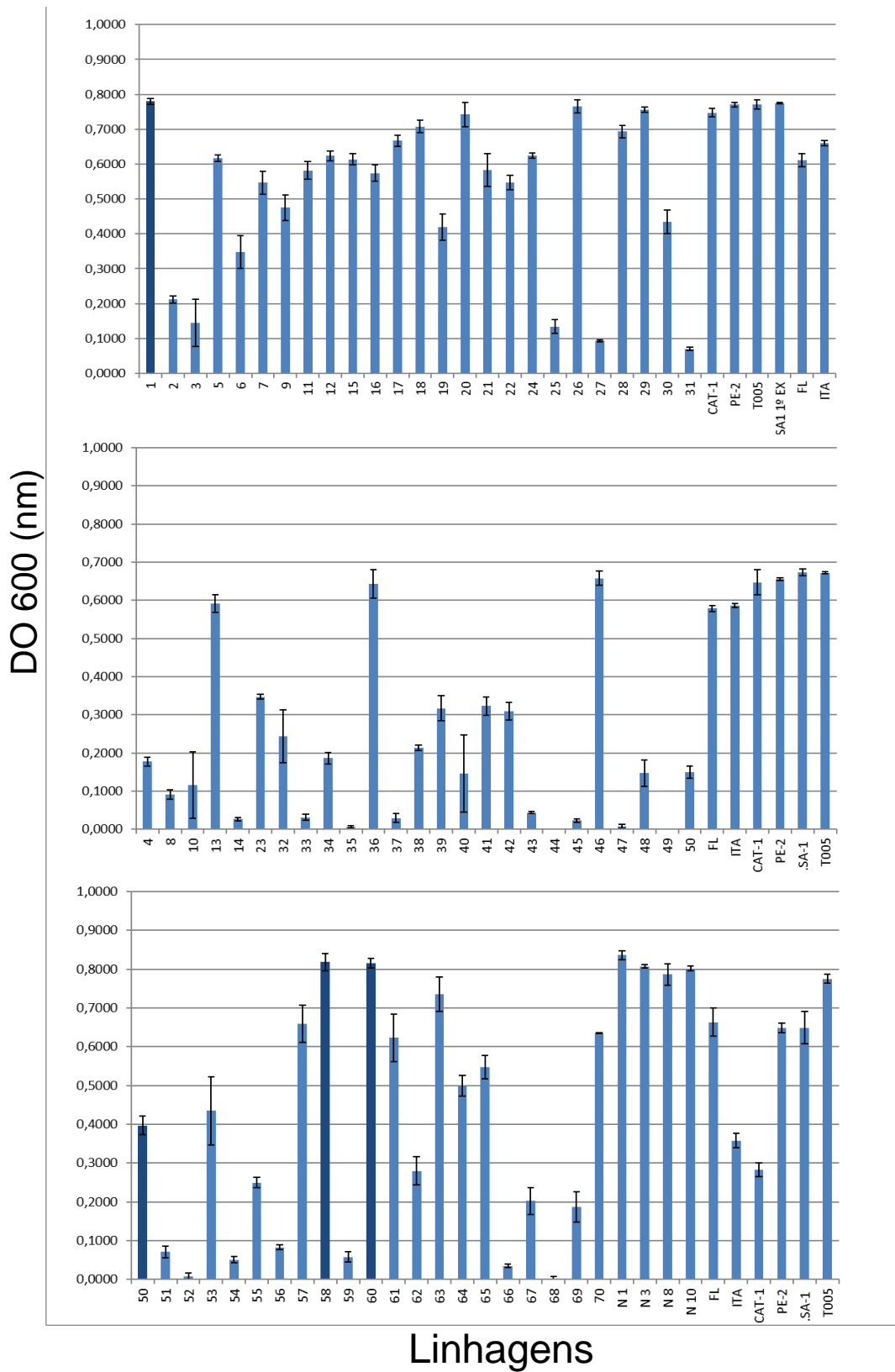


Figura 10: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

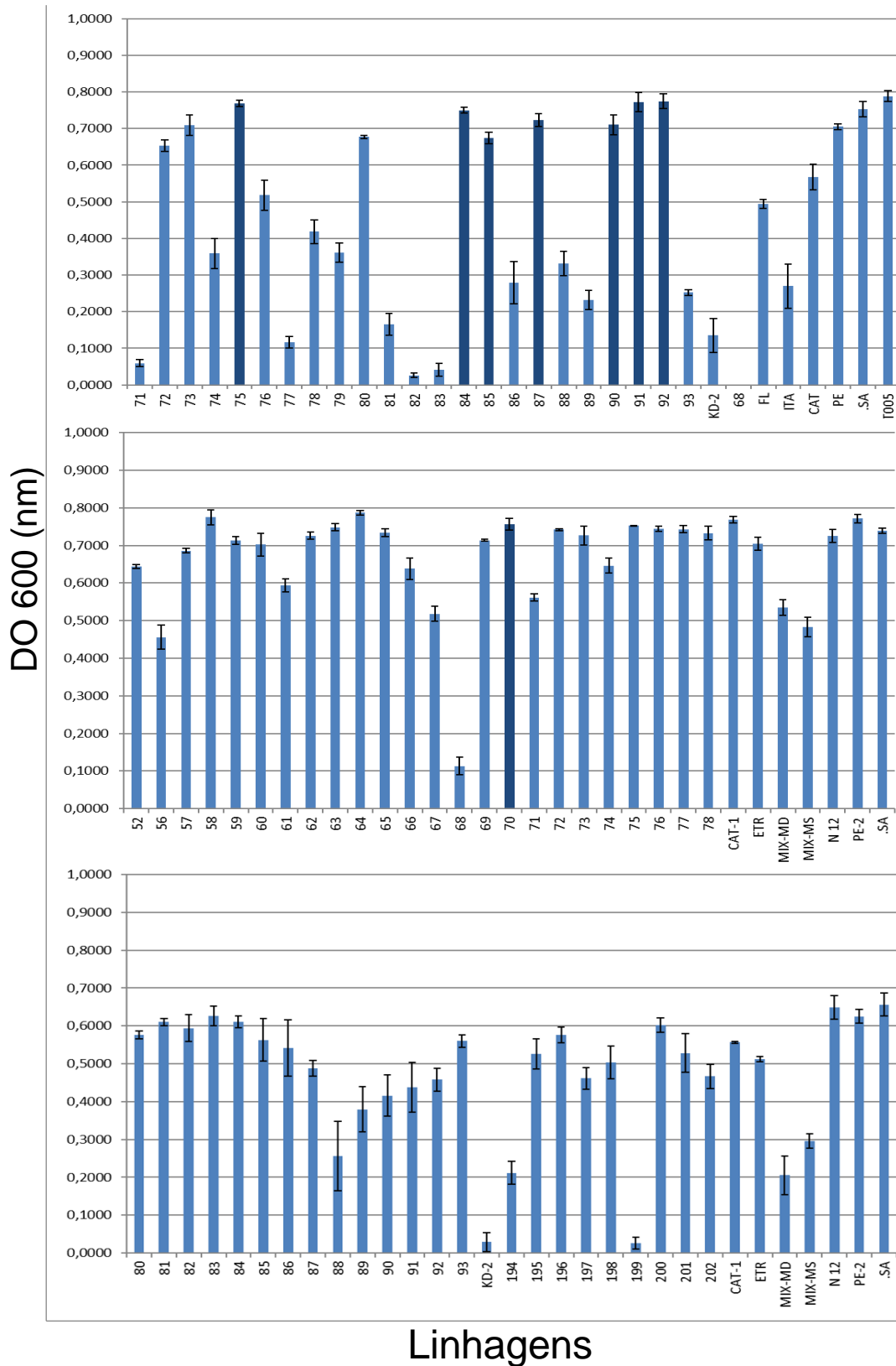


Figura 11: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

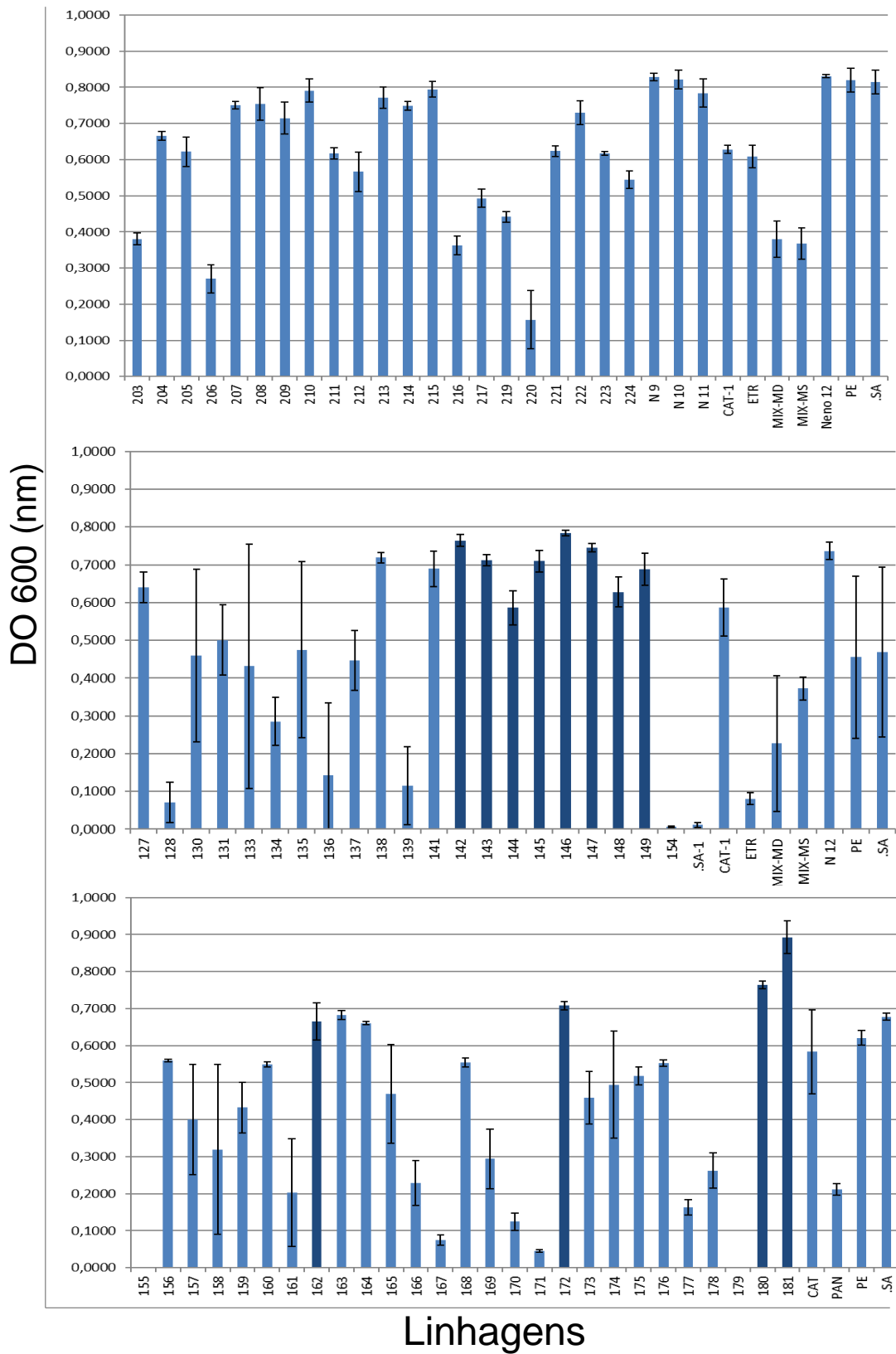


Figura 12: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

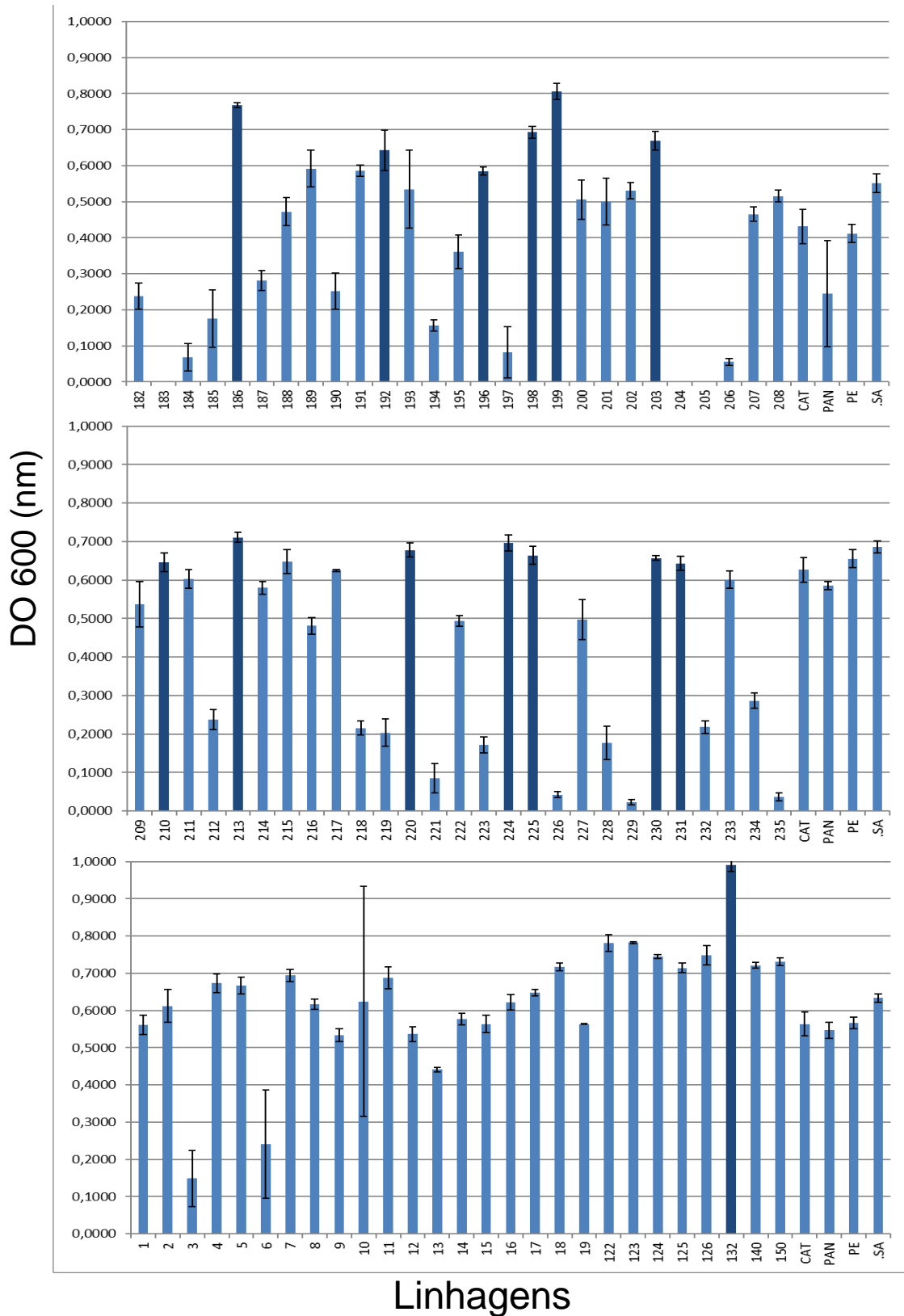


Figura 13: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.

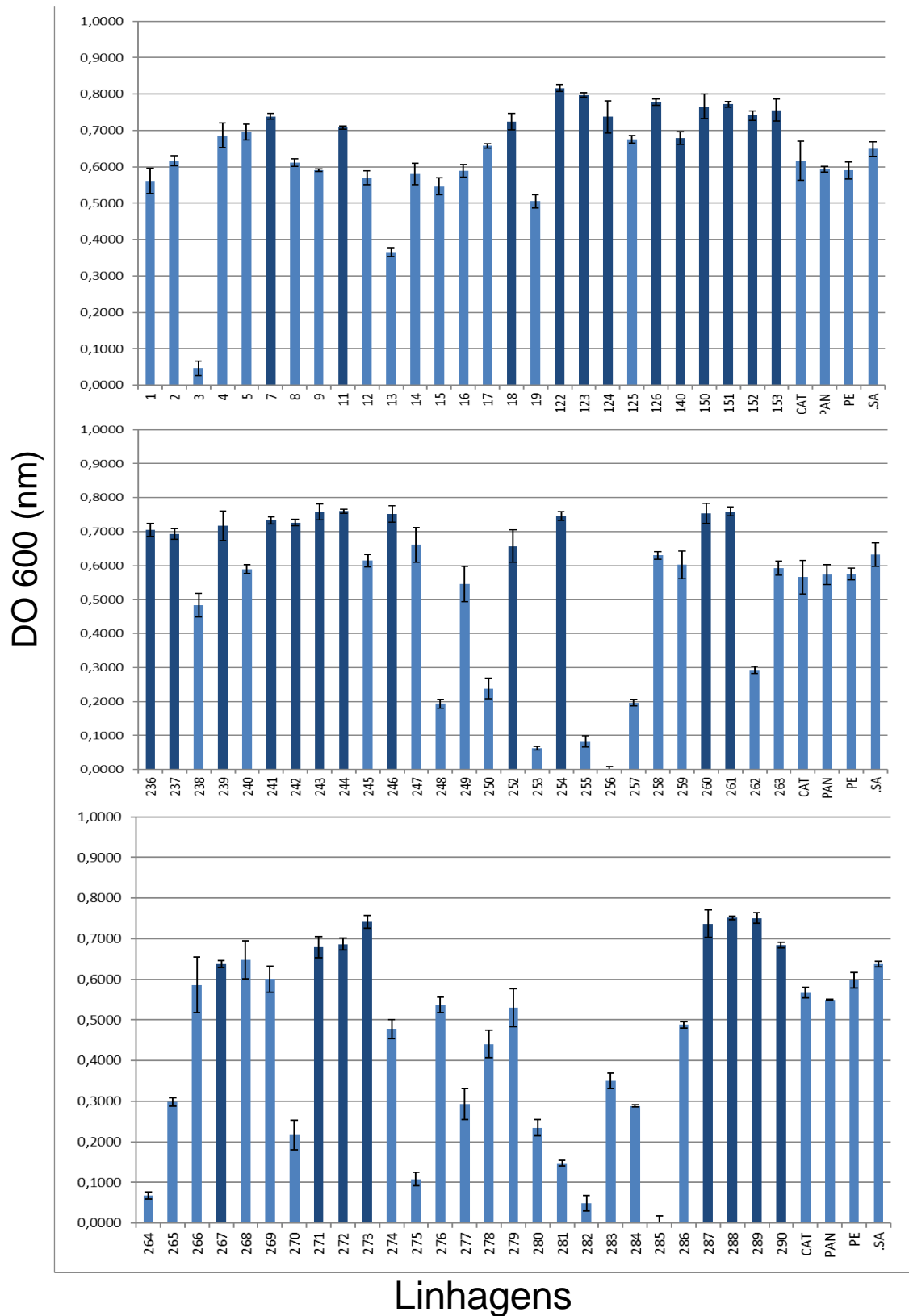


Figura 14: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

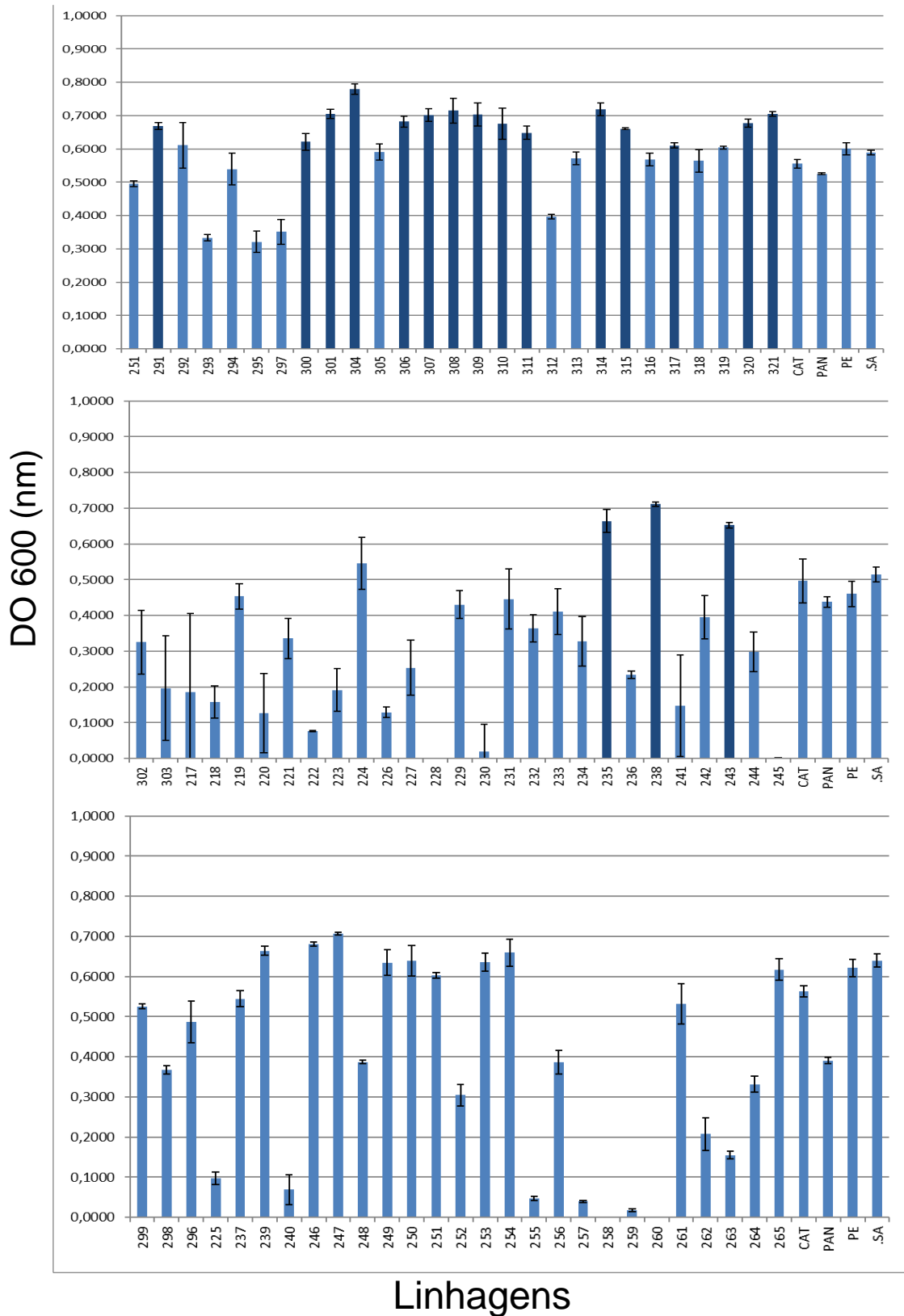


Figura 15: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.

