

MARIANA RESENDE ALVIM

EFEITO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE AMOSTRAS DE MATÉRIAS-
PRIMAS NO RENDIMENTO ETANÓLICO DA FERMENTAÇÃO

São Paulo

2022

MARIANA RESENDE ALVIM

EFEITO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE AMOSTRAS DE MATÉRIAS-
PRIMAS NO RENDIMENTO ETANÓLICO DA FERMENTAÇÃO

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de mestre em
ciências.

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Profa. Dra. Marcela dos Passos
Galluzzi Baltazar

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Gonzalo
Alvarez Rosario

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 12 de Setembro de 2022

Assinatura do autor:



Assinatura do orientador:



Catálogo-na-publicação

Alvim, Mariana Resende

Efeito da contaminação microbiana de amostras de matérias-primas no rendimento etanólico da fermentação / M. R. Alvim -- versão corr. -- São Paulo, 2022.

102 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Fermentação de mosto misto 2.Contaminação microbiana 3.Bioetanol 4.MALDI-TOF 5.Sequenciamento genômico I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

DEDICATÓRIA

À minha família.

Ao meu amor, Italo.

A todos aqueles que, próximos, bem-quiseram.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luiza Helena e Gilberto, pelo suporte, pelo encorajamento e pelo amor.

À Prof. Dr^a. Marcela dos Passos Galluzzi Baltazar pela orientação. Ao Dr. Carlos Gonzalo Alvarez Rosario pela orientação, pelas conversas e pelo suporte importantíssimo em cada análise. Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Soares Tenório pela oportunidade.

À Nathália Dias Silva, pela amizade e suporte. Ao amigo João Paulo Regliski Vieira, pelas conversas, pelos risos e pelo incentivo. Aos amigos Bárbara Penna, Pedro Godoy, Gabriel Manfredi, Dennys Abreu, Lívia Martins e Lucas Fonseca, por tornarem os dias mais leves. Aos demais colegas e amigos do laboratório.

Ao meu namorado, Italo, obrigada imensamente por ouvir, compreender e apoiar. Por suas palavras sinceras. E, por sua companhia.

Ao laboratório vizinho, BELa, pelo suporte técnico-científico e por fornecer o uso de equipamentos. Em especial, à Thamires pelas análises em HPLC. E, ao Gabriel, pelo compartilhamento de informações técnicas e recomendações

Obriagada ao Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni por possibilitar a realização das análises no Laboratório de Biomol.

Agradeço ainda às parcerias que possibilitaram a realização de análises. Especificamente, gostaria de mencionar Tatiana Corrêa do GaTE Lab (Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição), do Instituto de Biociências da USP.

À Profa. Dra. Louise pelo apoio técnico científico e pelo suporte nas análises de MALDI-TOF no CEPEMA.

Às instituições que apararam este projeto de pesquisa, a EMBRAPII e a FUSP.

À SINOCHEM por financiar esse projeto de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade de São Paulo e seus professores, pelo ótimo ensino e pela oportunidade.

RESUMO

O bioetanol representa uma alternativa sustentável tanto no âmbito ambiental quanto econômico para suprir a demanda energética, ao invés de combustíveis fósseis, pois esse processo pode apresentar um balanço de CO₂ neutro. A produção de etanol ocorre de maneira não-estéril e isso implica em contaminações microbianas que podem afetar o rendimento de etanol. Entender as contaminações microbianas na fermentação, a formação da comunidade microbiana e seu impacto sobre a eficiência do processo são aspectos que ainda devem ser melhor investigados. Portanto, o presente trabalho objetivou caracterizar a microbiota de amostras de hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana; estudar o rendimento de etanol na fermentação de mosto misto; estudar o efeito da contaminação microbiana inerente às matérias-primas no rendimento de etanol; e avaliar a influência da concentração inicial de inóculo de Ethanol red™ no rendimento etanólico. A caracterização microbiana da matéria-prima, por meio da identificação dos microrganismos presentes em amostras de matérias-primas comumente utilizadas na produção de etanol, assim como a caracterização cinética e tolerância ao estresse etanólico, podem conduzir ao melhor entendimento do processo. Em geral, a levedura Ethanol red™ possui velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,66 \text{ h}^{-1}$) maior do que a contaminação inerente às matérias-primas. Dos microrganismos isolados, somente a bactéria ácido láctica *Leuconostoc mesenteroides* apresentou $\mu_{\text{máx}}$ ($0,14 \text{ h}^{-1}$) superior Ethanol red™ ($\mu_{\text{máx}} = 0,11 \text{ h}^{-1}$) sob estresse etanólico a partir de 10% v·v⁻¹ de etanol. Após a fermentação, nenhuma colônia bacteriana foi isolada das amostras de vinho. O melhor rendimento da fermentação em mosto misto foi 87% na proporção 80:20% v·v⁻¹. Dentre todas as condições de tratamento da contaminação, o maior rendimento obtido (92%) ocorreu em mosto misto na proporção de 90:10% v·v⁻¹ submetido à irradiação. E, o menor rendimento (73%) foi obtido em mosto misto 70:30% v·v⁻¹ sem tratamento.

Palavras-chave: Fermentação etanólica; Contaminação microbiana; Mosto misto; Rendimento; Concentração de inóculo.