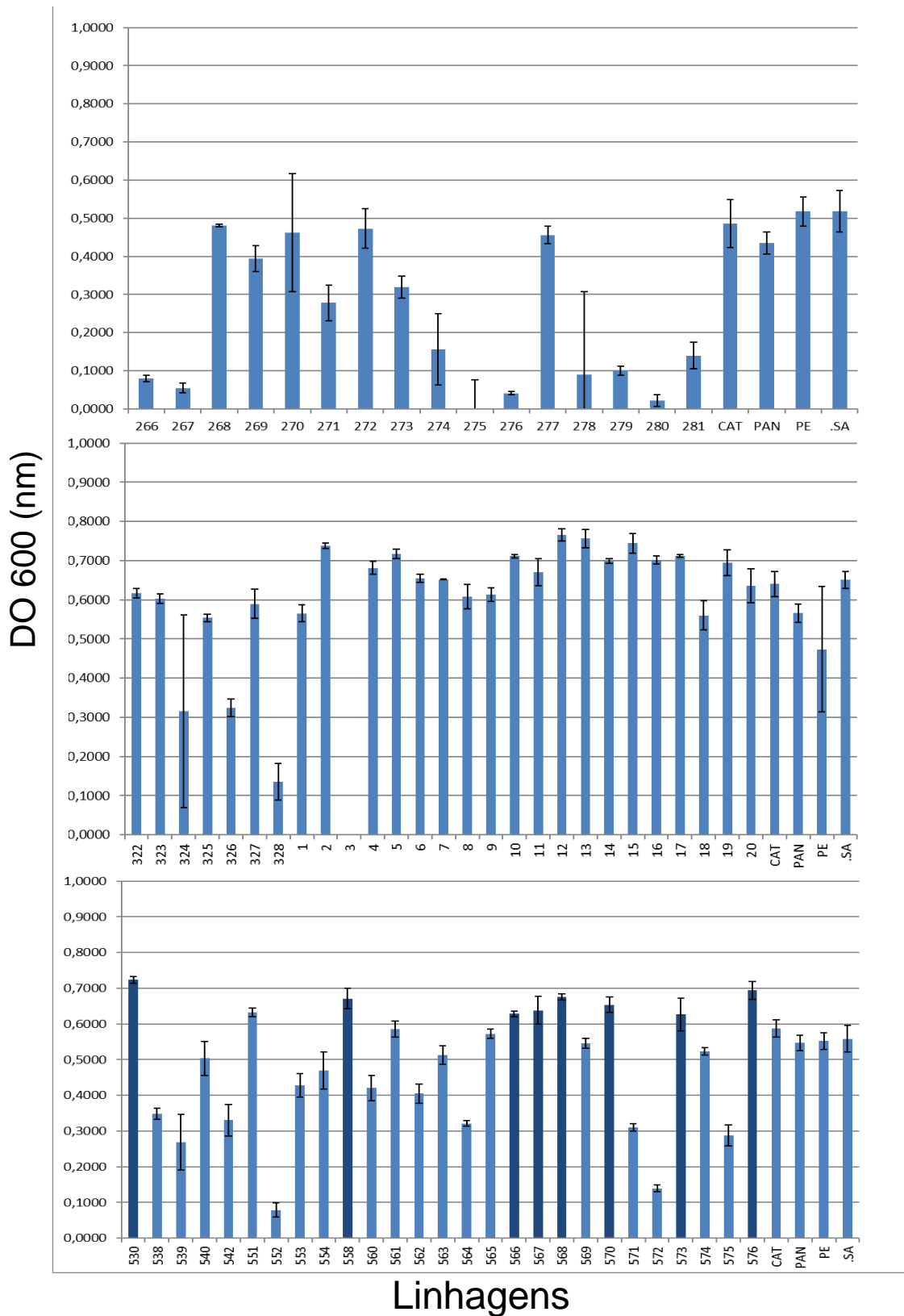


Figura 16: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

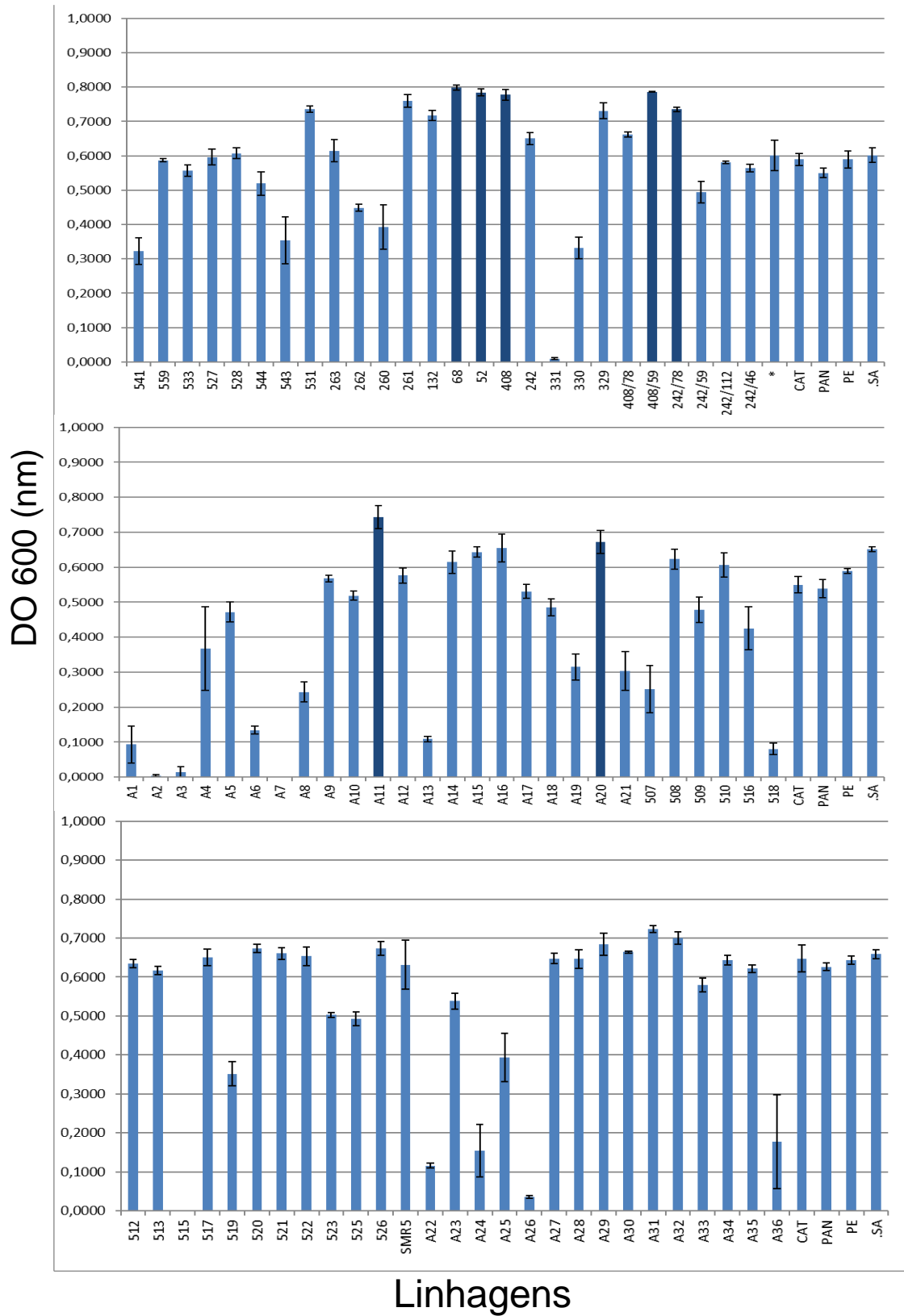


Figura 17: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.

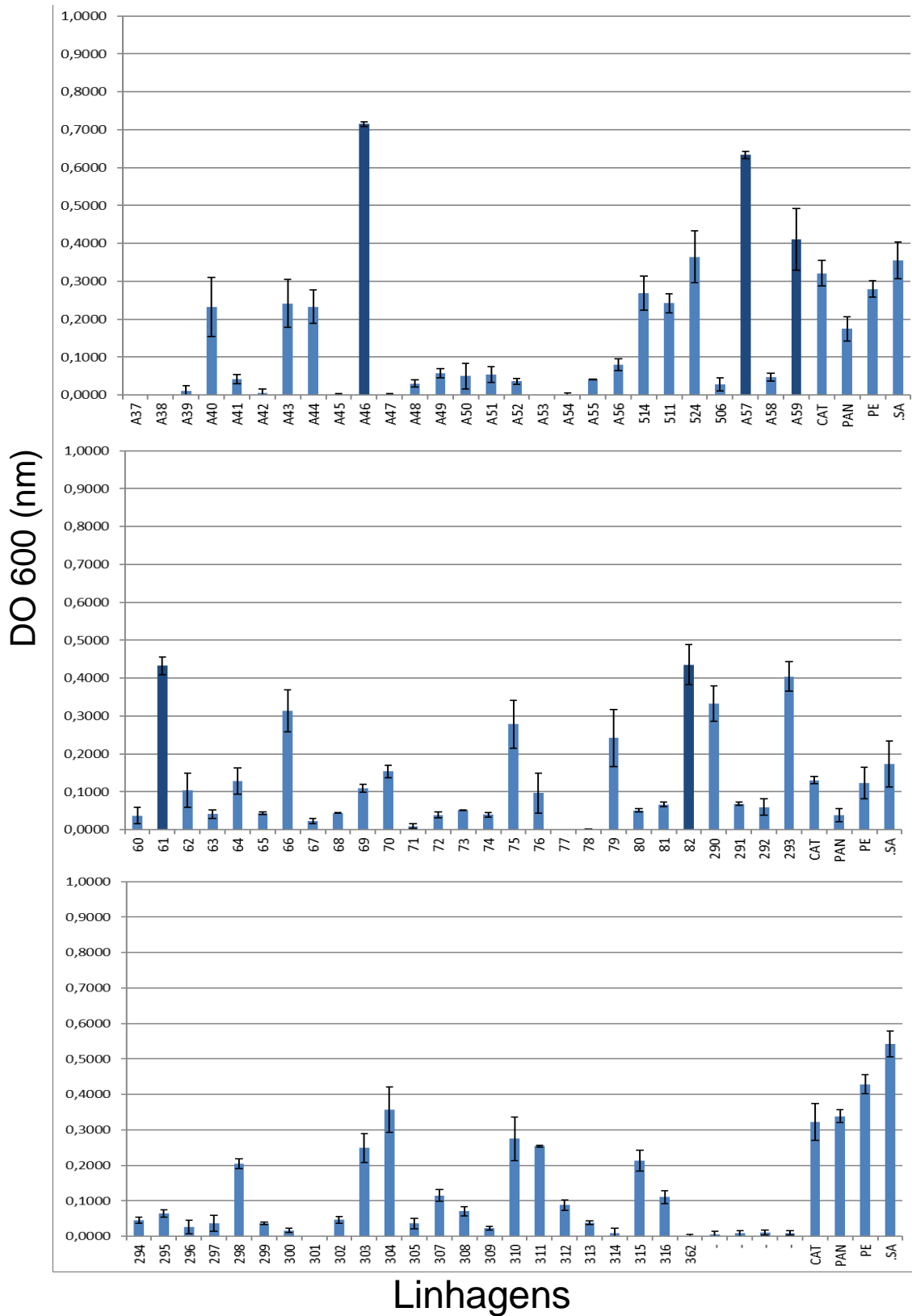


Figura 18: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

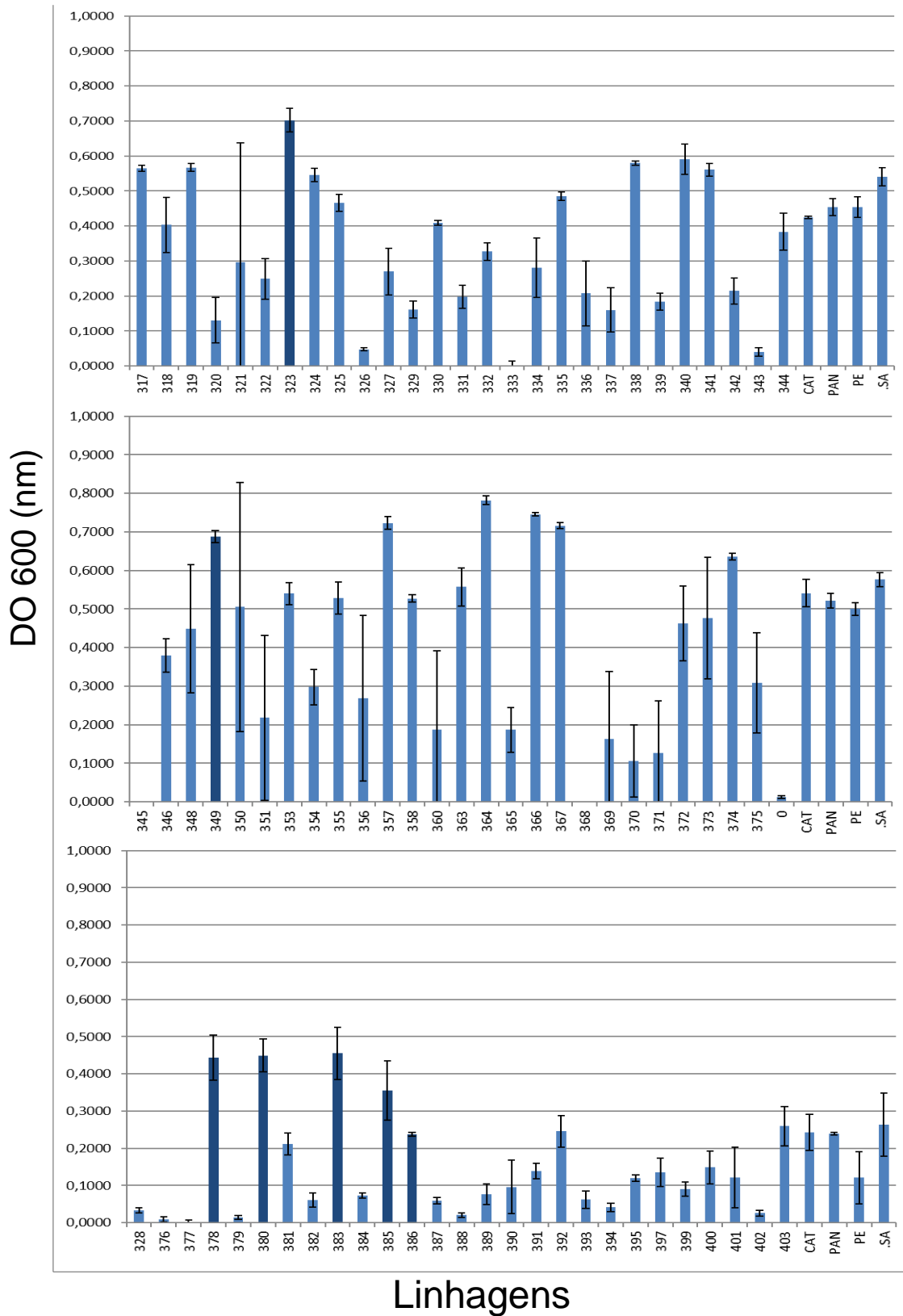


Figura 19: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.