ABSTRACT

Bioethanol represents a sustainable alternative in both environmental and economic terms to meet energy demand, instead of fossil fuels, because this process can present a neutral CO₂ balance. Ethanol production occurs under a non-sterile conditions and this implies microbial contamination that can affect ethanol yield. Yet more investigation is still needed to understand microbial contamination in fermentation, the formation of the microbial community and its impact on process efficiency. Therefore, the present work aimed to characterize the microbiota of samples of corn hydrolyzate, sugarcane syrup and sugarcane juice; to study the ethanol yield in mixed wort fermentation; to study the effect of microbial contamination inherent to raw materials on ethanol yield; and to evaluate the influence of the initial concentration of Ethanol red™ inoculum on the ethanol yield. The microbial characterization of the raw material, through the identification of microorganisms present in samples of raw materials commonly used in the production of ethanol, as well as the kinetic characterization and tolerance to ethanolic stress, can lead to a better understanding of the process. In general, Ethanol red™ yeast has a maximum specific growth rate ($\mu_{\max} = 0,66 \text{ h}^{-1}$) greater than the inherent contamination of the raw materials. Of the microorganisms isolated, only the lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* showed higher μ_{\max} ($0,14 \text{ h}^{-1}$) than Ethanol red™ ($\mu_{\max} = 0,11 \text{ h}^{-1}$) under ethanolic stress from 10% v·v⁻¹ of ethanol. After fermentation, no bacterial colonies were isolated from the wine samples. The best yield of fermentation in mixed must was 87% in the proportion 80:20% v·v⁻¹. Among all the contamination treatment conditions, the highest yield obtained (92%) occurred in mixed must in the proportion of 90:10% v·v⁻¹ submitted to irradiation. And, the lowest yield (73%) was obtained in mixed must 70:30% v·v⁻¹ without treatment.

Keywords: Ethanol fermentation; Microbial contamination; Mixed wort; Yield; Inoculum concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrólise enzimática de sacarose pela invertase em glicose e frutose, assim como a estequiometria da reação.	13
Figura 2: (a) Micrografia eletrônica de varredura (MEV) do grânulo de amido de milho. (b) MEV de uma seção do grânulo de amido. (c) Representação da estrutura do grão de amido. (d) Estrutura molecular da amilose e da amilopectina.....	14
Figura 3: (a) Processo de hidratação (ii), aquecimento (iii) e formação de gel (iv) do grão de amido (i). (b) Hidrólise enzimática da amilose e da amilopectina.	15
Figura 4: Diagrama da via metabólica da fermentação alcoólica.	17
Figura 5: Implicações associadas à contaminação microbiana na fermentação etanólica.....	20
Figura 6: Fluxograma sintetizando os métodos de identificação de microrganismos.	22
Figura 7: Representação esquemática da reação em cadeia da enzima polimerase (PCR). Em (A), detalhe do primeiro ciclo da PCR. E, em (B), a reação em (A) foi resumida para vários ciclos consecutivos da PCR.....	25
Figura 8: Esquema dos componentes do espectrômetro de massas MALDI-TOF e das etapas desde a ionização de proteínas até o espectro.	27
Figura 9: Representação do acelerador de elétrons Dynamitron®.....	29
Figura 10: Fluxograma do processo de caracterização da microbiota das matérias-primas.	32
Figura 11: Fluxograma do estudo do efeito da contaminação no rendimento de etanol.	33
Figura 12: Representação das etapas de extração do DNA microbiano utilizando o kit DNeasy UltraClean Microbial da Qiagen®. Fonte: Adaptado de QIAGEN (2020).	38
Figura 13: Padrão de peso molecular de 1 kb (1000bp) da marca Kasvi.....	43
Figura 14: (a) Acelerador industrial de elétrons Dynamitron – Job 188 do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN); (b) Amostras em recipientes refratários de vidro borossilicato para procedimento em batelada.....	45
Figura 15: Biorreator de bancada em funcionamento.	48
Figura 16: Isolamento microbiano das três amostras de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em meio YPD ágar.	53

Figura 17: Isolamento microbiano a partir das três amostras de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em meio MRS ágar. ...	54
Figura 18: Isolamento microbiano a partir das três amostras de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em meio sólido à base do respectivo substrato.	54
Figura 19: Concentrações microbianas, em UFC·mL ⁻¹ , de cada amostra de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em três tipos de meio de cultivo sólido (YPS, MRS, meio à base da respectiva matéria-prima)..	55
Figura 20: Descrição das informações contidas nos códigos de identificação de cada microrganismo isolado.	56
Figura 21: Classificação referente aos domínios e ao metabolismo energético dos microrganismos isolados das amostras de matéria-prima: (a) do hidrolisado de milho; (b) do xarope de cana-de-açúcar; e (c) do caldo da cana-de-açúcar.	61
Figura 22: Árvore filogenética (software MEGA 7) com base na sequência de nucleotídeos do gene 16S e 18S rRNA. As sequências foram alinhadas com MUSCLE e analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança. A confiabilidade da árvore foi testada por reamostragem de bootstrap (1000 replicações).	62
Figura 23: Perfis da variação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) em função da concentração inicial de etanol de todos os microrganismos isolados. Foram ensaiadas cinéticas em meio YPD acrescido de etanol entre 0 e 12% m·v ⁻¹	65
Figura 24: Rendimentos etanólicos, concentrações de ART residual e consumido em cada uma das condições de fermentação ensaiadas: mostos mistos 90:10, 80:20 e 70:30% v·v ⁻¹ submetidos à radiação ionizante de 20kgy, vapor úmido a 121°C por 15 minutos e sem tratamento.	67
Figura 25: Concentrações de glicerol inicial e formado em cada uma das condições de fermentação ensaiadas: mostos mistos 90:10, 80:20 e 70:30% v·v ⁻¹ submetidos à radiação ionizante de 20kgy, vapor úmido a 121°C por 15 minutos e sem tratamento.	69
Figura 26: Redução das concentrações de açúcares redutores totais, aumento das concentrações de etanol e glicerol nos ensaios em biorreator: fermentação de mosto misto 80:20% v·v ⁻¹ variando o inóculo em 5,0% m·v ⁻¹ (ensaio A) e 7,5% m·v ⁻¹ (ensaio B).	73

Figura 27: Perfis das concentrações de açúcares na fermentação de mosto misto com 5,0% m·v ⁻¹ de inóculo. À esquerda, consumo de todos os açúcares quantificados. E, à direita, perfis de metabolização de açúcares minoritários com mais detalhe.	75
Figura 28: Perfis das concentrações de açúcares na fermentação de mosto misto 80:20% m·v ⁻¹ com 7,5% m·v ⁻¹ . Em (A), constam os perfis de todos os açúcares quantificados e, em (B), com maior detalhe os perfis de consumo dos açúcares minoritários.....	75
Figura 29: Perfil dos rendimentos etanólicos ao longo das fermentações de mosto misto 80:20% v·v ⁻¹ em biorreator. Em (A), com 5,0% m·v ⁻¹ de inóculo e, em (B), com 7,5% m·v ⁻¹ de inóculo.	76
Figura 30: Perfis de carga bacteriana obtida em meio YPD a partir da fermentação de mosto misto 80:20% v·v ⁻¹ em biorreator com 5,0% m·v ⁻¹ de inóculo, em (A), e da com 7,5% m·v ⁻¹ de inóculo, em (B).	77
Figura 31: Concentração bacteriana obtida em meio MRS durante a fermentação de mosto misto 80:20% v·v ⁻¹ em biorreator com 5,0% m·v ⁻¹ de inóculo, em (A), e da com 7,5% m·v ⁻¹ de inóculo, em (B).	77
Figura 32: Variação do pH durante as fermentações de mosto misto 80:20% v·v ⁻¹ em biorreator. (A) refere-se ao ensaio com 5,0% m·v ⁻¹ de inóculo e, em (B), constam os valores do ensaio com 7,5% m·v ⁻¹ de inóculo.	78
Figura 33: Perfis de viabilidade celular dos dois ensaios de fermentação de mosto misto 80:20% v·v ⁻¹ em biorreator. Em (A), o inóculo foi de 5,0% m·v ⁻¹ e, em (B), a fermentação ocorreu com 7,5% m·v ⁻¹ de inóculo.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da produção de bioetanol combustível das duas nações líderes mundiais de produção.....	11
Tabela 2: Composição do meio de cultivo YPD.	34
Tabela 3: Composição do meio de cultivo MRS.....	35
Tabela 4: Pontuação e correspondente confiança da identificação obtida pelo MALDI-TOF.....	37
Tabela 5: Protocolo de PCR utilizando o kit ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix da Sigma-Aldrich, disponibilizado pelo fornecedor.....	40
Tabela 6: Relação de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizado na reação de PCR para amplificar as sequencias que codificam os genes de 16S rRNA em bactérias e 18S rRNA em fungos.....	41
Tabela 7: Programação da reação de PCR utilizada em termociclador.....	42
Tabela 8: Parâmetros cinéticos da fermentação.....	51
Tabela 9: Identificação dos microrganismos isolados da amostra de hidrolisado de milho por MALDI-TOF e por sequenciamento do gene 16S rRNA (bactérias) e 18S rRNA (fungo).....	57
Tabela 10: Identificação dos microrganismos isolados da amostra de xarope de cana-de-açúcar por MALDI-TOF e por sequenciamento do gene 16S rRNA (bactérias) e 18S rRNA (fungo).....	58
Tabela 11: Identificação dos microrganismos isolados da amostra de caldo de cana-de-açúcar por MALDI-TOF e por sequenciamento do gene 16S rRNA (bactérias) e 18S rRNA (fungo).....	59
Tabela 12: Concentrações de açúcares redutores totais e etanol obtidos ao final do processo e rendimento etanólico de cada uma das condições de fermentação do mosto misturado variando o tamanho do inóculo.....	70
Tabela 13: Concentração celular em massa úmida ao final da fermentação de mosto misto de cada uma das condições de concentração de inóculo testadas.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira geração
2G	Segunda Geração
3G	Terceira Geração
4G	Quarta geração
ART	Açúcares Redutores Totais
BAL	Bactéria Ácido Láctica
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	desoxirribonucleosídeos trifosfatos
IC	Ion Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MRS	De Man, Rogosa, and Sharpe
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
TM	Trademark
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV/Vis	Ultra Violeta e Visível
YPD	Yeast Extract - Peptone - Dextrose
CO ₂	dióxido de carbono

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs_{600}	Absorbância a 600 nm
EtOH	Etanol
kGy	Quilogray
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
$Y_{EtOH/S}$	Fator de conversão de substrato em etanol ($g_{EtOH}/g_{substrato}$)
Taq	Enzima termoestável DNA polimerase I

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1	Produção de bioetanol: Um panorama geral.....	10
2.2	Matérias-primas na produção de etanol.....	12
2.3	Bioquímica da fermentação de etanol.....	17
2.4	Contaminação na produção de etanol.....	19
2.5	Método de identificação e caracterização de microrganismos.....	21
2.5.1	Identificação pelo sequenciamento do gene 16S/18S.....	23
2.5.2	Identificação dos microrganismos por espectrometria de massas: MALDI-TOF	26
2.6	Controle da contaminação microbiana.....	28
2.6.1	Controle da contaminação microbiana por radiação ionizante.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Obtenção das matérias-primas.....	34
4.2	Meios de cultivo.....	34
4.3	Isolamento e manutenção de microrganismos.....	35
4.4	Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF.....	36
4.5	Identificação de microrganismos por método genômico.....	37
4.5.1	Extração de DNA genômico das células microbianas.....	38
4.5.2	Amplificação do material genético extraído: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.5.3	Eletroforese em gel de agarose.....	42
4.5.4	Purificação do material genético.....	43
4.5.5	Sequenciamento do material genético.....	44