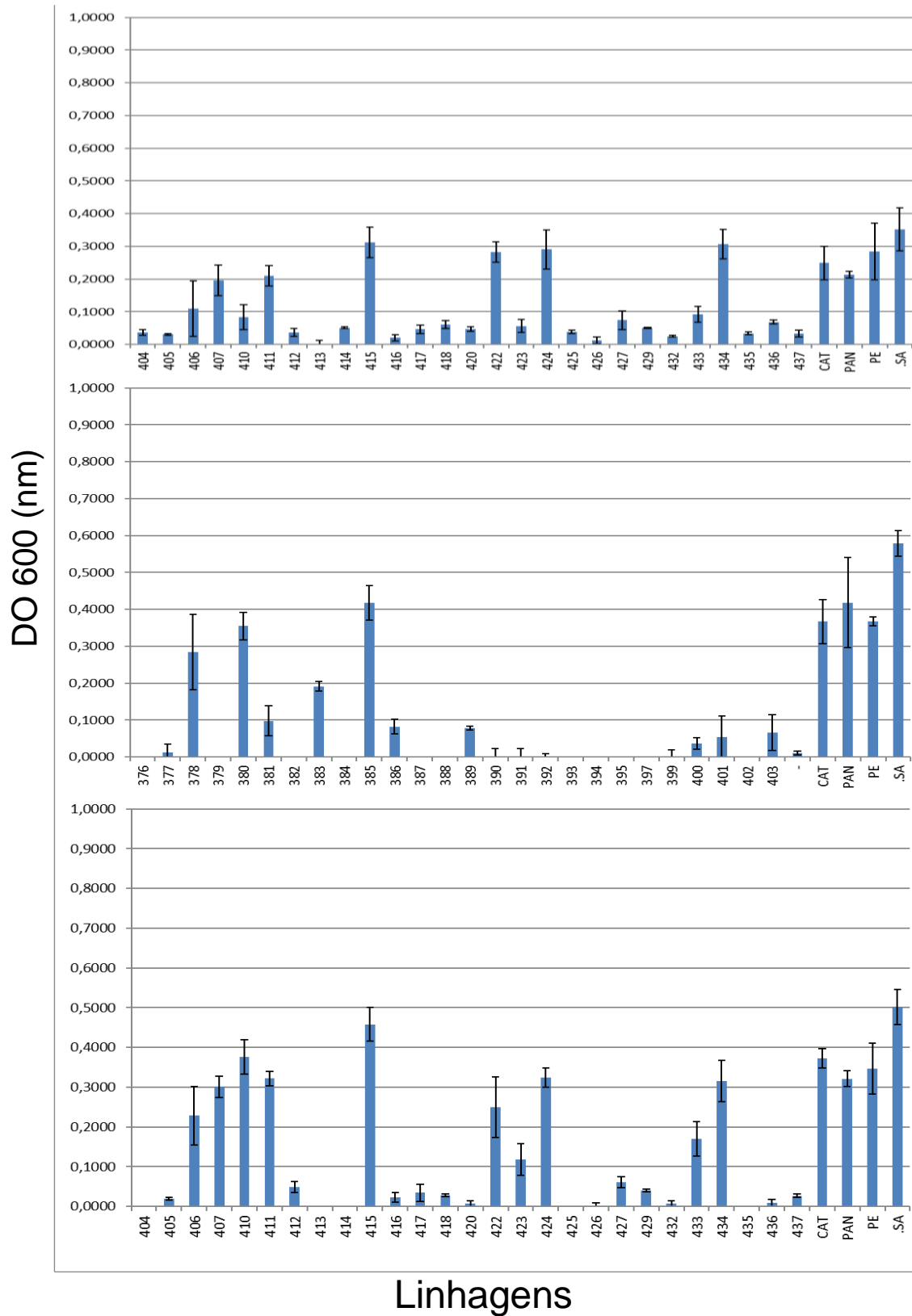


Figura 20: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

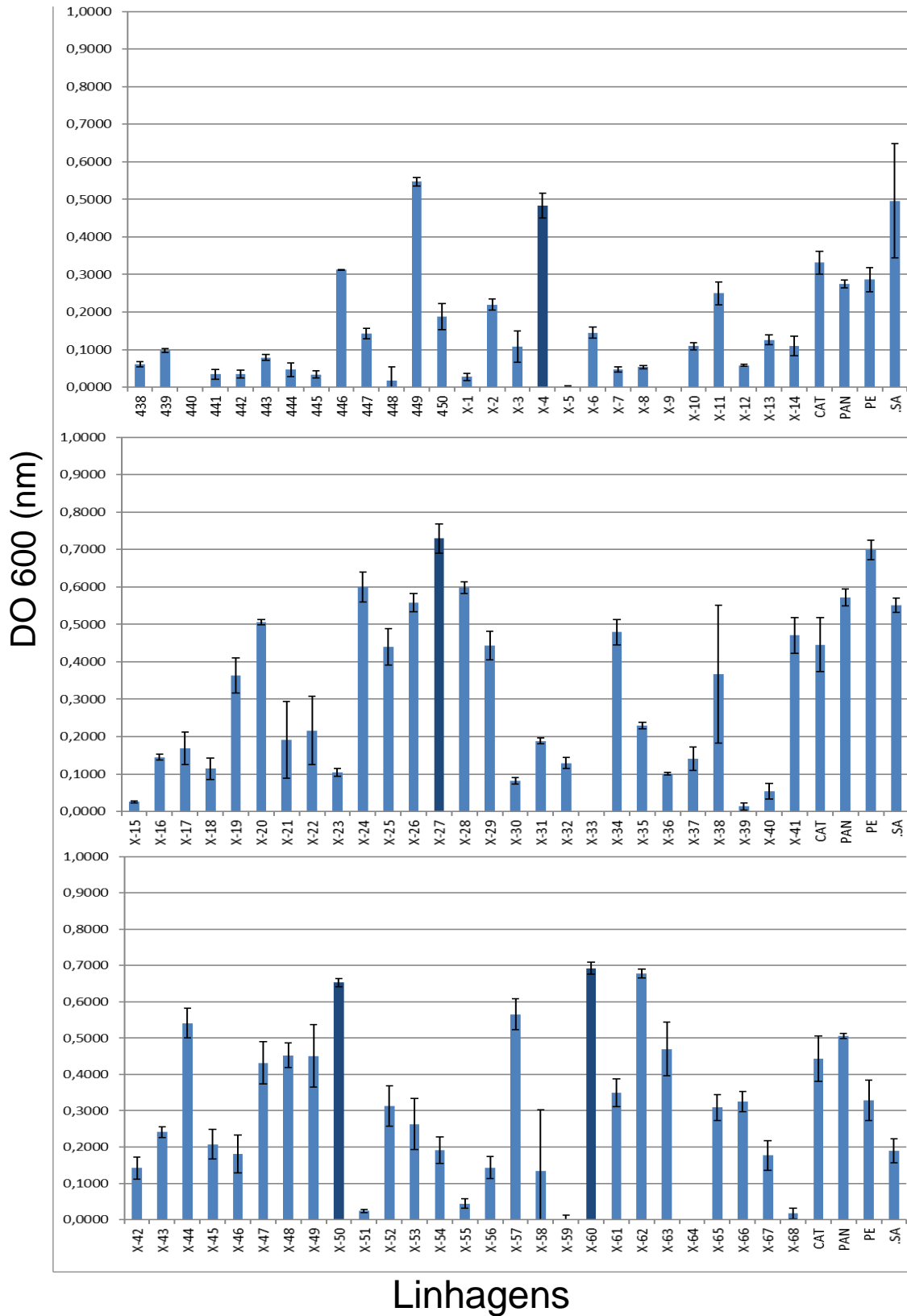


Figura 21: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.

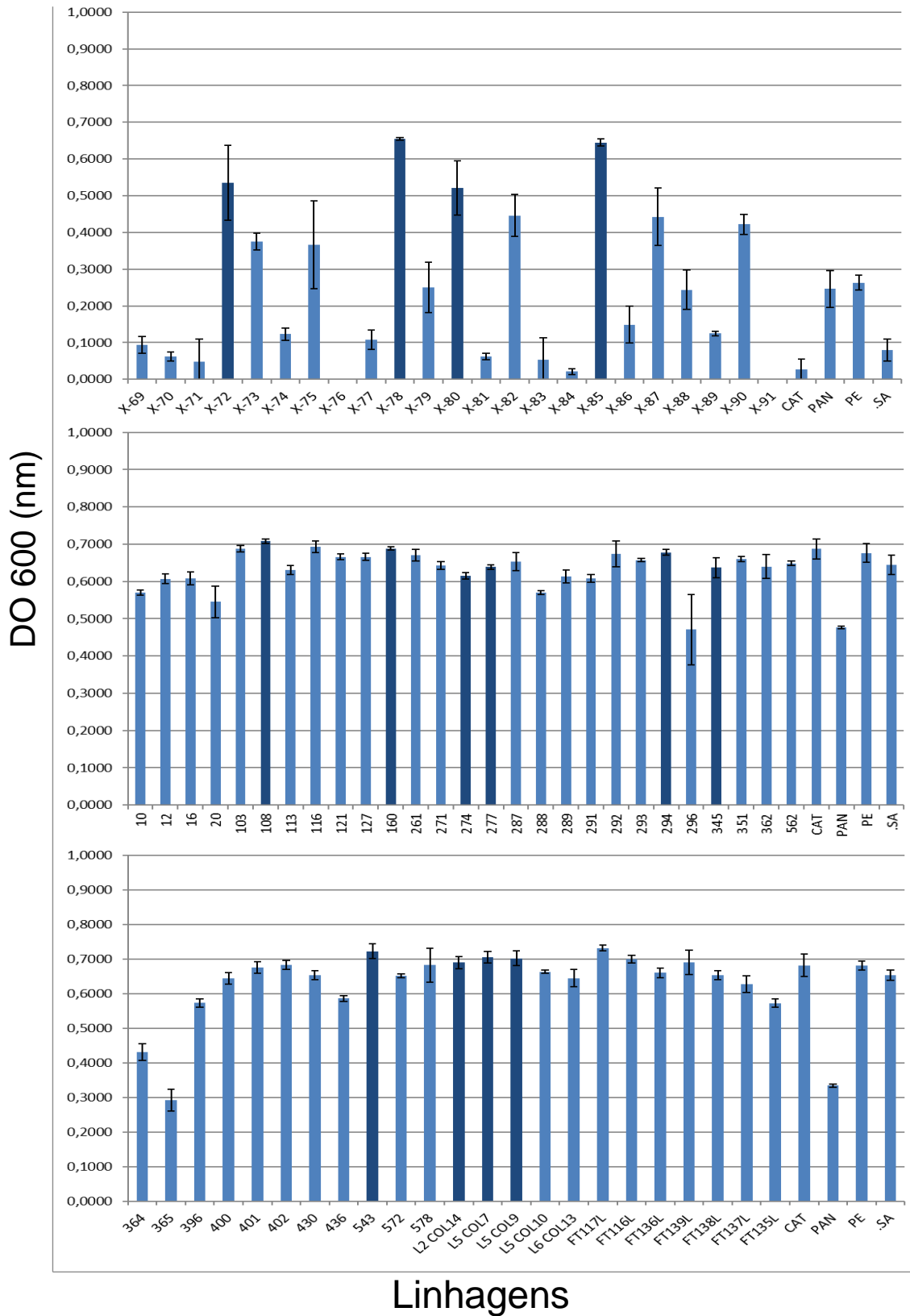


Figura 22: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

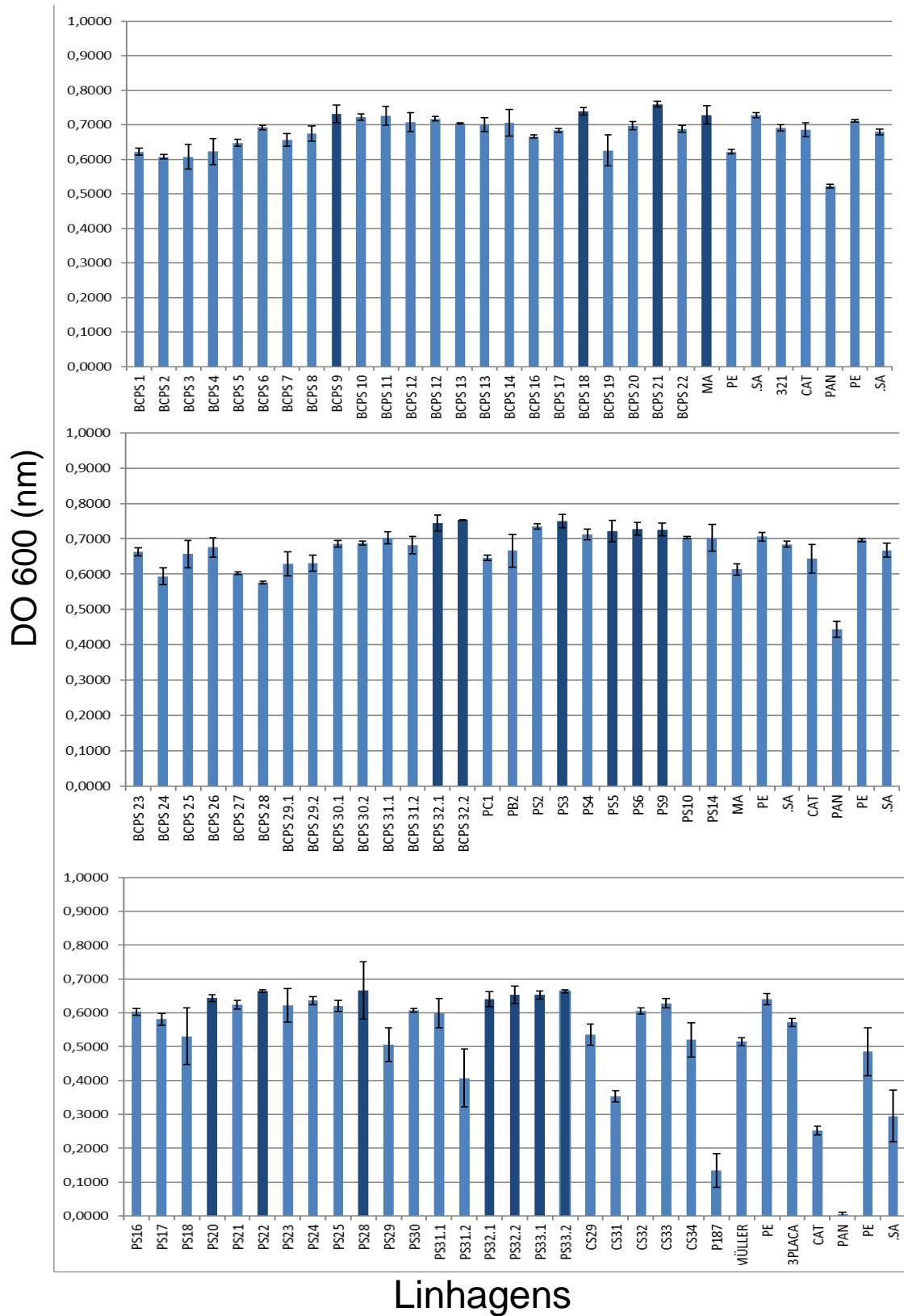
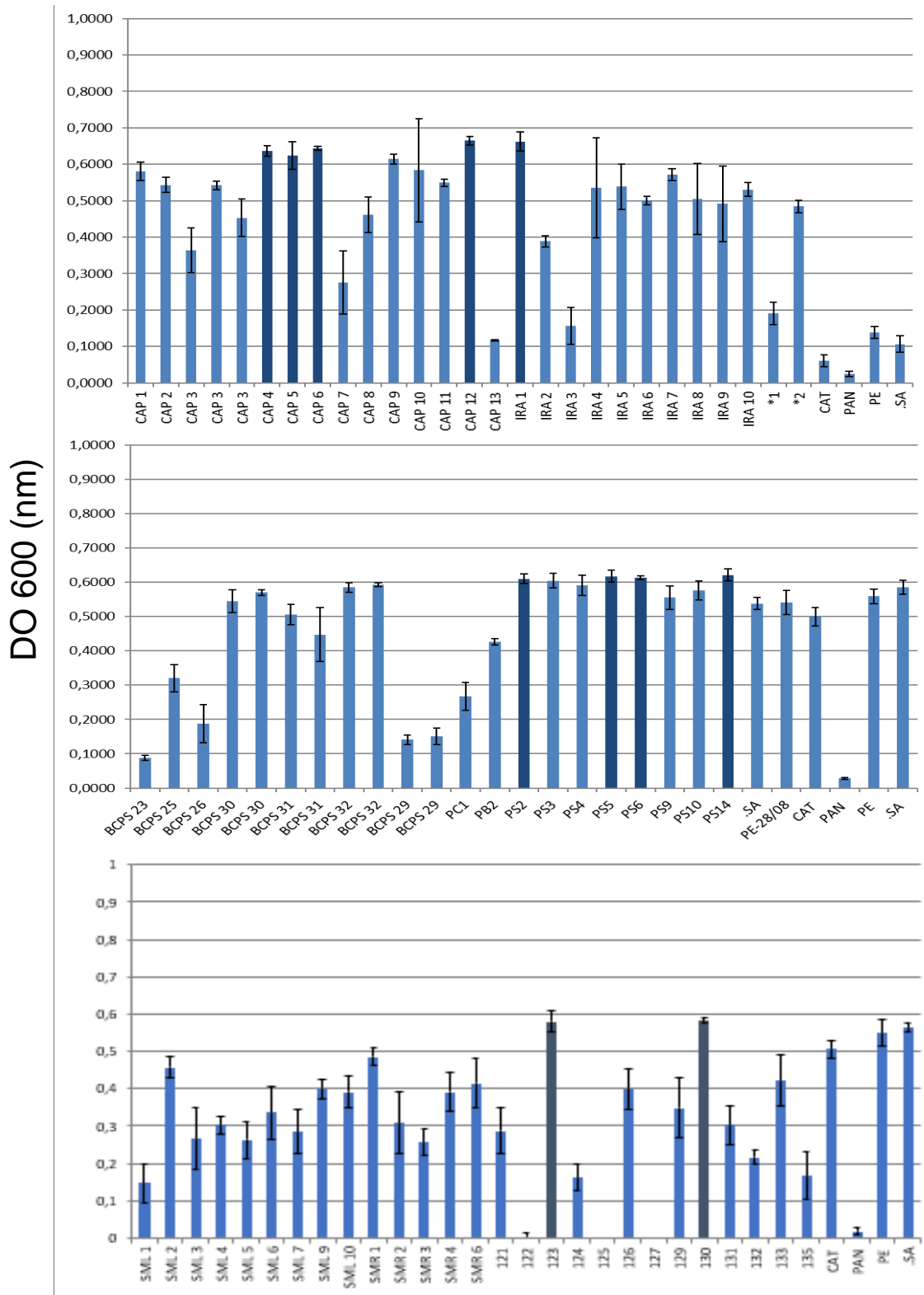


Figura 23: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.



Linhagens

Figura 24: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

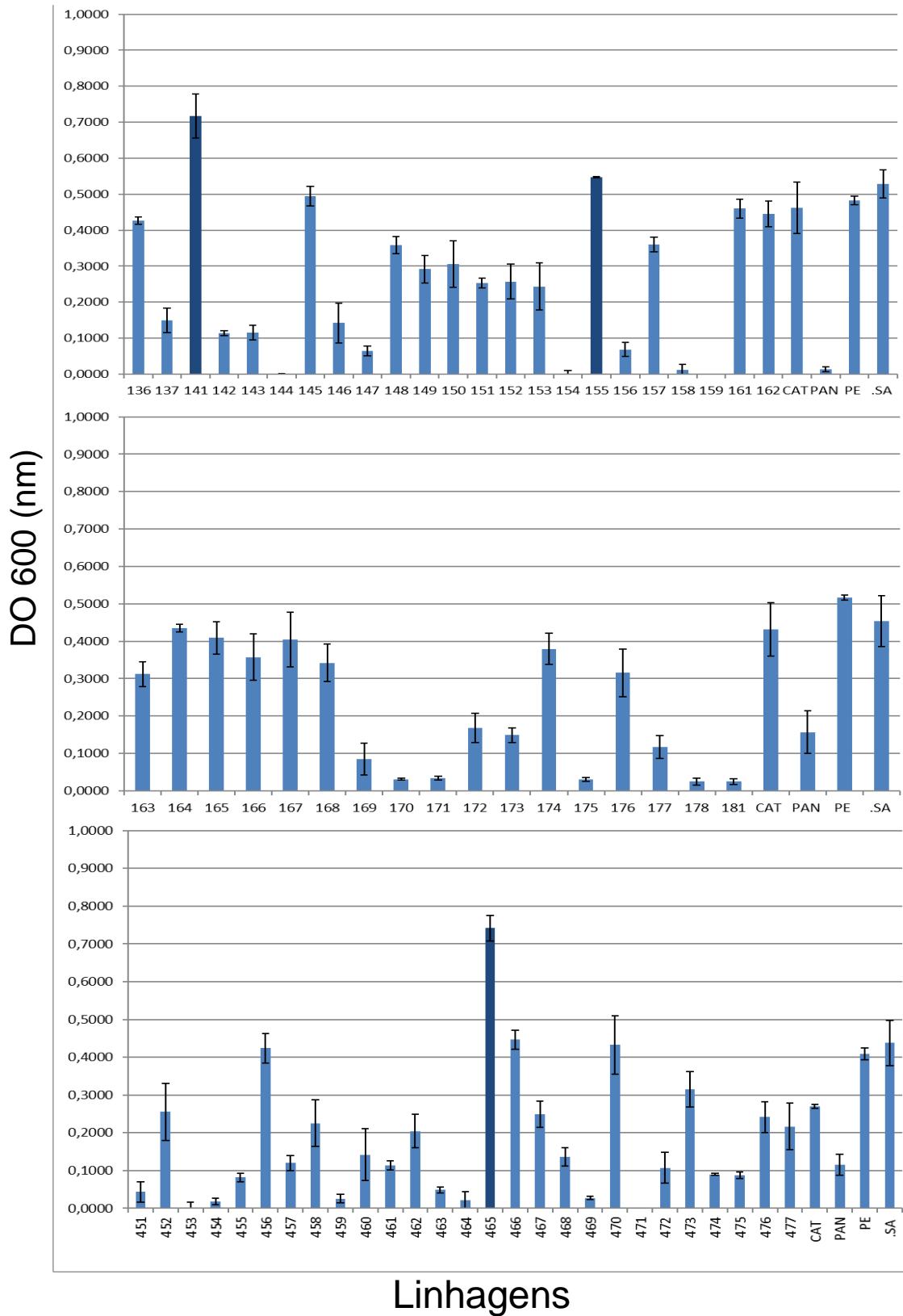
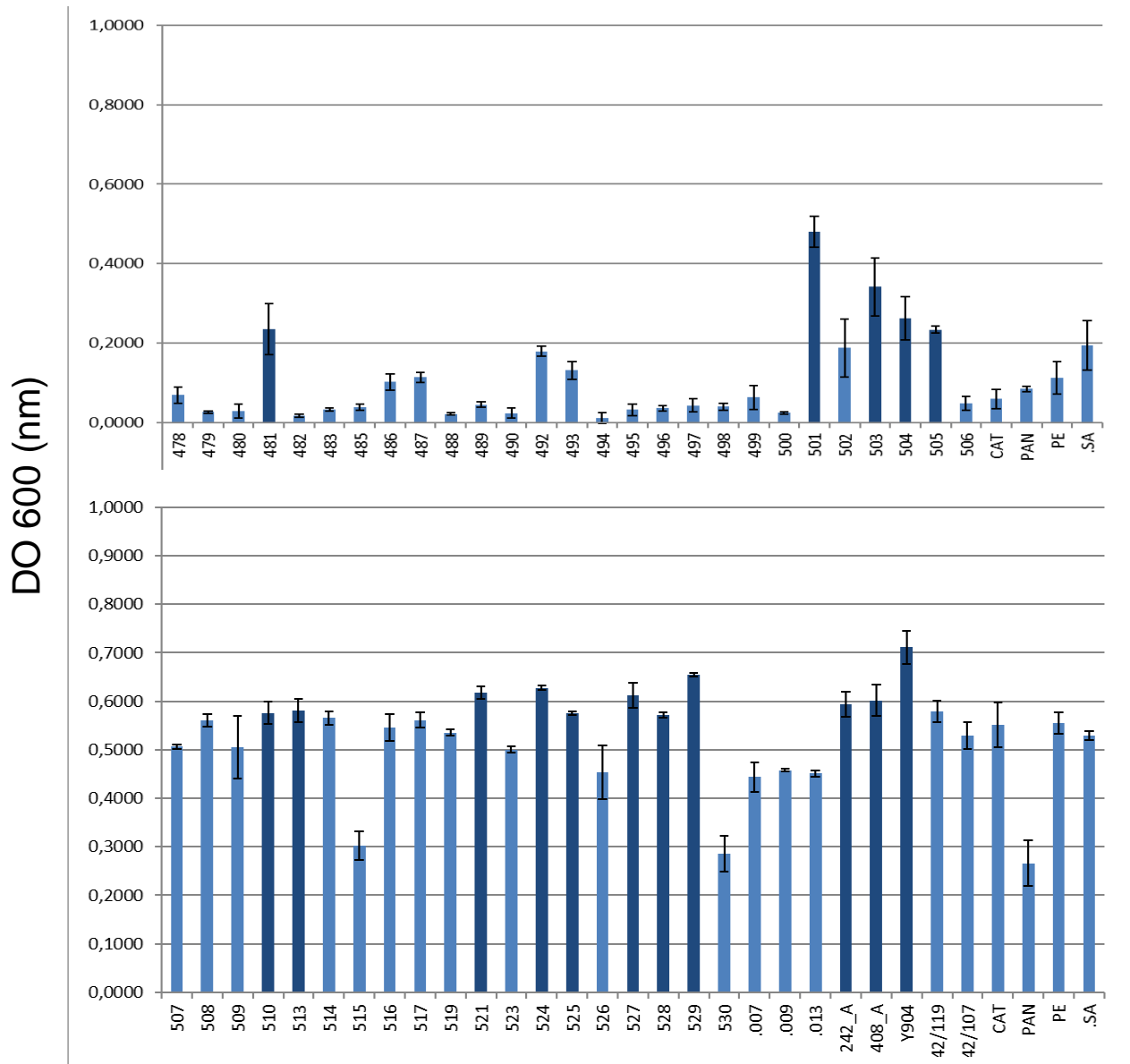


Figura 25: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) seleccionadas destacadas em barra mais escura.