4.6	Cinética de crescimento	44
4.7	Determinação da concentração mínima inibitória	44
4.8	Descontaminação por feixe de elétrons	45
4.9	Fermentação variando a proporção de mosto misto, descontaminado ou sem tratamento de descontaminação	46
4.10	Curva de massa úmida da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
4.11	Fermentação de mosto misto variando a concentração de inóculo	47
4.12	Aumento de escala em biorreator de bancada.....	47
4.13	Controle da fermentação por pesagem	48
4.14	Contaminação bacteriana	49
4.15	Determinação da viabilidade celular da levedura	49
4.16	Quantificação de carboidratos.....	50
4.17	Determinação da concentração de etanol e ácidos orgânicos	50
4.18	Cálculos dos parâmetros de fermentação.....	51
4.19	Análise estatística	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Caracterização microbiana.....	53
5.1.1	Isolamento dos microrganismos	53
5.1.2	Identificação dos microrganismos isolados	56
5.1.3	Cinética de crescimento sob estresse etanólico	63
5.2	Efeito da contaminação no rendimento etanólico.....	66
5.3	Efeito da concentração de inóculo no rendimento etanólico	69
5.4	Aumento de escala da fermentação etanólica em biorreator de bancada....	72
6	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE A – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) para bandas de DNA dos microrganismos isolados.....	96

APÊNDICE B – Análise estatística da cinética microbiana sob estresse etanólico pelo método Tukey.....	98
---	----

1 INTRODUÇÃO

Motivos econômicos, ambientais e geopolíticos, ampliaram os esforços em busca de alternativas baseadas em matérias-primas renováveis. Obtido pela fermentação de plantas, o bioetanol emite CO₂ neutro, contribuindo para manter o ciclo do carbono estável. Devido ao consumo de matéria-prima fóssil, os combustíveis mais tradicionais aumentam a concentração de dióxido de carbono na atmosfera proveniente do subsolo (ABO et al., 2019; PIRES et al., 2011). Segundo relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2021), dióxido de carbono é o principal gás do efeito estufa antropogênico.

O Brasil tem a maior matriz energética sustentável no mundo (energias renováveis representam aproximadamente 43,5% de toda energia). Ademais, a produção de etanol do Brasil é a mais eficiente do mundo devido à qualidade da matéria-prima e às condições climáticas favoráveis (SILVA; CASTAÑEDA-AYARZA, 2021). Maior produtor mundial de etanol até 2006, possuindo uma produção anual superada somente pelos Estados Unidos, o Brasil é o segundo líder mundial de produção de etanol desde então (DARODA; CUNHA; BRANDI, 2021; KARP et al., 2021).

A indústria sucroenergética brasileira utiliza principalmente o processo de fermentação Melle-Boinot, caracterizado por batelada alimentada com alta concentração celular. Esse processo ocorre em condições não estéreis, ou seja, já existe uma contaminação microbiana intrínseca na fermentação (LINO et al., 2021).

A perda de rendimento num bioprocessamento de etanol está em geral relacionada ao aumento da contaminação microbiana na dorna de fermentação (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; TSE; WIENS; REANEY, 2021). A contaminação bacteriana durante a fermentação ocorre principalmente por gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Ela pode afetar o rendimento de etanol ou mesmo inviabilizar o processo, sendo necessário interromper a planta para limpeza antes de retomar a produção (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011). Bactérias ácido lácticas são contaminações comuns que podem permanecer ou mesmo predominar no processo. Isso porque elas conseguem melhor adaptação às condições de fermentação (alta concentração de etanol, pH ácido e baixo oxigênio) (LUCENA et al., 2010). As leveduras selvagens capazes de produzir etanol, especialmente, espécies de *Saccharomyces*,

Schizosaccharomyces e *Pichia*, também são contaminações recorrentes que podem comprometer o sucesso da fermentação (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Entender a influência da contaminação no rendimento de etanol, quando a contaminação pode representar implicações no processo e os microrganismos potencialmente deletérios são importantes aliados para dirimir soluções e obter sucesso durante a produção de etanol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção de bioetanol: Um panorama geral

O etanol derivado de plantas, obtido pela fermentação de matéria orgânica, é designado bioetanol (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Trata-se de um combustível ambientalmente e economicamente sustentável. Sua utilização, ao invés de combustíveis fósseis, reduz a taxa de emissão de CO₂ do setor de transporte global. No sistema de produção de etanol de primeira geração (1G), o ciclo de vida do dióxido de carbono do etanol de cana-de-açúcar é mais rápido (JAISWAL et al., 2017; KARNAUSKAS; MILLER; SCHAPIRO, 2020).

Em 2020, a produção mundial de etanol atingiu cerca de 105 bilhões de litros (REN21, 2021). Maior produtor mundial, os Estados Unidos são responsáveis por 53% da produção global, seguido pelo Brasil, que detém 31% da produção (RFA, 2021). Nos Estados Unidos, o amido de milho corresponde a três quartos da quantia de matéria-prima utilizada para a produção de biocombustíveis. A maior parte da produção de etanol no Brasil é feita a partir de cana-de-açúcar (ALONSO-GÓMEZ; BELLO-PÉREZ, 2018). Atualmente, na indústria flex, é possível permutar entre matérias-primas. Essa tecnologia favorece a rentabilidade em detrimento da sazonalidade e do superávit do agronegócio (ALCANTARA et al., 2020).

Em geral, a produção de etanol consiste em quatro etapas principais: conversão da matéria-prima, fermentação, recuperação de etanol e armazenamento de etanol (WONGSURAKUL et al., 2022). A fermentação é a operação unitária do bioprocessamento de etanol em que o rendimento e a viabilidade econômica podem ser determinantes. Na produção industrial, via de regra, a dorna de fermentação atinge de 100000 a 600000 L. E, a concentração final de etanol entre 7-18%, com produtividade de 2-6 g/(L·h). No Brasil, o processo de fermentação em geral é realizado em batelada alimentada com reciclo. A concentração celular de leveduras elevada (8-12%) abrevia o processo, sendo relativamente rápido (6-12 h). Por meio da Tabela 1, é possível observar as características gerais dos bioprocessos realizados nos dois principais produtores de bioetanol mundiais (LOPES et al., 2016).

Tabela 1: Parâmetros da produção de bioetanol combustível das duas nações líderes mundiais de produção.

Características	EUA	Brasil
Principal matéria-prima	Milho	Cana-de-açúcar
Processo de fermentação	Sem reciclo de levedura	Com reciclo de levedura
Sólidos em suspensão	> 30%	< 1%
Rendimento da fermentação	85 – 90%	90 – 92%
Tempo de fermentação	54 – 72 horas	6 – 12 horas
Concentração de levedura	3 – 4 %	8 – 12%
Concentração de etanol	12 – 18% (v·v ⁻¹)	7 – 12% (v·v ⁻¹)
Operação da usina	345 dias	200 – 240 dias
Principal sub-produto	DDGS para alimentação animal	Vinhaça para fertirrigação

Fonte: LOPES et al. (2016).

A fermentação etanólica ocorre principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ela é amplamente utilizada em larga escala devido ao seu desempenho em rendimento de etanol (> 90,0% do rendimento teórico) e produtividade (> 1,0 g·L⁻¹·h⁻¹), e seu metabolismo é bem conhecido. Ela pode tolerar pH baixo e altas concentrações de etanol (> 40,0 g·L⁻¹) (AZHAR et al., 2017). Essas características possibilitam um processo não estéril. A maior parte das leveduras apresentam condições físico-químicas ótimas de crescimento de 20 a 30°C e pH entre 3,2 e 6,0 (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

É possível obter etanol a partir de diversas matérias-primas. Uma das características mais relevantes das matérias-primas utilizadas para produção de etanol é seu teor de açúcares. Cada matéria-prima requer procedimentos diferentes para sua conversão em açúcares fermentáveis assimiláveis pela levedura

(WONGSURAKUL et al., 2022). Na produção de etanol combustível, os açúcares devem ser fermentados com muita boa eficiência, pois o produto possui baixo valor agregado e o principal custo está atrelado à matéria-prima (BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004).

2.2 Matérias-primas na produção de etanol

Conhecido como álcool etílico ou quimicamente C_2H_5OH , o etanol pode ser produzido por via química ou bioquímica. A via química é baseada na hidratação de etileno, enquanto na rota bioquímica mono-, oligo- e polissacarídeos são convertidos em etanol por fermentação (LOPES et al., 2016; LOYTE et al., 2022). A maior parte do etanol combustível no mundo é produzida a partir de matérias-primas renováveis. O bioetanol pode ser classificado em quatro gerações, de acordo com a matéria-prima utilizada em sua produção: primeira geração (1G), segunda geração (2G), terceira geração (3G) e quarta geração (4G) (WONGSURAKUL et al., 2022).

O etanol 1G pode ser produzido a partir de fontes sacarinas (cana-de-açúcar e beterraba) e amiláceas (milho e trigo) (BASSO; BASSO; BASSO, 2020; LOPES et al., 2016; PETERS, 2006; SÁNCHEZ et al., 2020). A sacarose é um dissacarídeo hidrolisado em glicose e frutose pela enzima invertase (Figura 1), cuja levedura *S. cerevisiae* naturalmente pode sintetizar. Tais monômeros por sua vez podem ser fermentados. Quando o etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar, tanto o caldo quanto o xarope podem ser utilizados. O xarope é um resíduo viscoso da produção de açúcar gerado após as etapas de evaporação e cristalização do caldo de cana. Ele possui alta osmolaridade, por isso pode ser armazenado por longo período sem deterioração microbiológica. Ao ser bombeado para a dorna de fermentação, ele é previamente diluído (RUDOLF; KARHUMAA; HAHN-HAGERDAL, 2009).

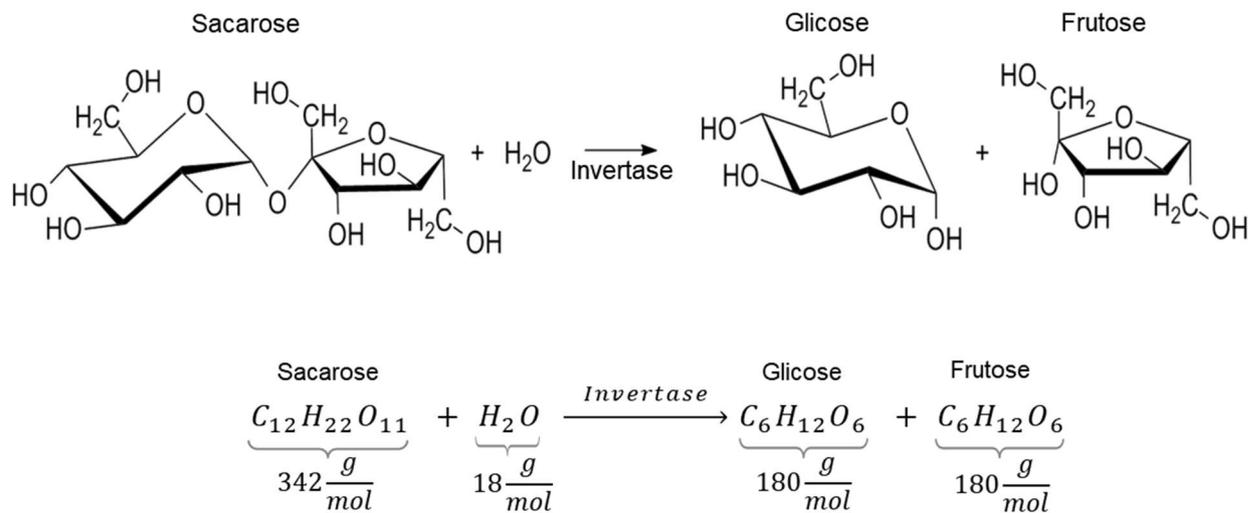


Figura 1: Hidrólise enzimática de sacarose pela invertase em glicose e frutose, assim como a estequiometria da reação. Fonte: Baseado em SCHWEINBERGER; TRIERWEILER; TRIERWEILER (2019); TOLEDO et al. (2019).