Linhagens

Figura 26: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO_{600nm}) em 24 horas das linhagens do banco, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

5.3. Segundo “screening” das linhagens tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico

Devido a primeira seleção de linhagens ter resultado na obtenção de 188 linhagens com crescimento satisfatório, houve a necessidade de realizar uma nova

seleção, devido ao grande número de linhagens e limitações impostas pelas etapas seguintes, para isso, utilizou-se o mesmo meio acrescido de 1g/L de furfural, para que pudéssemos ter um número menor de linhagens para a próxima etapa de seleção, foi utilizado o mesmo método de seleção por crescimento em microplaca, através do Tecan (GENios microplate reader). As células foram inoculadas em placas com 96 poços (10 μ l de inóculo para 90 μ l de meio contendo melaço e hidrolisado) em triplicata, chegando a um total de 27 linhagens, 4 linhagens referência e 1 branco (somente o meio) (figuras 27 a 31). A análise realizada pelo Tecan foi a mesma descrita no item 5.2.

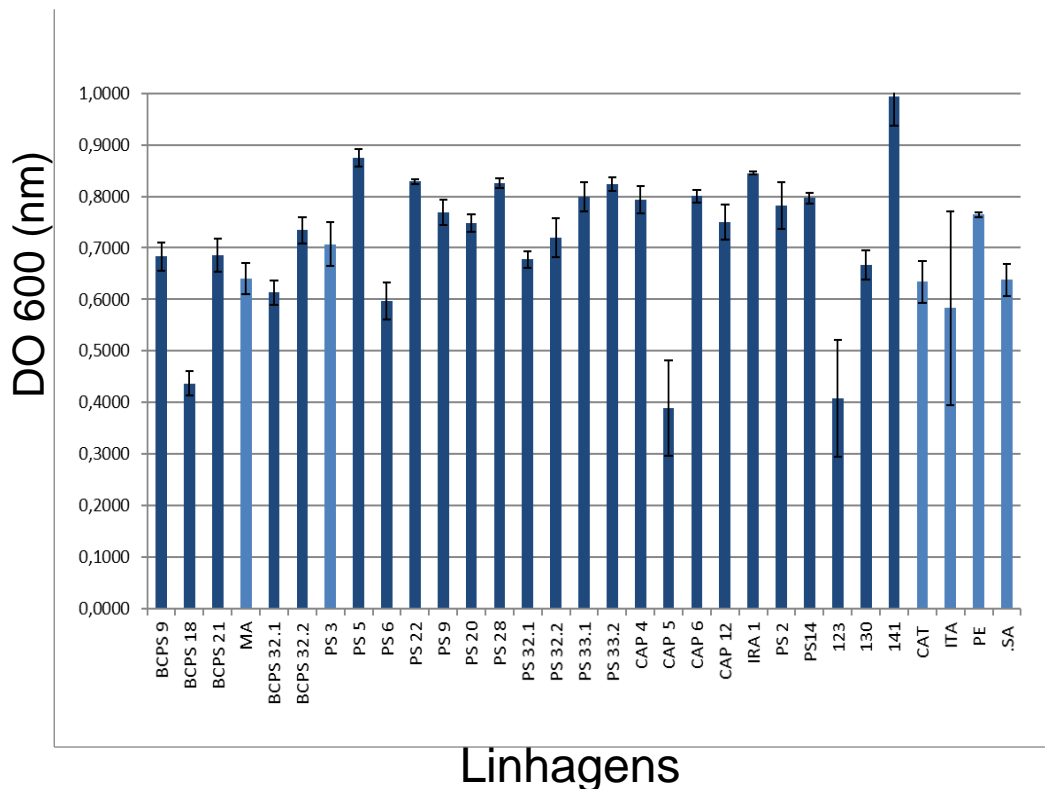


Figura 27: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na primeira seleção, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, ITA (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

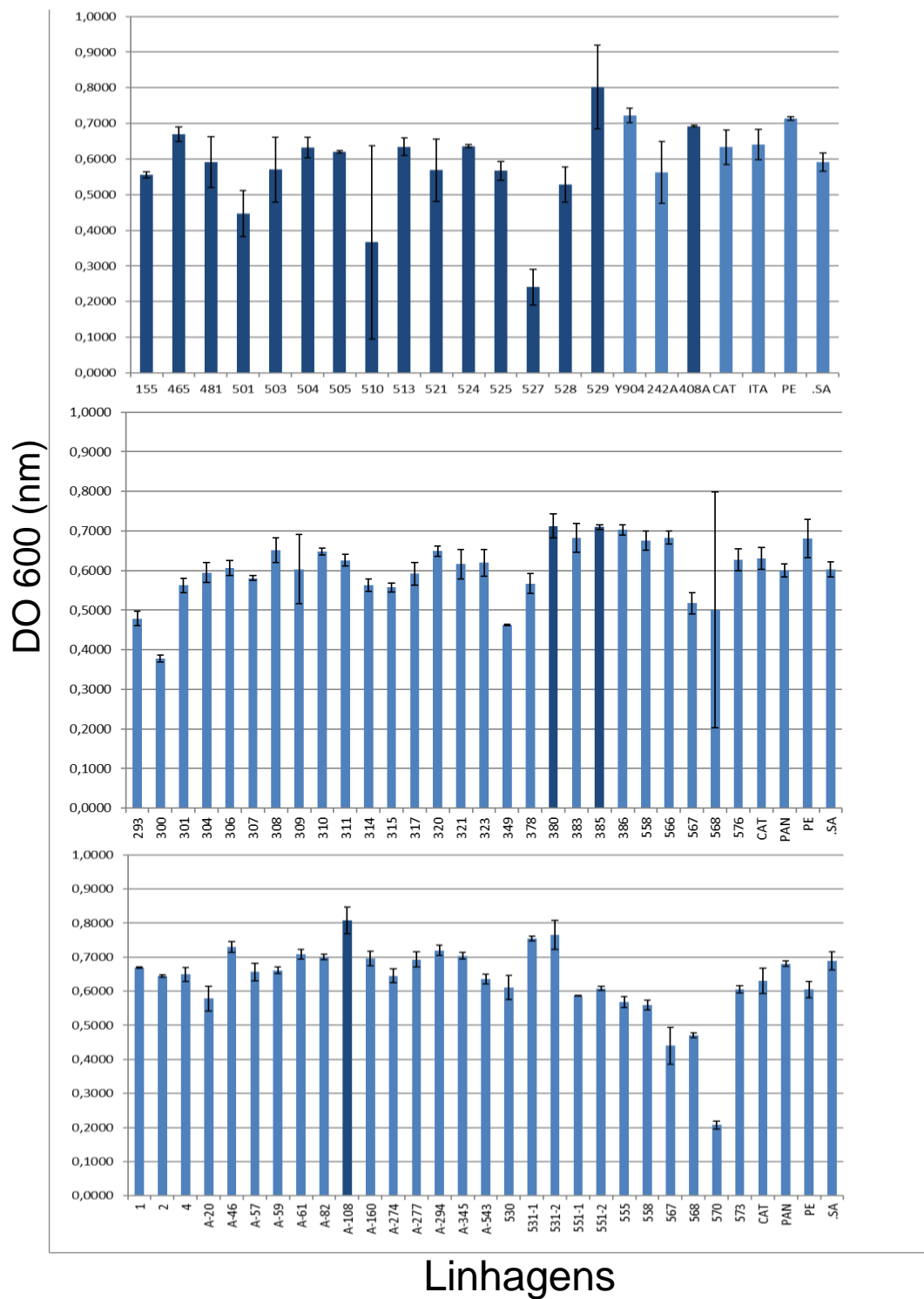


Figura 28: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na primeira seleção, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, ITA (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

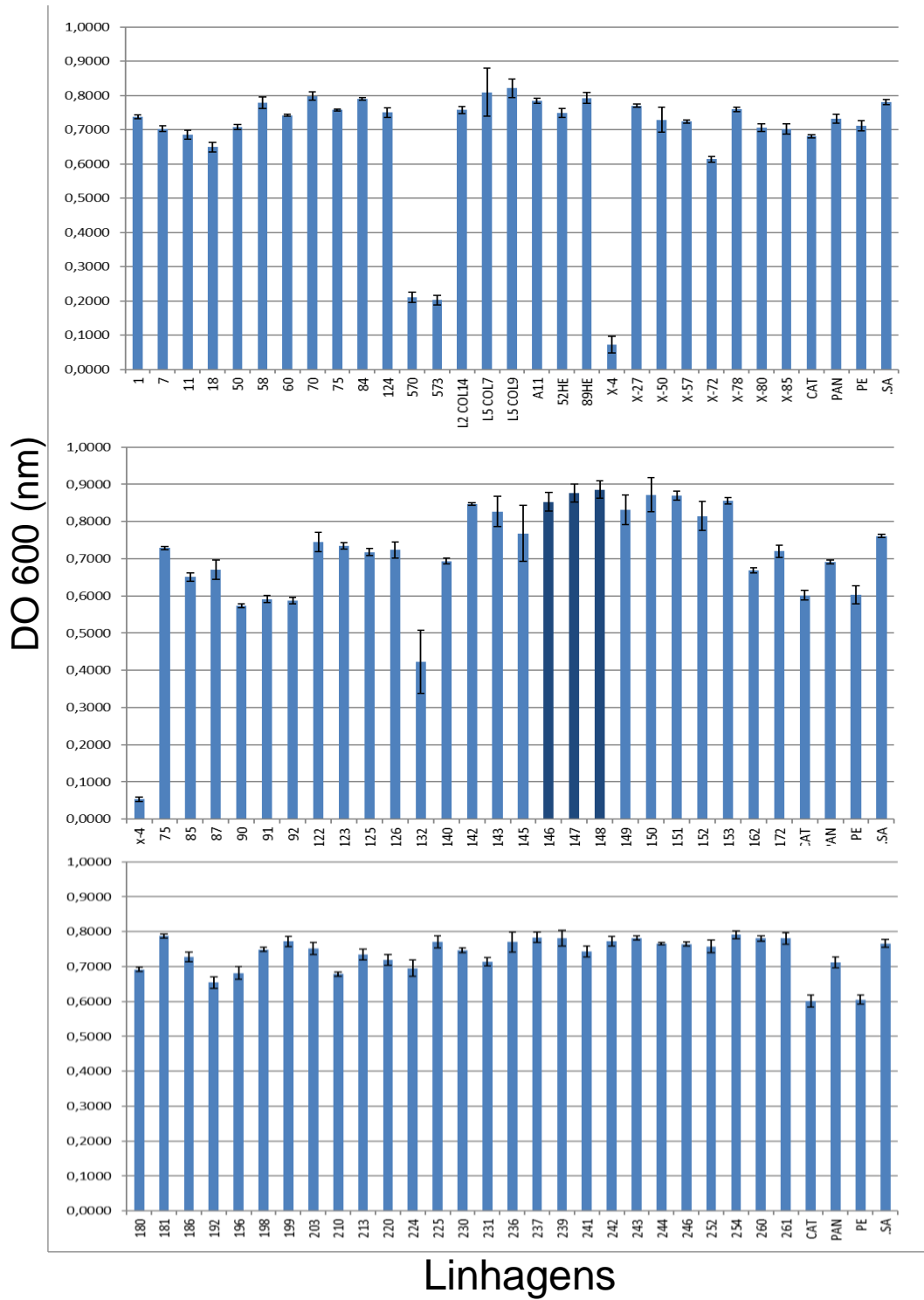


Figura 29: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na primeira seleção, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, ITA (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

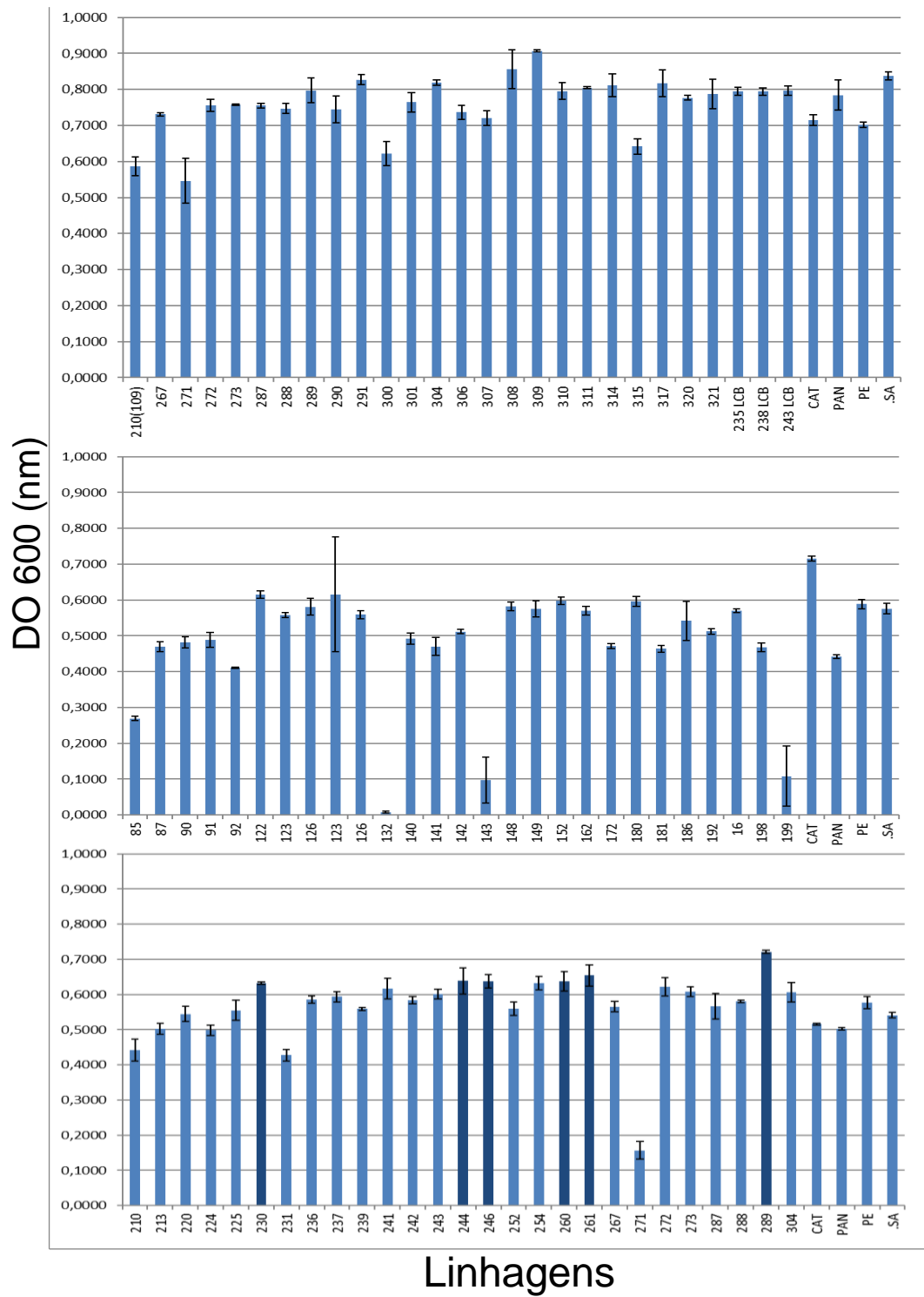


Figura 30: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na primeira seleção, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, ITA (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

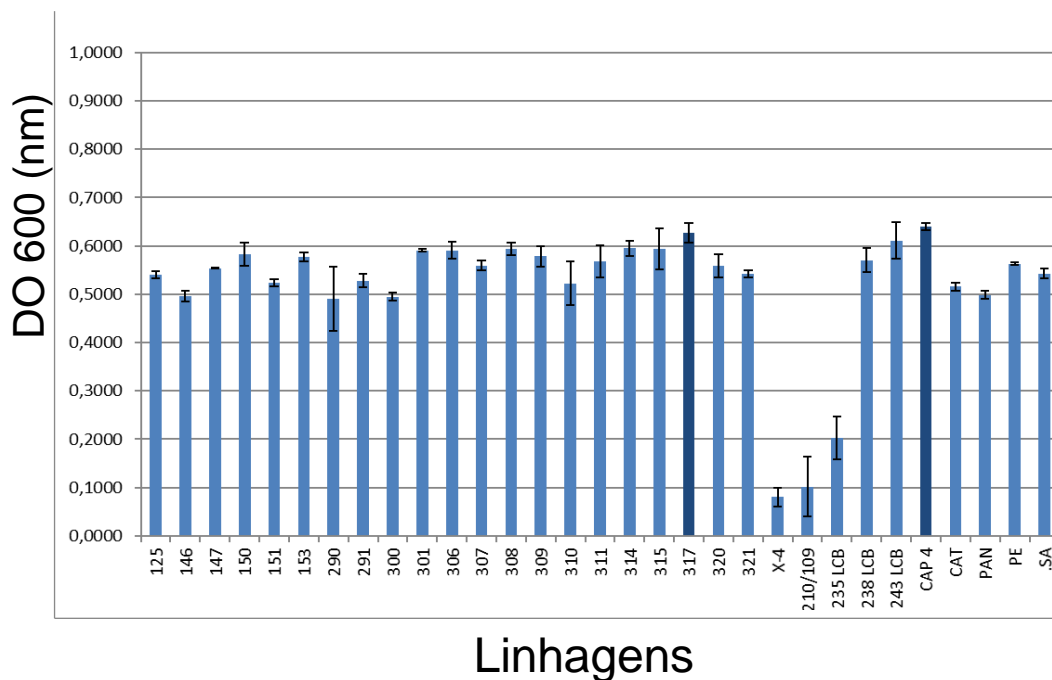


Figura 31: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na primeira seleção, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, ITA (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

As linhagens selecionadas no segundo “screening”, passaram por um processo de purificação, a fim de garantir que não houvesse interferências na seleção, por outro microrganismo que pudesse crescer juntamente a levedura no meio de seleção, para isso, as linhagens foram estriadas em placa petri, contendo meio YPD-A mais antibiótico Ampicilina com concentração de 100 ppm. Foram resgatadas colônias, através da retirada de uma porção da colônia, com ajuda de um palito de madeira esterilizado e transferido para um microtubo de 1,5 mL, contendo 1mL de YPD, esse material foi incubado por 24 horas em B.O.D. a 28°C, as linhagens purificadas foram novamente submetidas a seleção em Tecan (GENios microplate reader), utilizando o mesmo meio utilizado no segundo screening.