O etanol pode ser produzido a partir de amido de milho por duas vias: moagem úmida ou moagem seca. No processo de moagem úmida, primeiramente, o grão é submergido em água a 49-53°C. Isso faz com que o grão descasque, amoleça e absorva água. E então, o grão úmido é moído e germes, fibras e glúten são separados, finalmente, o amido é seco. Numa planta de moagem a seco, o grão é moído para aumentar sua área superficial, sem separação dos componentes. O amido é um polissacarídeo constituído de amilose e amilopectina (Figura 2). A amilose é um polímero linear de glicose unidas por ligações α -1,4'-glicosídicas, podendo representar de 20 a 30% da composição do amido. E, a amilopectina é um polímero não linear de glicose com ligações α -1,4'-glicosídicas na cadeia principal e ramificações com ligações α -1,6'-glicosídicas (RUDOLF; KARHUMAA; HAHN-HAGERDAL, 2009).

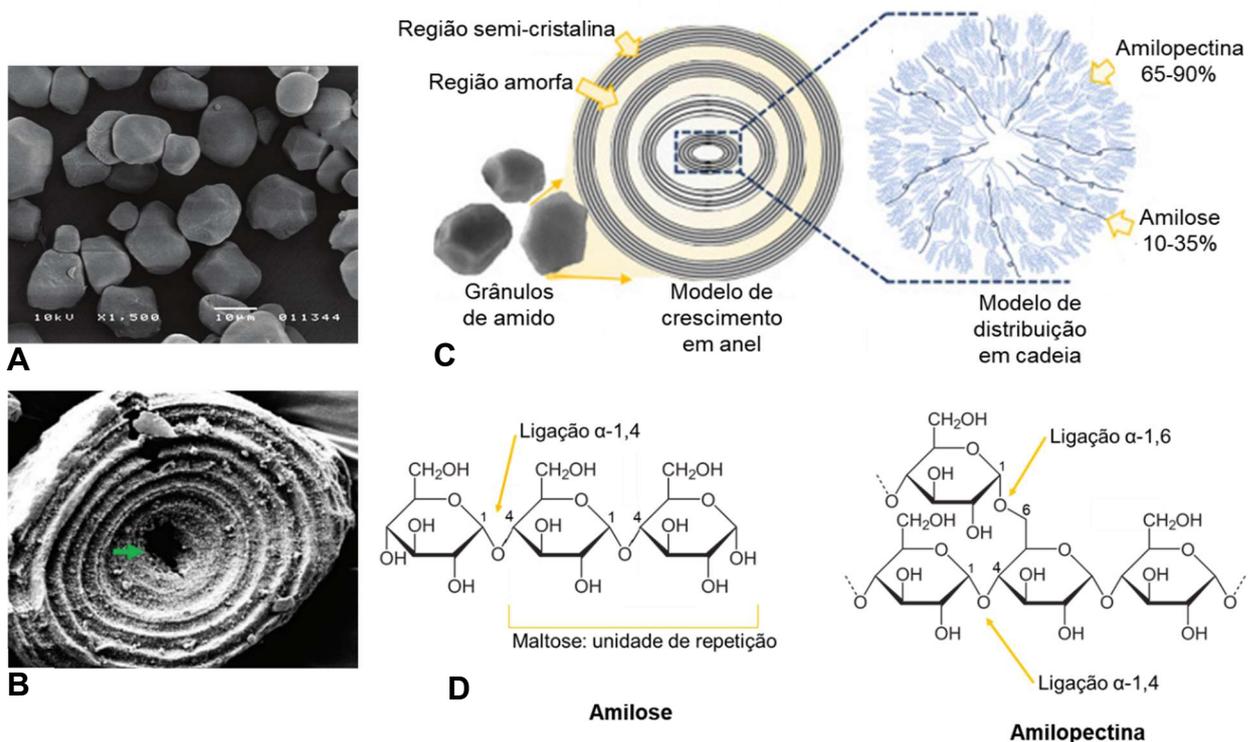


Figura 2: (a) Micrografia eletrônica de varredura (MEV) do grânulo de amido de milho. (b) MEV de uma seção do grânulo de amido. (c) Representação da estrutura do grão de amido. (d) Estrutura molecular da amilose e da amilopectina. Fonte: (a) Adaptado de SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA et al. (2012). (b) Adaptado de SEUNG; SMITH (2019). (c) Adaptado de TAO et al. (2020b). (d) Baseado em EGGLESTON; FINLEY; DE MAN (2018).

A levedura não pode fermentar amido diretamente. Portanto, a molécula precisa ser previamente hidrolisada por enzimas exógenas. Há um consórcio enzimático que age sinergicamente na hidrólise do amido (Figura 3). Dentre as enzimas amilolíticas, a α -amilase e a β -amilase podem hidrolisar o amido em produtos menores e por isso tem mais destaque. Em ambos os preparos do grão mencionados, úmido ou seco, a hidrólise do amido é semelhante. Após a moagem, o milho passa pela etapa de liquefação. Sob temperatura elevada, o amido é hidrolisado pela α -amilase em dextrinas de variados comprimentos de cadeia. E então, as dextrinas são hidrolisadas em glicose pela glicoamilase. O processo é mais econômico se a hidrólise inicial for suprimida, ou seja, se a hidrólise ou sacarificação e a fermentação forem simultâneas (SSF, do inglês, *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (RUDOLF; KARHUMAA; HAHN-HAGERDAL, 2009).

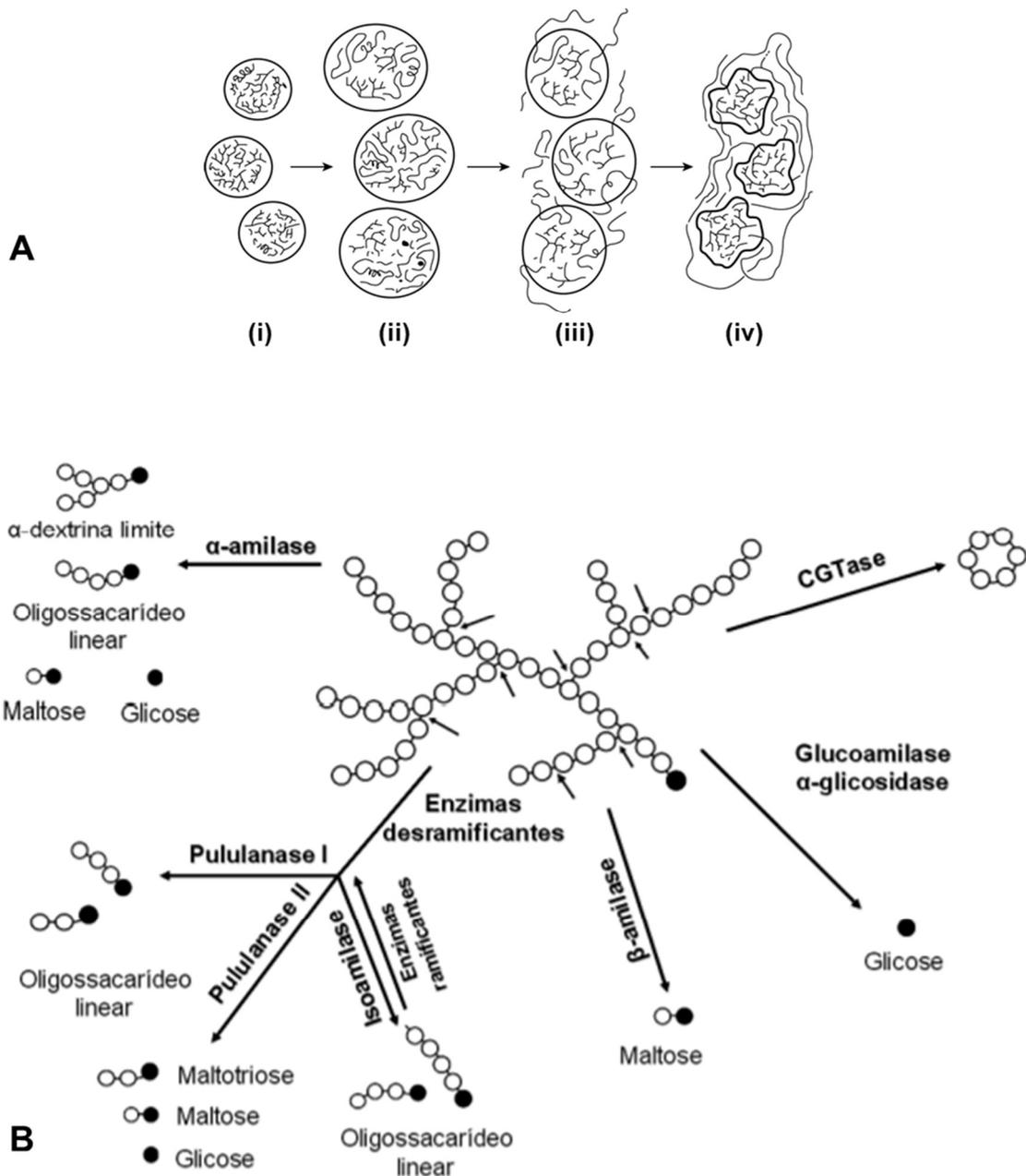


Figura 3: (a) Processo de hidratação (ii), aquecimento (iii) e formação de gel (iv) do grão de amido (i). (b) Hidrólise enzimática da amilose e da amilopectina. Fonte: (a) Adptado de GHANBARZADEH; ALMASI (2013). (b) Adaptado de CUCOLO (2009).

O etanol de segunda geração ou 2G é obtido a partir de material lignocelulósico (biomassa residual). A matéria-prima lignocelulósica é submetida à etapa de pré-tratamento (hidrólise) para obtenção de açúcares fermentescíveis. O etanol 2G é mais ambientalmente sustentável do que o biocombustível 1G, pois possibilita a utilização de matérias-primas não alimentares e, especialmente, biomassa residual. Porém,

economicamente, os processos atuais de hidrólise do material lignocelulósico restringem a aplicação dessa matéria prima na indústria. Pois, esse tratamento geralmente ocorre em condições extremas de pH ou pela aplicação de enzimas que oneram o custo de produção (AMJAD et al., 2020; DUQUE et al., 2021; SÁNCHEZ et al., 2020). Atualmente, a tecnologia de produção de etanol 1G possui maturidade comercial, enquanto o etanol 2G ainda não é competitivo (BASSO; BASSO; BASSO, 2020; SÁNCHEZ et al., 2020).