5.4. Seleção de linhagens purificadas para fermentação com reciclo de células

Com o intuito de reduzir o número de linhagens selecionadas para a próxima etapa de seleção através de fermentação com reciclo, portanto, as linhagens purificadas, passaram novamente por uma seleção em Tecan (GENios microplate reader), utilizando o mesmo meio usado no segundo “screening”, segue gráficos

obtidos na última seleção (figuras 32 a 34).

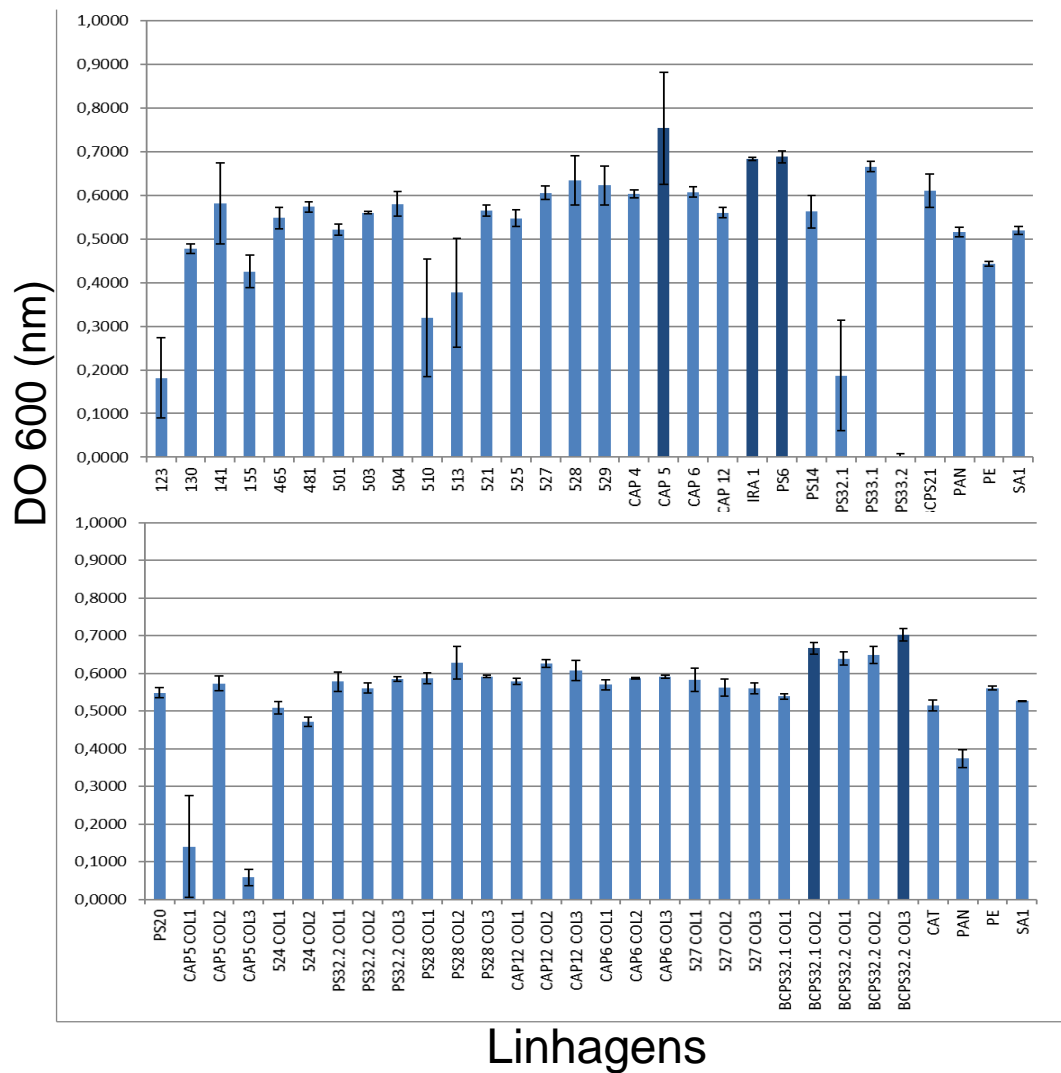


Figura 32: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na segunda seleção e purificadas, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

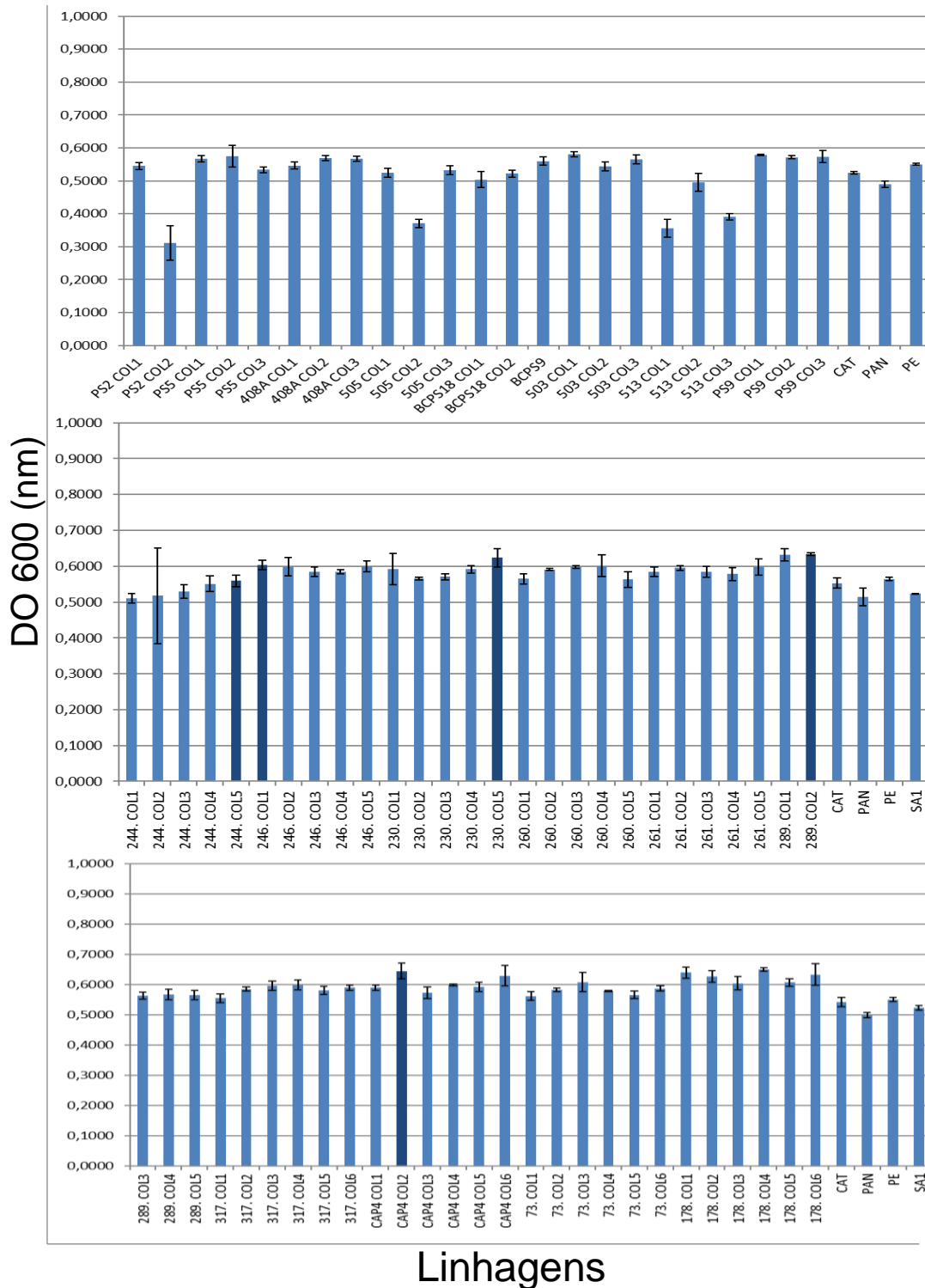


Figura 33: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na segunda seleção e purificadas, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

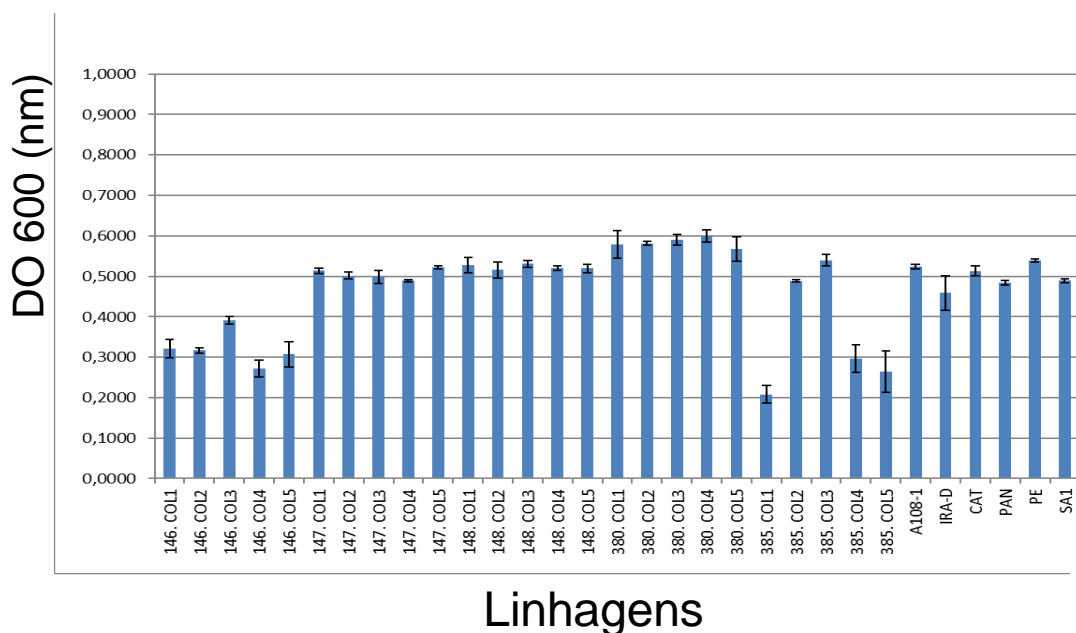


Figura 34: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas das linhagens selecionadas na segunda seleção e purificadas, comparadas ao crescimento das referências (CAT-1, PAN (panificação), PE-2 e SA-1) selecionadas destacadas em barra mais escura.

As dez linhagens que obtiveram melhores crescimentos, comparadas as linhagens referências, foram selecionadas para a fermentação com reciclo (tabela 3).

Tabela 3: Linhagens selecionadas para a fermentação com reciclo de células

Identificação	Linhagens
BCPS 32.1	Cruzamento BG x CAT x PE x SA
BCPS 32.2	Cruzamento BG x CAT x PE x SA
CAP4 Col 2	Capuava colônia 2
CAP5	Capuava
IRA1	Iracema
PS6	Cruzamento PE x SA
230 Col 5	Itapira P294 C7 colônia 5
244 Col 5	Creciumal C1 colônia 5
246 Col 1	Creciumal C2 colônia 1
289 Col 2	Passatempo P132 C8 colônia 2

5.5. Fermentação com reciclo de células

A partir da triagem anterior, as linhagens que obtiveram maior crescimento em meio seletivo foram submetidas a ensaio fermentativo com reciclo de células, objetivando simular o processo utilizado por grande parte das usinas (HENRIQUE, 2017), utilizando-se o mesmo meio empregado anteriormente, descrito na tabela 1, acrescido de 1g/L de furfural, com o intuito de destacar linhagens com maior tolerância aos inibidores presentes no meio, encontrados no mosto utilizado nos processos de etanol de segunda geração (CGEE, 2005), os ensaios de fermentação foram conduzidos em tubos de centrifuga com capacidade para 15mL, previamente identificados e tarados.

Foram feitos quatro reciclos, sendo o último reciclo obtido os seguintes resultados.

Tabela 3: Valores referentes a análises feitas com o vinho e levedura no final do último ciclo de fermentação, linhagens selecionadas em destaque.

	LINHAGEM	DESPRENDIMENTO DE CO ₂ (g)	VIABILIDADE (%)	TREALOSE (%)
1	CAP4	0,26	100	3,33
2	CAP5	0,16	53	1,12
3	IRA1	0,23	94	2,82
4	BCPS32.1	0,15	74	0,46
5	BCPS32.2	0,20	78	0,27
6	P56	0,26	75	0,77
7	230	0,19	76	0,53
8	244	0,28	73	0,7
9	246	0,26	77	0,77
10	289	0,11	35	0,13
11	PE-2	0,21	64	0,26
12	SA-1	0,16	52	0,84

As linhagens foram selecionadas de acordo com os valores de desprendimento de CO₂, que foi obtido através da pesagem dos tubos de centrifuga, onde o valor do tubo no início da fermentação foi retirado do valor pesado no final da fermentação, quando há redução no peso do tubo indicando o desprendimento do CO₂, podemos

relacionar a produção de etanol, uma vez que os valores são proporcionais, a viabilidade celular, foi feita no final da fermentação, de acordo com o procedimento descrito no item 4.5.2., e a trealose através de cromatografia líquida.

Os parâmetros escolhidos para seleção das linhagens apresentam características interessantes para leveduras que foram empregadas a processos fermentativos, uma vez que observado o desprendimento de CO₂, significa que a levedura possui a capacidade de fermentar os açúcares presentes no meio, mesmo que não signifique que ela tenha metabolizado a xilose presente no hidrolisado, o desprendimento de CO₂ mostra que a levedura não sofreu inibição do processo fermentativo.

Quanto a viabilidade celular, ela se manter com boas taxas, prova que a linhagem é resistente aos estresses tanto dos inibidores do hidrolisado, quanto ao estresse da fermentação com reciclo de células.

E por último o acúmulo de trealose é um indicativo que a levedura está passando por um processo de estresse fisiológico (ATTFIELD, 1987), pois quando a trealose se liga a membrana da célula, sua integridade é mantida e consequentemente sua viabilidade celular (ALCARDE e BASSO, 1997).

Sendo assim, foram selecionadas 3 linhagens, destacadas na tabela 4, a CAP4, IRA1 e 246 (que será identificada a partir de agora por CR, referente a sua origem), que apresentaram valores satisfatórios nos três parâmetros observados e utilizados para a seleção, desprendimento de CO₂ de 0,26g, 0,23g e 0,26g; viabilidade de 100%, 94% e 77% e trealose 3,33%, 2,82% e 0,77%, respectivamente, que quando comparados as linhagens referências se mostraram positivamente superiores, provando assim que as linhagens selecionadas tem uma resistência notável aos inibidores presentes no meio seletivo.

5.6. Dissecação de tétrades e obtenção dos haploides

A partir da fermentação com reciclo de células, foi possível selecionar entre as linhagens, as tolerantes aos inibidores encontrados no hidrolisado lignocelulósico (CGEE, 2005), assim como tolerantes aos estresses causados pela fermentação com reciclo de células, processo que é hoje em dia o mais utilizado pelas usinas (GÓES-FAVONI, MONTEIRO, *et al.*, 2018).

Para que as leveduras esporulem é necessário que elas sejam submetidas a

meio pobre de nutrientes, com isso, seu crescimento vegetativo é interrompido e as células formam esporos. Através da esporulação, são gerados haploides com diferenças fenotípicas (SILVELLO, 2016; EZOV, CHANG, et al., 2010).

Empregamos o processo de esporulação por meio líquido, as linhagens foram reativadas segundo protocolo descrito no item 4.2. e as culturas depois de reativadas foram transferidas para erlenmeyers de 50mL estéreis com 10mL de meio de esporulação (0,2% de rafinose, 0,03% de acetato de potássio, 2% de ágar) e foram colocadas sob agitação alta (210 rpm) a 28°C, durante todo o período de esporulação demonstrado nas tabelas 5 e 6.

A eficiência da esporulação e sua eficácia foi determinada através da contagem de células em câmara de Neubauer, onde foram contados números de ascos e de células encontradas na amostra, as porcentagens de esporulação obtidas e descritas nas tabelas 5 e 6, foram calculadas através da razão entre as tétrades encontradas pelo valor total de ascos contabilizados.

As linhagens CR e IRA, tiveram melhores taxas de esporulação, chegando a valores superiores a 80%, sendo a linhagem CAP a que obteve menor porcentagem de esporulação, chegando a no máximo 37%.

Tabela 4: Acompanhamento da esporulação das linhagens CR, CAP e IRA

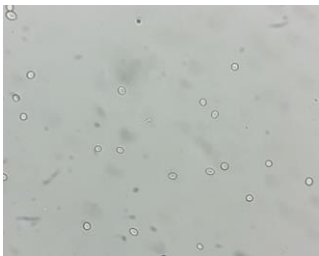
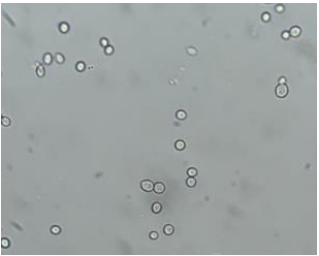
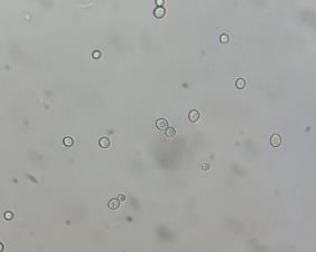

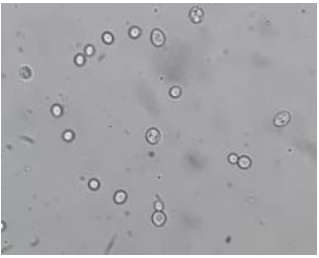
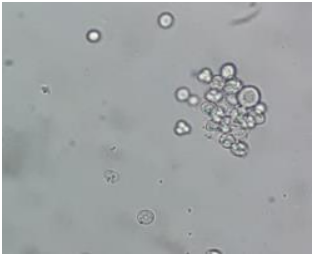
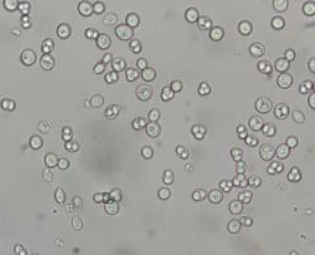
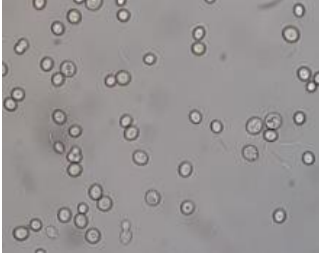
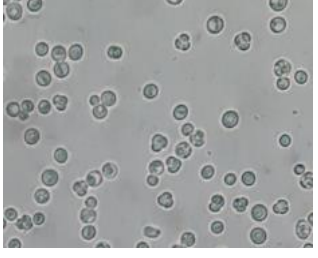
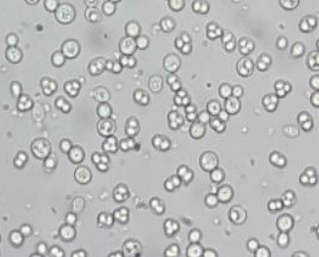
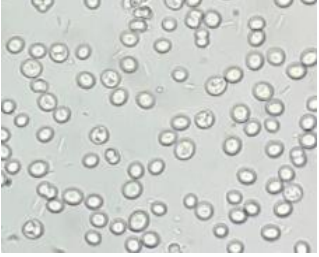

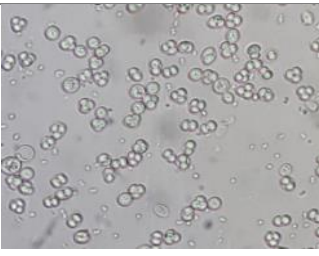
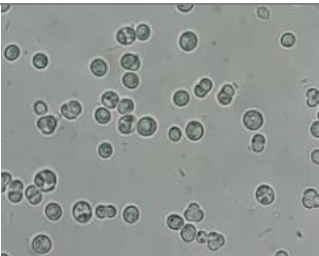
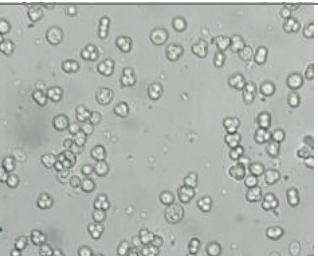
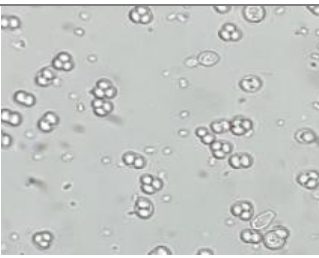
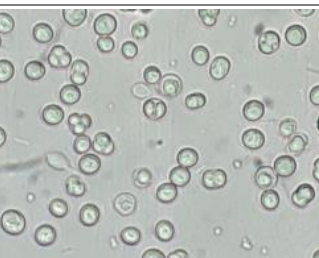
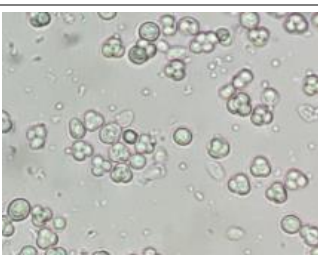
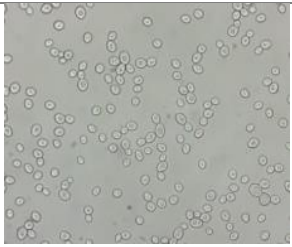
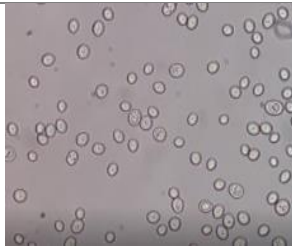
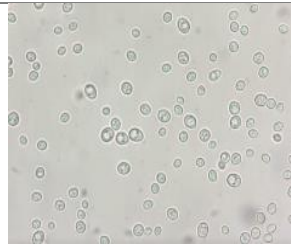
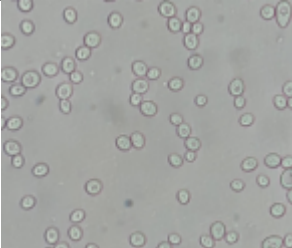
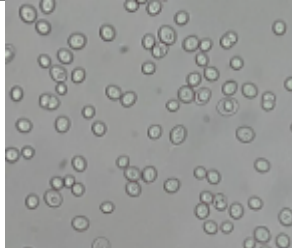
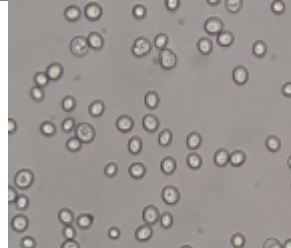
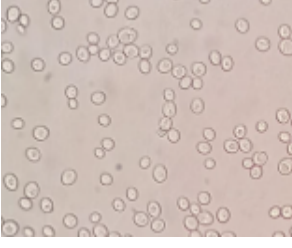
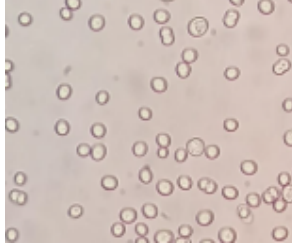
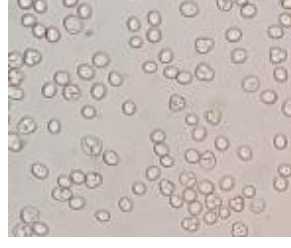
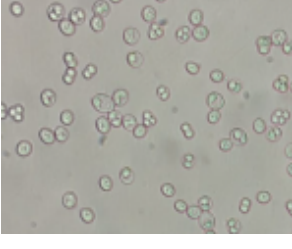
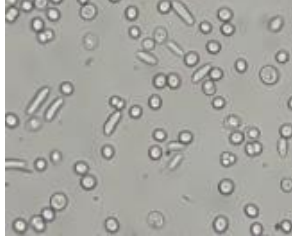

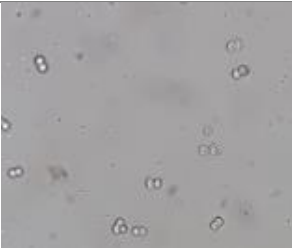

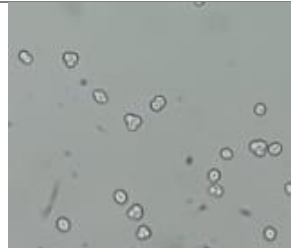
Tempo	1ª Esporulação			% Esporulação
	CR	CAP	IRA	
24h				
48h				
72h				CR: 55% CAP: 8% IRA: 18%
96h				CR: 60% CAP: 13% IRA: 34%
144h				CR: 82% CAP: 35% IRA: 62%
168h				CR: 90% CAP: 37% IRA: 87%

Tabela 5: Acompanhamento da esporulação das linhagens CR, CAP e IRA

Tempo	2ª Esporulação			%Esporulação
	CR	CAP	IRA	
72h				
144h				CR: - % CAP: 9,41% IRA: 2,81%
216h				CR: - % CAP: 10,47% IRA: 20,68%
288h				CR: 44,09% CAP: 19,4% IRA: 24,8%
312h				CR: 31,3% CAP: 13,9% IRA: 21,5%
360h				CR: 35% CAP: 9% IRA: 22%
480h				CR: 84% CAP: 27% IRA: 63%

A primeira parte da esporulação foi realizada no decorrer de 7 dias (tabela 5) e a segunda foi acompanhada por 20 dias, porém só foi observado esporulação a partir de 72h (3º dia), então a partir desse dia, acompanhamos a esporulação, conforme demonstrado na tabela 6, não sabemos os motivos que levaram a esporulação na segunda vez demorar para ocorrer.

A cultura resultante da primeira esporulação foi tratada segundo procedimento descrito no item 4.7.1. porém durante a lavagem, a cultura formou flocos, que não se separavam durante a homogeneização por vórtex, por conta disso, não foi possível garantir que as colônias resgatadas depois do plaqueamento, eram colônias formadas por somente um haploide, devido a isso, deixamos reservadas os haploides obtidos na primeira esporulação para emprego no cruzamento massal, onde não havia necessidade de controle de haploides e diploides. Os possíveis haploides obtidos na primeira esporulação não passaram pelo processo de avaliação de crescimento em microplacas.

Nas culturas obtidas na segunda esporulação (tabela 6), utilizou-se o protocolo descrito no item 4.7.2. Os haploides foram separados através de um micromanipulador (Carl Zeiss, Scope A1, AXIO) (segundo o procedimento exemplificado na figura 35), totalizando 339 haploides, sendo 151 CAP, 75 IRA1 e 113 CR, a linhagem CAP, apesar de ter atingido um número inferior de porcentagem de esporulação, comparada com as demais linhagens, foi a que proporcionou o maior número de haploides viáveis. As viabilidades dos haploides obtidos foram verificadas através do seu crescimento nas placas resultantes da micromanipulação.

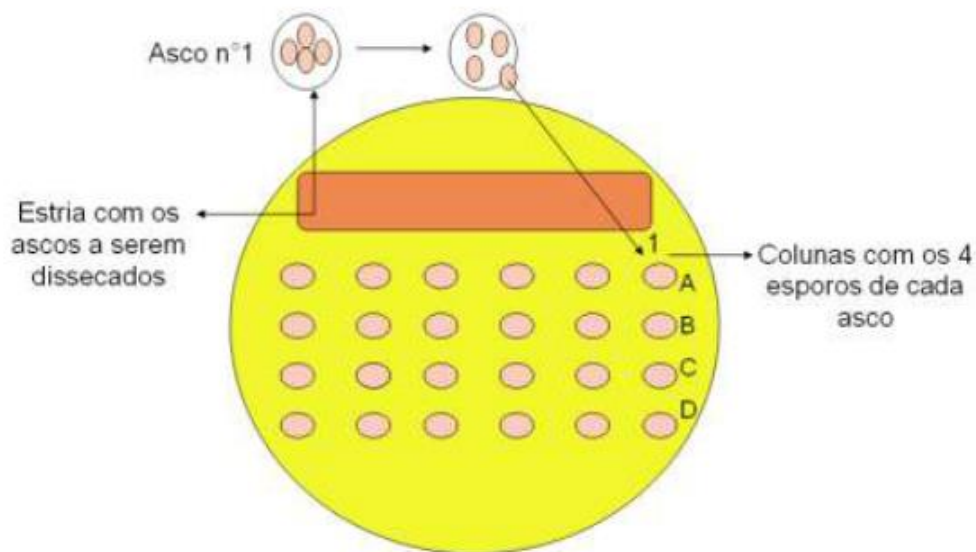


Figura 35: Crescimento e isolamento dos haploides na placa de petri, cada asco está identificado com um número e para cada ascósporo desse asco, uma letra (A, B, C, D) (ALEXANDRINO, 2012)

A partir dos haploides obtidos, foram feitas novas seleções através do Tecan (GENios microplate reader), com o mesmo meio utilizado nas seleções anteriores, seguindo o procedimento descrito no item 4.4.. Os resultados de DO (600nm) obtidos na seleção estão descritos nas figuras de 36 a 40, os haploides selecionados para verificação de ploidia e “mating type” são os destacados em cor escura.

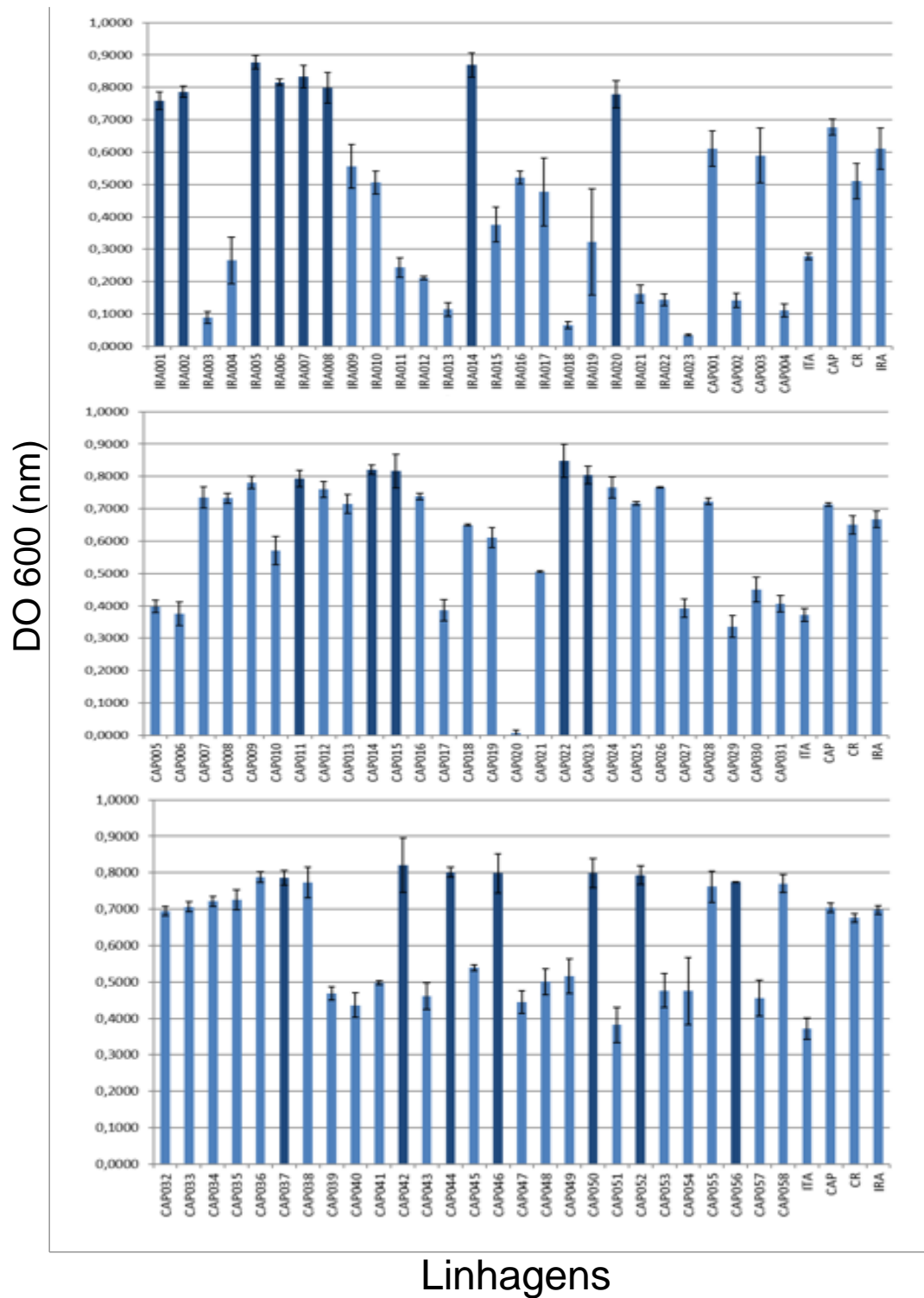


Figura 36: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos haploides, comparados ao crescimento dos parentais (CAP; CR e IRA) e panificação (ITA), selecionadas destacadas em barra mais escura

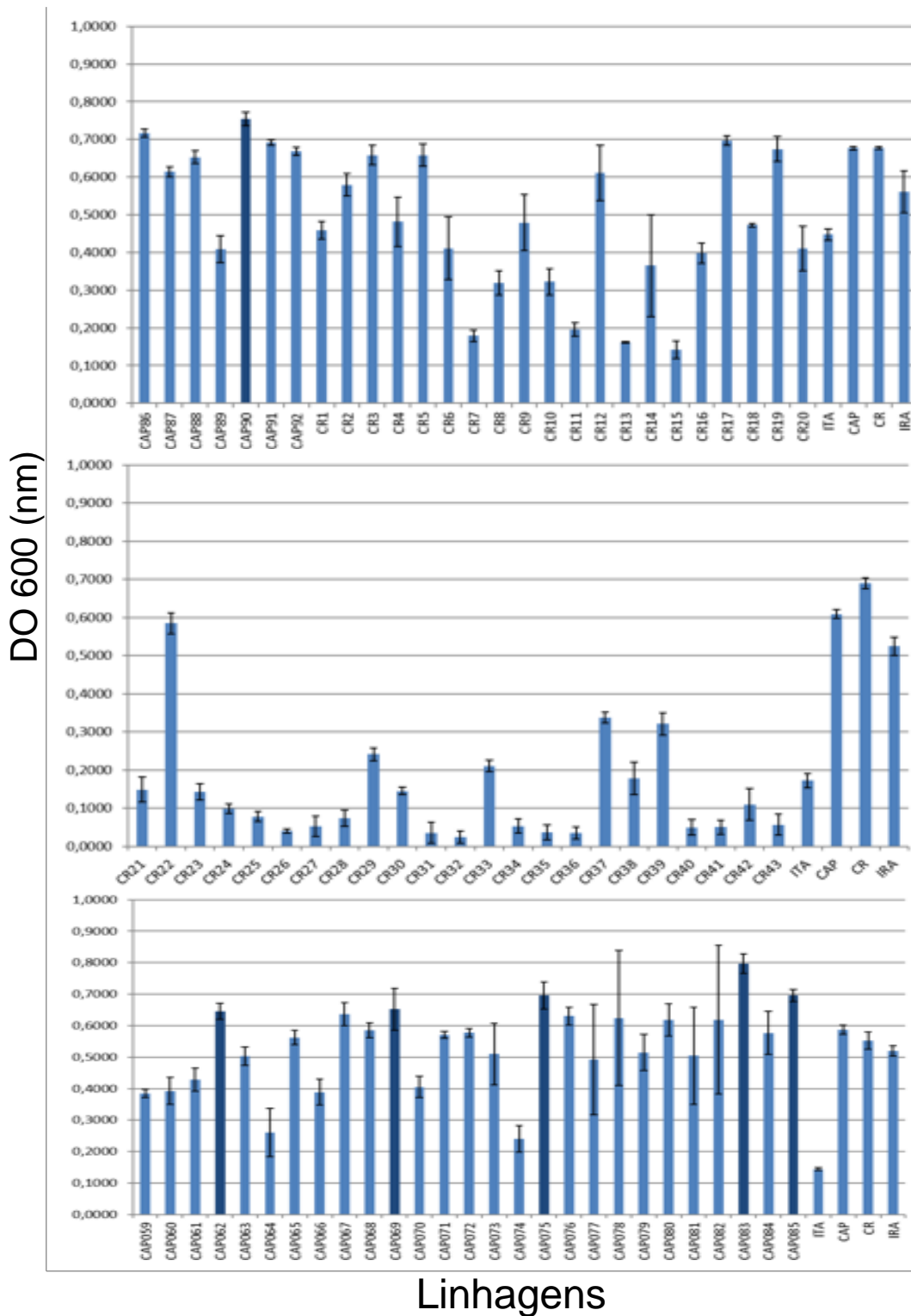


Figura 37: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos haploides, comparados ao crescimento dos parentais (CAP; CR e IRA) e panificação (ITA), selecionadas destacadas em barra mais escura

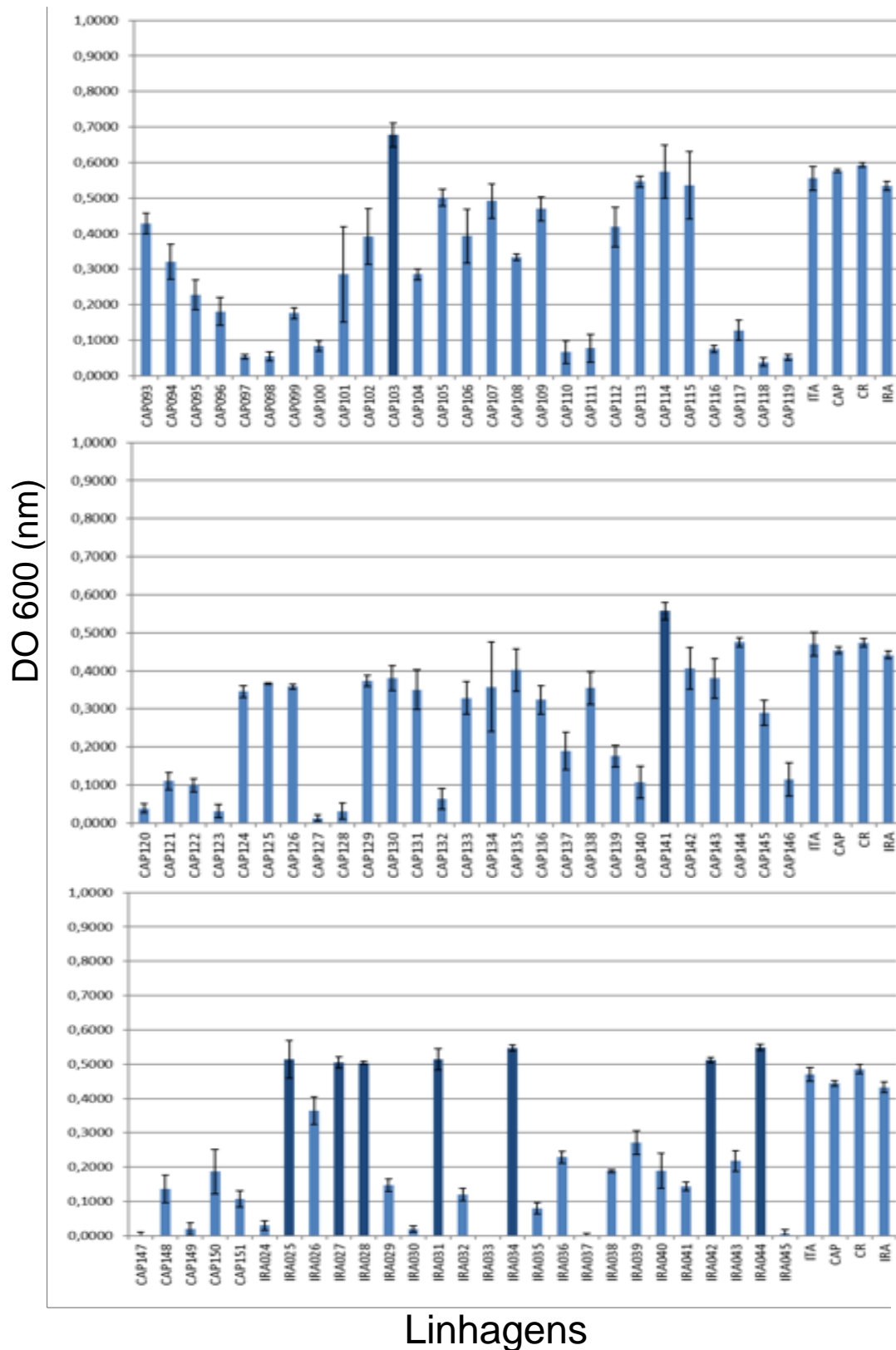


Figura 38: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos haploides, comparados ao crescimento dos parentais (CAP; CR e IRA) e panificação (ITA), selecionadas destacadas em barra mais escura

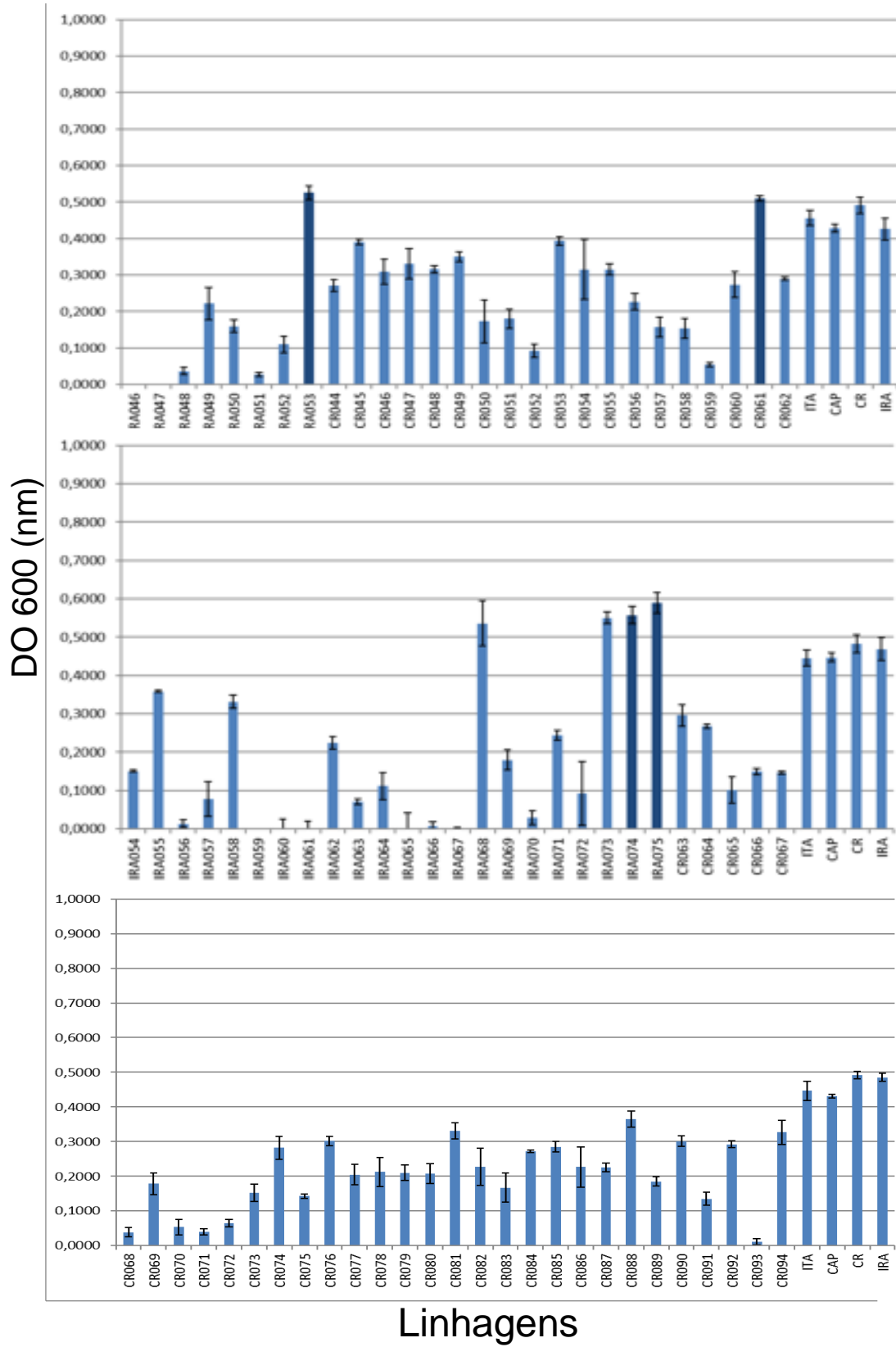


Figura 39: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos haploides, comparados ao crescimento dos parentais (CAP; CR e IRA) e panificação (ITA), selecionadas destacadas em barra mais escura

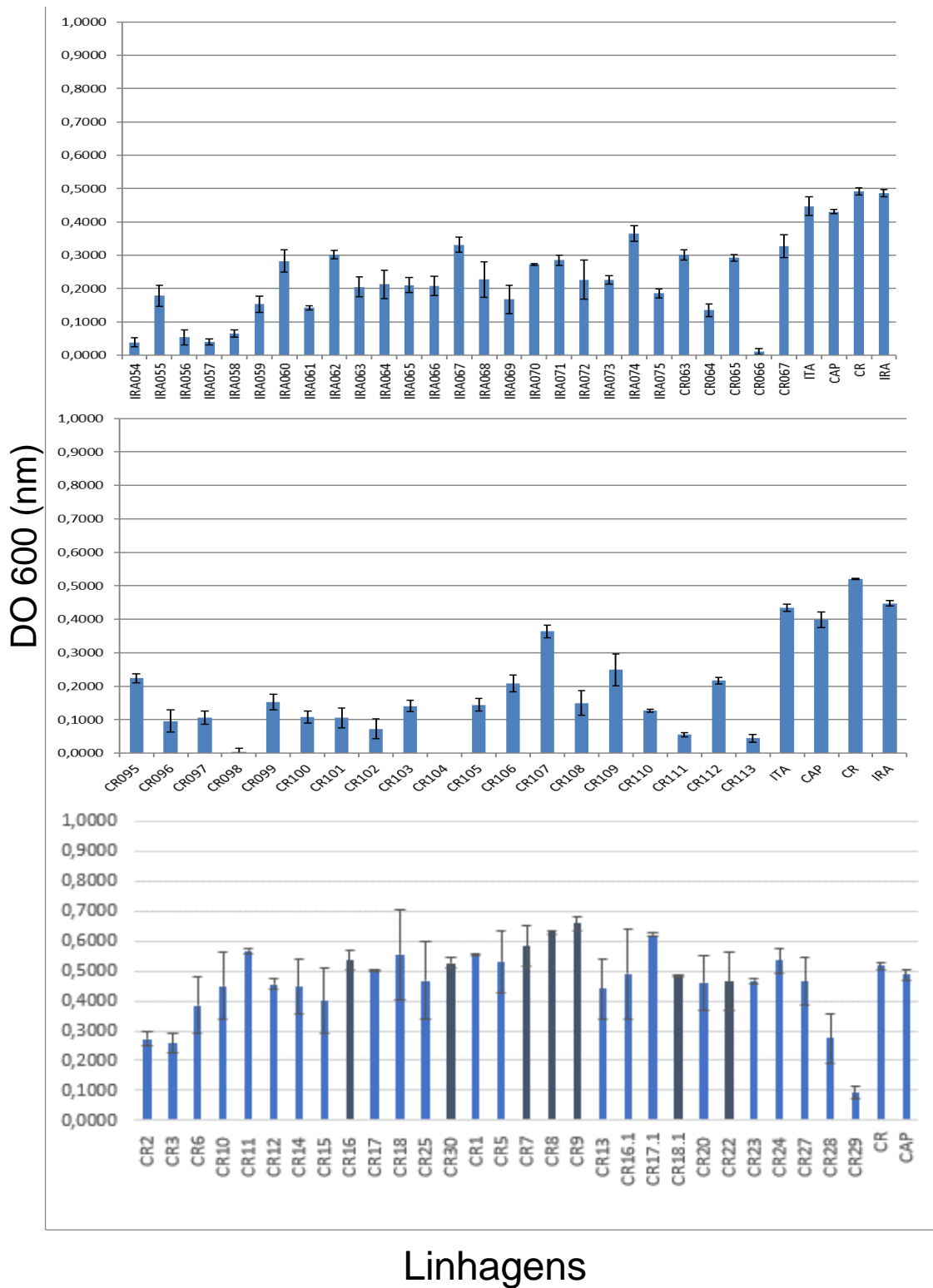


Figura 40: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos haploides, comparados ao crescimento dos parentais (CAP; CR e IRA) e panificação (ITA), selecionadas destacadas em barra mais escura

5.7. Cruzamento direcionado

Os haploides selecionados anteriormente, a partir do crescimento em microplacas, foram submetidos sexagem, para descobrir qual seu “mating type” (MAT-a ou MAT- α) (HABER, 1998) e também foi analisado para saber qual a sua ploidia (Tabela 7), os haploides que apresentaram crescimento superiores aos parentais, foram submetidos a cruzamentos direcionados (Tabela 8) mediante micromanipulação, foram isolados aproximadamente 30 zigotos de cada cruzamento feito, porém não obtivemos o crescimento de todos os zigotos, somando apenas 251 híbridos.

Tabela 6: Relação de linhagens selecionados e relação de ploidia e mating type

Linhagem	Ploidia	Mating Type
IRA 002	Haploide	α
IRA 005	Diploide	
IRA 007	Haploide	α
IRA 014	Diploide	
IRA 027	Diploide	
IRA 028	Diploide	
IRA 034	Diploide	
IRA 074	Haploide	α
IRA 075	Diploide	
CAP 014	Haploide	α
CAP 037	Diploide	
CAP 046	Diploide	
CAP 052	Haploide	α
CAP 056	Diploide	
CAP 062	Haploide	α
CAP 085	Diploide	
CAP 090	Diploide	
CR 007	Haploide	α
CR 008	Haploide	α
CR 009	Haploide	α
CR 016	Haploide	a
CR 018	Haploide	α
CR 022	Haploide	α
CR 030	Haploide	a
CR 061	Diploide	

Tabela 7: Relação de cruzamentos direcionados e híbridos obtidos

Cruzamentos	Híbridos
IRA002 X CR016	H001 - H006
IRA074 X CR016	H007 - H017
CR007 X CR016	H018 - H035
IRA002 X CR030	H036 - H064
IRA074 X CR030	H065 - H094
CR007 X CR030	H095 - H121
CR007 X CR016	H122 - H133
IRA002 X CR016	H134 - H141
IRA074 X CR016	H142 - H178
CAP014 X CR016	H194 - H200
CAP052 X CR016	H201 - H215
CAP062 X CR016	H170 - H183
CAP014 X CR030	H216 - H222
CAP052 X CR030	H223 - H251
CAP062 X CR030	H184 - H193

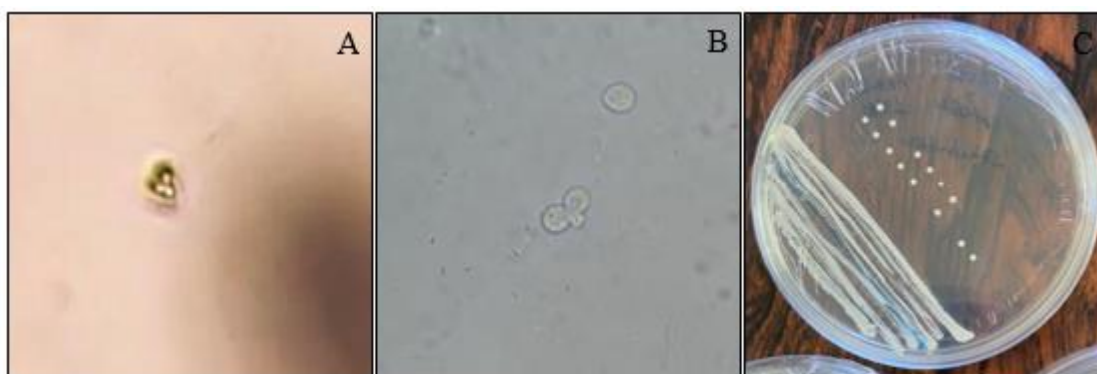


Figura 41: A: Zigoto visto em micromanipulador; B: Zigoto visto em microscópio; C: Placa resultante de um dos cruzamentos, cada colônia crescida representa um híbrido formado.

Os híbridos obtidos através dos cruzamentos direcionados foram avaliados através de crescimento em microplacas (figuras de 42 a 44), para que se fosse possível selecionar os que obtiveram melhores crescimentos quando comparados aos parentais.

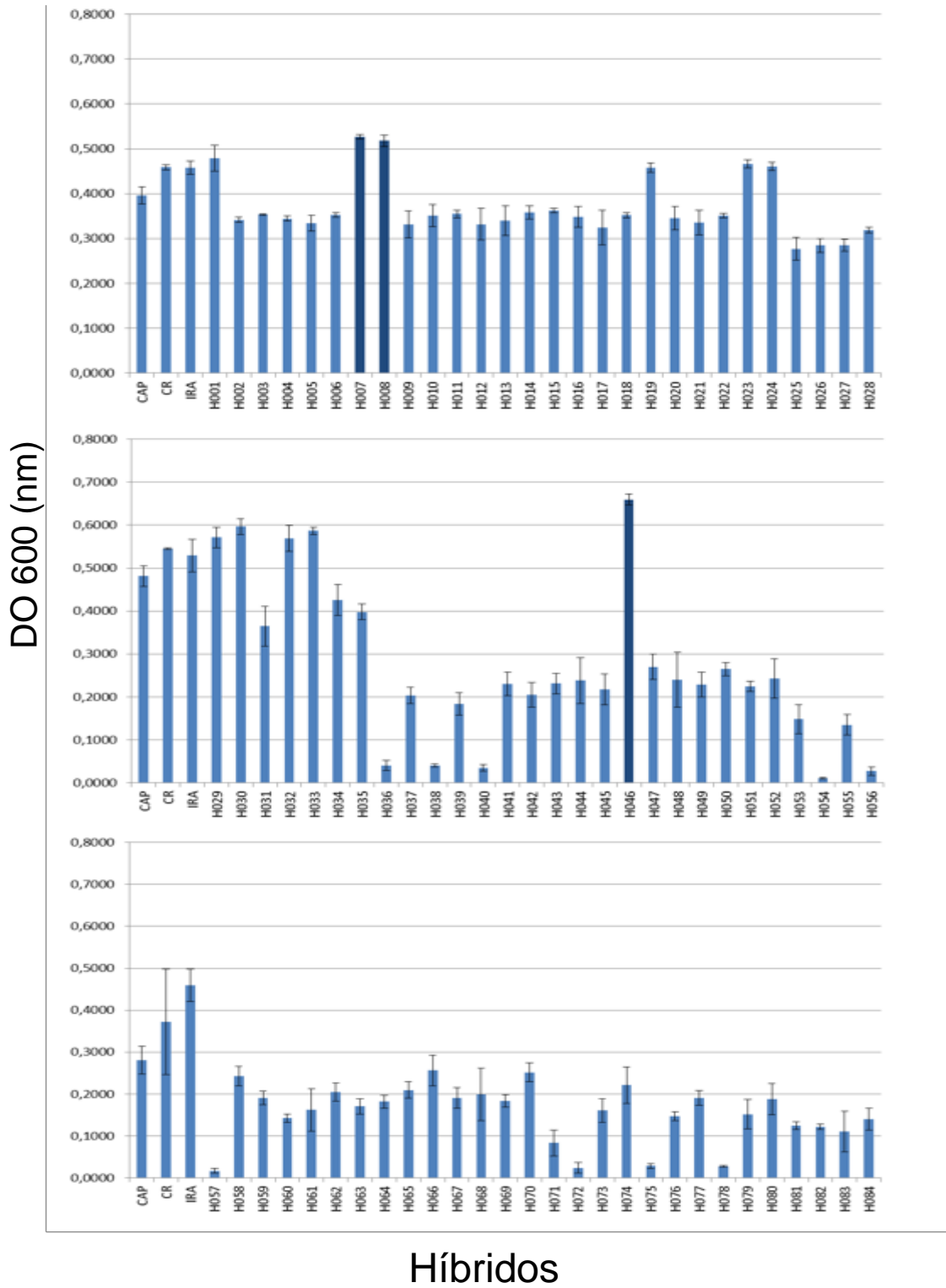
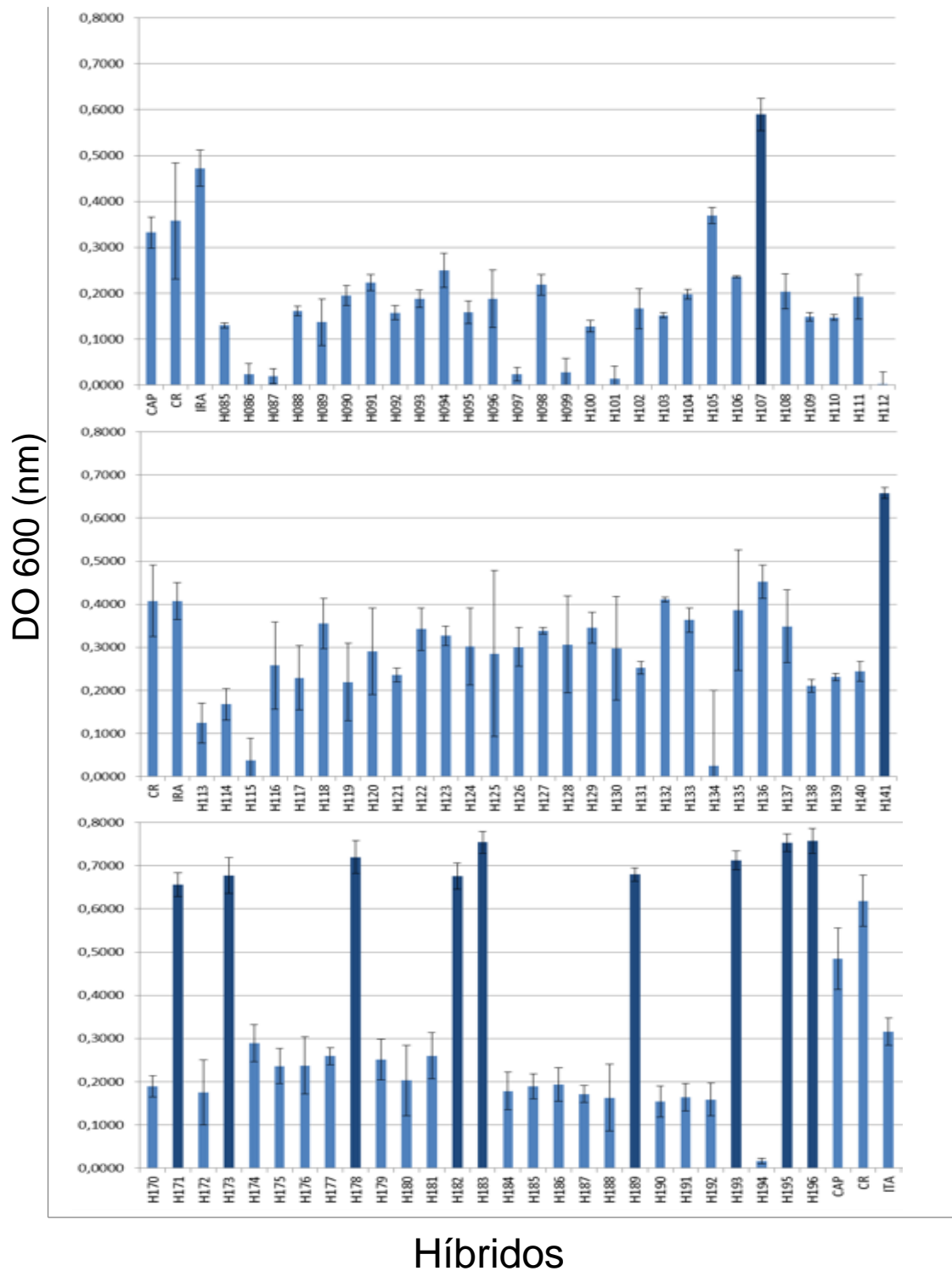
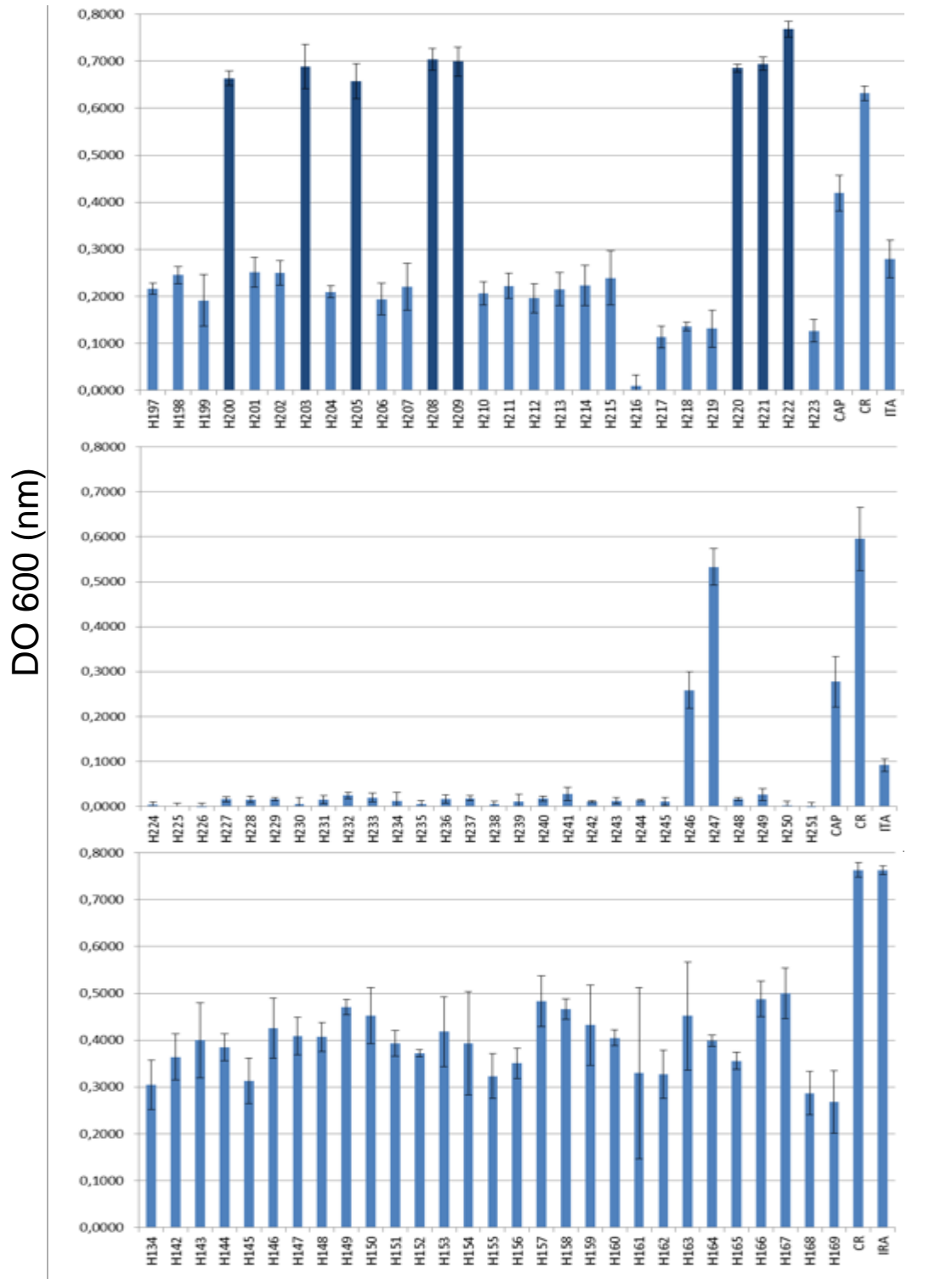


Figura 42: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos híbridos, comparadas ao crescimento das parentais (CAP; CR e IRA) selecionadas destacadas em barra mais escura.



Híbridos

Figura 43: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos híbridos, comparadas ao crescimento das parentais (CAP; CR e IRA) selecionadas destacadas em barra mais escura.



Híbridos

Figura 44: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos híbridos, comparadas ao crescimento das parentais (CAP; CR e IRA) selecionadas destacadas em barra mais escura.

5.8. Cruzamento massal

Para o cruzamento massal, todos os haploides obtidos da esporulação foram utilizados, sendo eles descritos na tabela a seguir.

Tabela 8: Lista de haploides utilizados no cruzamento massal

Haploides derivados do plaqueamento	
Iracema	I1 – I60
Capuava	C1 – C60
Cresciumal	CR1 – CR60
Haploides derivados da micromanipulação	
Iracema	IRA001 – IRA075
Capuava	CAP001 – CAP151
Cresciumal	CR001 – CR113

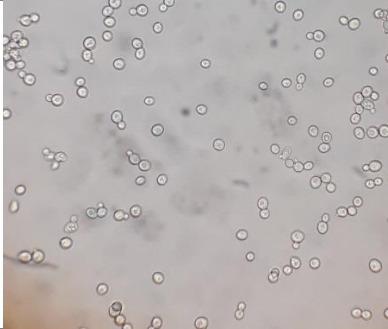
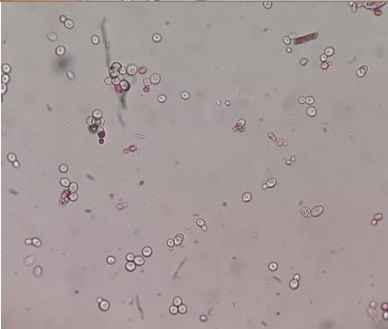
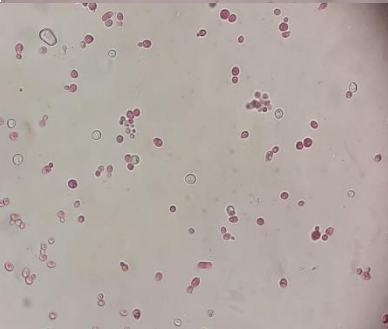
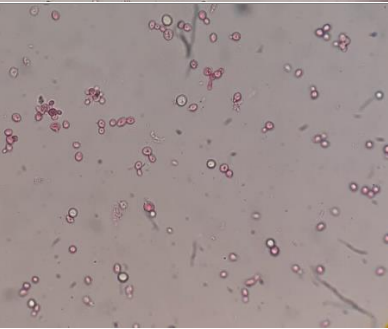
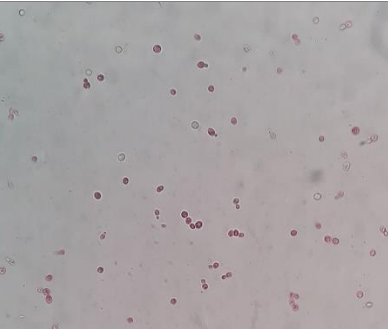
Após o período de incubação, todo o conteúdo dos microtubo foi transferido para um Erlenmeyer estéril e homogeneizado, transferiu-se todo o montante para tubos de centrifuga de 50mL para que fosse possível centrifugar e separar a biomassa.

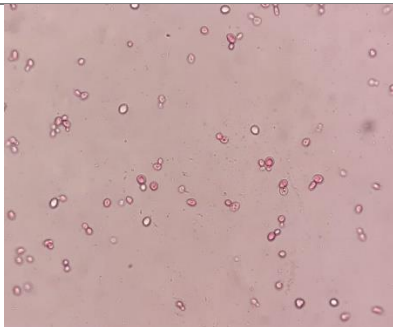
A biomassa foi transferida para um Erlenmeyer e adicionou-se 400mL de meio YPD com antibiótico e deixou ocorrendo o cruzamento massal por 2 dias, parte do conteúdo (cerca de 30mL) foi reservado e congelado a -80°C em ultrafreezer.

Centrifugou-se o restante do conteúdo e para que fosse separada a biomassa do sobrenadante, transferiu-se a biomassa para um tubo de centrifugação de 50mL e adicionou-se meio de hidrolisado e mel para que pudesse ser feito a seleção dos melhores híbridos.

A seleção ocorreu no período de 13 dias e foi acompanhado a viabilidade da biomassa, trocando o meio quando ocorria queda nessa viabilidade (tabela 10).

Tabela 9: Acompanhamento do cruzamento massal através de contagem em microscópio 40x e adição de meio novo.

Dia	Imagem	Troca de meio	Dados
1º		Sim	Vivas: 357 Mortas: 52 Viabilidade: 87%
3º		Sim	Vivas: 216 Mortas: 69 Viabilidade: 76%
7º		Sim	Vivas: 64 Mortas: 444 Viabilidade: 13%
8º		Não	Vivas: 26 Mortas: 305 Viabilidade: 8%
9º		Sim	Vivas: 30 Mortas: 254 Viabilidade: 11%

11°		Sim	-
13°		Não	Vivas: 19 Mortas: 217 Viabilidade: 8%

Após a seleção pelo meio estressante, a amostra foi plaqueada em meio YPD + ágar com antibiótico ampicilina 10.000 ppm e foi incubado em B.O.D a 28°C por 48 horas, para que houvesse crescimento de colônias e a obtenção dos possíveis híbridos resistentes ao hidrolisado.



Figura 45: Plaqueamento dos possíveis híbridos resultantes do cruzamento massal e seleção através do meio de hidrolisado e mel.

As colônias obtidas foram resgatadas através do uso de um palito de madeira estéril, selecionando somente as que estivessem isoladas, as colônias resgatadas foram inoculadas em microtubos de 2mL, com 1mL de YPD com antibiótico ampicilina 10.000 ppm, incubadas em B.O.D a 28°C por 24 horas, as amostras obtidas foram testadas em Tecan (GENios microplate reader), segundo procedimento descrito no item 4.4. (gráfico 45), ao todo foram resgatados 27 possíveis híbridos, onde 24 apresentaram ótimo crescimento no meio de hidrolisado (figura 46).

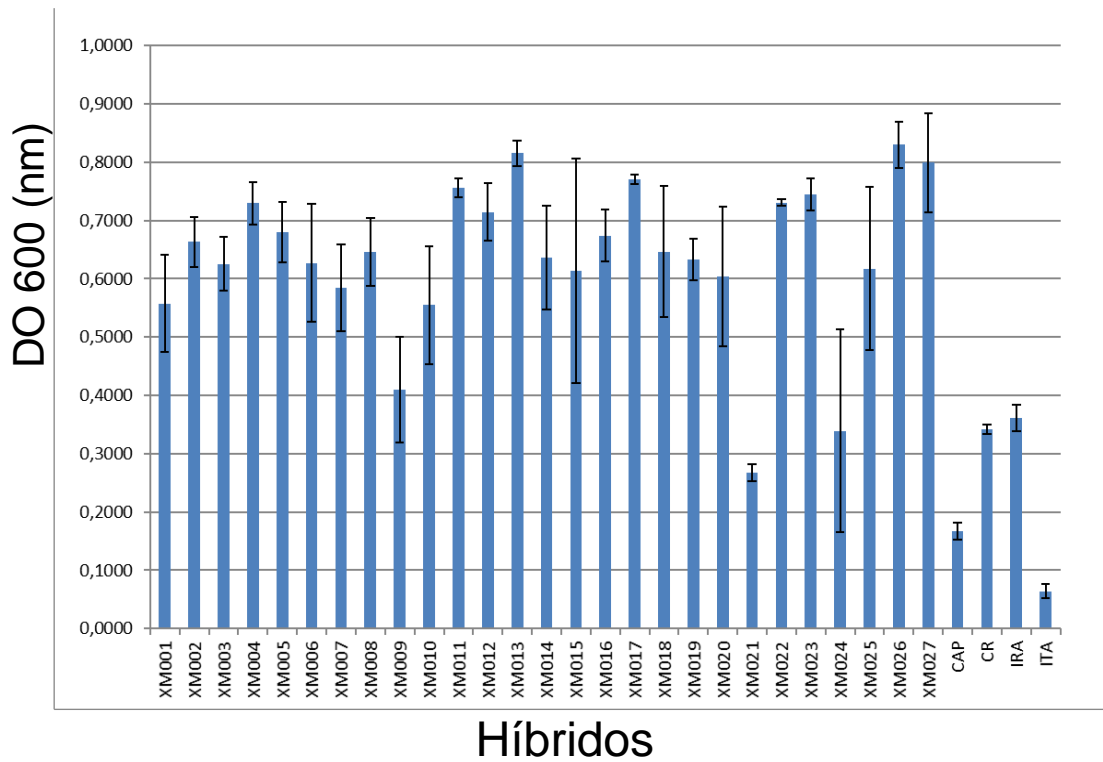


Figura 46: Crescimentos avaliados pela densidade ótica (DO600nm) em 24 horas dos híbridos resultantes do cruzamento massal, comparados ao crescimento dos parentais (CAP; CR e IRA).

6. CONCLUSÃO

A partir do trabalho desenvolvido, foi possível constatar que a técnica de avaliação de tolerância ao hidrolisado através do crescimento em microplaca é um método que possibilita a seleção de um número grande de linhagens, de maneira precisa e rápida.

Através dos cruzamentos direcionado e massal foi possível obter híbridos que quando testados acerca de sua tolerância aos inibidores encontrados no substrato de melaço e hidrolisado lignocelulósico, através de crescimento em microplacas, apresentaram taxas de crescimento superiores aos parentais. Ao todo foram testados 251 híbridos resultantes do cruzamento direcionado, onde 22 híbridos obtiveram crescimentos superiores aos parentais. Em relação ao cruzamento massal, dos 27 testados, somente 3 não obtiveram crescimento notavelmente superior aos parentais.

As linhagens híbridas que se destacaram com relação ao crescimento, constituem em um excelente material biológico, para modificação genética, através da inserção de atributos metabólicos que possibilitem a fermentação de xilose, para o emprego na obtenção de etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, ; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 189-194, out. 1997.

ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester Sussex, v. 82, p. 340 – 349, Apr. 2007.

ALVES, T. **Fatores que Influenciam na fermentação etanólica do hidrolisado de *Eucalyptus urophylla***. Universidade de Brasília - Instituto de Química. Brasília, p. 64. 2014.

ANDRADE, T. D.; CARVALHO, R. G. D.; SOUZA, F. D. Programa do PROÁLCOOL e o etanol no Brasil. **ENGEVISTA**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 127-136, Dezembro 2009. ISSN 1415-7314.

ANDRIETTA, M. D. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, Campinas, v. 7, p. 1-16, 2006.

ARGUESO, J. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, New York, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

ATTFIELD, P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, v. 225, n. 1,2, p. 259-263, Dec. 1987.

AZUBUIKE, J. ; NWAFOR, O.. Performance evaluation of spark ignition engine at constant load using ethanol as doping agent. **American Journal of Mechanical Engineering**, v. 3, n. 4, p. 122-125, Aug. 2015.

BAI, F. W.; ANDERSON, ; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, p. 89–105, 2008.

BASSO, L. C.; BASSO, T. P.; BASSO, T. O. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da fermentação etanólica nas destilarias brasileiras**. 2ª. ed. São Paulo: Blucher, v. 1, 2020.

BASSO, T. P. **Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* by hybridization for increased tolerance towards inhibitors from second-generation ethanol substrate**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP. Piracicaba, p. 106. 2014.

CAMASSOLA, ; DILLON, A. J. P. Effect of different pretreatment of sugar cane bagasse on cellulase and xylanases production by the mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 grown in submerged culture. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, May 2014.

CARNEIRO, V. A.; CASAROLI, D.; DOS SANTOS, F. C. V. Cana-de-açúcar: uma abordagem climática. **Revista Mirante**, Anápolis, v. 8, n. 3, p. 33-47, dez. 2015. ISSN 19814089.

CAVALCANTE, S.; DE ALBUQUERQUE, M. The sugar production process. In: SANTOS, ; BORÉM, ; CALDAS, **Sugarcane: agricultural production, bioenergy and ethanol**. Amsterdam: Elsevier, 2015. chap. 14.

CGEE. **Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos CGEE-Nipe/Unicamp. Brasília, p. 335. 2005.

COPERSUCAR. **Fermentação**. São Paulo: [s.n.], 1987.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, n. 2, 1992.

CURSI, D. E. et al. History and current status of sugarcane breeding, germplasm development and molecular genetics in Brazil. **Sugar Tech**, n. 24, p. 112-133, Feb. 2021.

CURVELO, A. A. D. S. A integração do pré-tratamento na biorrefinaria da cana-de-açúcar. In: WORKSHOP SOBRE O ESTADO DA ARTE DA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL: DE OLHO NA SEGUNDA GERAÇÃO, 1., 2015, Campinas.

DANIELS, ; DANIELS,. Sugarcane in prehistory. **Archaeology in Oceania**, Sydney, v. 28, n. 1, p. 1-7, Apr. 1993.

DIAS, M. O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964-8971, Oct. 2011.

DOMINGUEZ, J. M.; GONG, ; TSAO, G. T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 49-56, 1996.

DUAILIBE, A. K. **Combustíveis no Brasil: desafios e perspectivas**. Rio de Janeiro: Synergia, 2012.

ERENO, D. Álcool de celulose - Bagaço e palha de cana são cotados para aumentar a produção de etanol. **Pesquisa FAPESP**, v. 133, p. 28-30, março 2007.

EZOV, T. K. et al. Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 121–131, Jan. 2010.

FARIAS, D. **Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses em processo extrativo a vácuo**. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, p. 263. 2014.

FERMENTEC. Fermentec. **Fermentec**, 2021. Disponível em: <<https://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259#:~:text=Levedura%20CAT%2D1,na%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20do%20etanol%20brasileiro.>>. Acesso em: 25 Novembro 2021.

GÓES-FAVONI, P. D. et al. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 4, p. 285-296, maio 2018. ISSN 2179-6858.

GREIG, et al. Hybrid speciation in experimental populations of yeast. **Science**, v. 298, p. 1773-1775, Nov. 2002.

GUEVARA, J. D. H. et al. Avaliação de sustentabilidade da produção de etanol no Brasil: um modelo em dinâmica de sistemas. **BBR**, v. 14, n. 4, p. 435-447, dez. 2016. ISSN 1808-2386.

HABER, J. E. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 32, p. 561-599, 1998.

HENRIQUE, J. Tecnologia industrial – fermentação. **RPA News - Cana & Indústria**, n. 192, ago. 2017.

JANK, M. S.; NAPPO, M. Etanol de cana-de-açúcar: uma solução energética global sob. In: ABRAMOVAY, R. **Biocombustíveis: a energia da controvérsia**. São Paulo: SENAC, 2009.

KLOCK, U.; ANDRADE, A. S. D. **Química da madeira**. Curitiba: [s.n.], 2013.

KNOP, J. Yeast cell morphology and sexual reproduction – a short overview. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 599-606, July 2011.

LIMA, L. A. D. O. Crise do petróleo e evolução recente da economia brasileira. **RAE - Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 29-37, abr. 1977. ISSN 0034-7590.

LIMA, U.A. **Produção de etanol com matérias-primas sacarinas**. 2ª. ed. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, 2019. 19-69 p.

LIMA, U.A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: Edgar Brücher, 2001. v. 3.

- LINDEGREN, C.; LINDEGREN,. A new method for hybridizing yeast. **PNAS**, Washington, v. 29, p. 306-308, Oct. 1943.
- LOH, Y. R. et al. Sugarcane bagasse: the future composite material: a literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 75, p. 14-22, Mar. 2013.
- LOPES, ; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol**. São Carlos: UAB-UFSCar, 2011.
- LORA, E. E. E.; VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Interciência, 2012. v. 1
- MANKAR, A. R. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass: a review on recent advances. **Bioresource Technology**, v. 334, p. 1-12, Aug. 2021.
- MONTELONE, B. A. Yeast mating type. **eLS**, p. 1-7, Jan. 2015.
- MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, A. D.; MELO, C. D. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood. Parte I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.
- NAZATO, et al. Moenda x difusor: diferentes pontos de vista sobre o assunto. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, Piracicaba, p. 129-139, 2011.
- NEIMAN, A. M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova York, v. 69, n. 4, p. 565–584, Dec. 2005.
- NOGUEIRA, D. S. et al. Minerais em melados e em caldos de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 727-731, dez. 2009. ISSN 0101-2061.
- OGEDA, ; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, jul. 2010. ISSN 1678-7064.
- OHKURA,. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, p. 1-14, May 2015. ISSN 1943-0264.
- PAIVA, E. P. D.; LIMA, ; PAIXÃO, A. **Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação**. [S.l.]: [s.n.], 2009.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technol**, p. 25-33, 2000.
- PARTZSCH,. Biofuel research: perceptions of power and. **Energy, Sustainability and Society**, v. 7, n. 14, p. 1-10, May 2017.

- PIEKARSKA, ; RYTKA, ; REMPOLA,. Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, n. 3, p. 241-250, Sept. 2010.
- REZENDE, et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-18, Nov. 2011.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v. 454, p. 841-845, 2008.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Nova Química**, 56,62, 2012.
- SANTOS, F. R. F. D.; BORSCHIVER, ; COUTO, A. P. G. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. **Economia & Energia**, n. 82, jul./set. 2011. ISSN 1518-2932.
- SILVA, O.; FISCHETTI, D. **Etanol: a revolução verde e amarela**. São Paulo: Bizz , 2008.
- SILVELLO, C. **Obtenção de leveduras tolerantes aos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mediante hibridação**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, p. 111. 2016.
- SIPICZKI,. Yeast two- and three-species hybrids and high-sugar fermentation. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1101-1108, Mar. 2019.
- SOARES , ; VAZ ROSSELL, C. **O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico**. São Paulo: NAIPPE/USP, 2014. v. 2.
- SOARES, L. C. D. S. R. **Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, p. 112. 2012.
- STELKENS, R. B. et al. Hybridization facilitates evolutionary rescue. **Evolutionary Applications**, v. 7(10), p. 1209–1217, Dec. 2014.
- TAHARA, E. B. et al. Calorie restriction hysteretically primes aging *Saccharomyces cerevisiae* toward more effective oxidative metabolism. **PLOS One**, San Francisco, v. 8, Feb. 2013.
- UNICA. **UNICA**, 2018. Disponível em: <<https://www.unica.com.br/setor-sucroenergetico/etanol/>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

VARIZE, C. D. S. **Aumento da tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* a fatores estressantes da fermentação etanólica:** linhagens modificadas esuplementação de aminoácidos. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, p. 113. 2018.

VIEIRA, J. N. D. S.; LEAL, M. A. J. **Bioenergia & biorrefinaria:** cana-de-açúcar & especies florestais. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2013.

ZABED, et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **Hindawi**, v. 2014, p. 1-11, Mar. 2014.