As macroalgas, um recurso renovável abundante e neutro em carbono, são agora consideradas como biomassa para a produção de etanol de terceira geração (3G). Com várias espécies ricas em carboidratos, macroalgas são conhecidas por seu baixo ou nulo teor de lignina, e são adequadas à produção de bioetanol (BORINES; DE LEON; CUELLO, 2013). Entretanto, a baixa produção de biomassa obtida ainda inviabiliza sua aplicação em escala industrial. Ademais, a obtenção da biomassa demanda elevado consumo energético. Para um processo 3G economicamente viável, é necessário melhorar seu custo-benefício e sua eficiência energética (BEHERA et al., 2015).

O etanol 4G, por sua vez, é aquele obtido após o processamento de algas geneticamente modificadas. Vale ressaltar que apenas o etanol 1G e 2G foram produzidos comercialmente (GONÇALVES et al., 2021).

Mesmo dispondo de amplas possibilidades de matéria-orgânica para a fermentação alcoólica, a definição da matéria-prima segue algumas restrições, como cultura agrícola local, aspectos ambientais e de segurança alimentar (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Atualmente, é possível produzir etanol a partir de diferentes matérias-primas numa mesma planta industrial e superar o período de entressafra (LOPES et al., 2016).

A matéria-prima selecionada configura a composição de açúcares e nutrientes do mosto. Portanto, a matéria-prima influencia fatores inerentes à fermentação, tais como, a eficiência da fermentação e a formação de metabólitos secundários (PETERS, 2006). Por isso, é essencial compreender como os parâmetros da fermentação estão relacionados com os princípios da bioquímica da fermentação para

obter um bioprocesso bem sucedido (BAI et al., 2004; BREXÓ; SANT'ANA, 2017; CARVALHO et al., 2003).

2.3 Bioquímica da fermentação de etanol

A fermentação é o processo bioquímico de oxidação incompleta da glicose (a oxidação ocorre em nível de substrato). Nesse processo um produto oxidável é formado (Figura 4). Ela ocorre em duas sequencias: glicólise (via EMP ou Embden-Meyerhof-Parnas) e metabolismo anaeróbico do piruvato. Na via glicolítica uma molécula de glicose é convertida por meio de dez reações subsequentes enzimáticas em duas moléculas de piruvato que formam também por reações enzimáticas acetaldeído, e então, etanol (NELSON; COX, 2018).

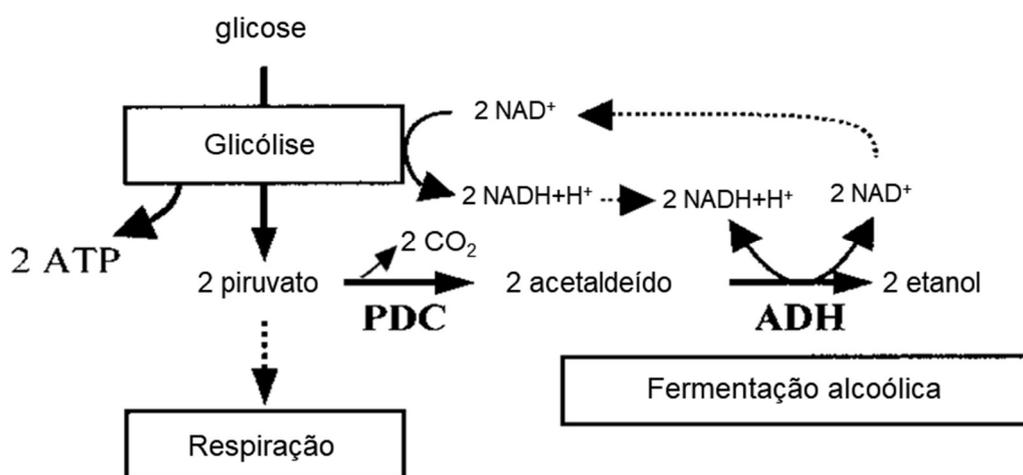
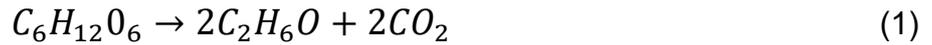


Figura 4: Diagrama da via metabólica da fermentação alcoólica. Fonte: Adaptado de SAIKA et al. (2006).

Segundo a equação estequiométrica de Gay-Lussac, teoricamente, a fermentação produz até 0,51 g de etanol e 0,49 g de CO₂ a cada 1,00 g de glicose consumida (vide Equações 1 e 2) (ABO et al., 2019; NELSON; COX, 2018). Na prática, entretanto, o rendimento máximo estimado é 0,484 g de etanol/g de glicose, ou 94,7% em relação ao teórico. Isso porque a levedura também demanda energia para a síntese de novas células e outros subprodutos. Na indústria brasileira, entretanto, o rendimento de etanol situa-se na faixa de 92 a 93% do valor teórico. Enquanto, o percentual restante supri o metabolismo da célula (ABO et al., 2019; AMORIM et al., 2011).



$$Y_{P/S} = \frac{92g \text{ etanol}}{180g \text{ glicose}} = 0,511g \cdot g^{-1} \quad (2)$$

Cada molécula de açúcar desviada da fermentação implica na perda de duas moléculas de piruvato que poderiam ser utilizadas para a produção de duas moléculas de etanol pela levedura (NELSON; COX, 2018).

O glicerol e o succinato são os principais subprodutos da fermentação alcoólica. Nesse caso, aproximadamente 3-5% do substrato é utilizado pela levedura na síntese de subprodutos. A formação de glicerol ocorre quando há escassez de oxigênio para a regeneração do NAD^+H^+ oxidando o $NADH^+H^+$. Enquanto o succinato é formado em aerobiose sob altas concentrações de glicose pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). No ciclo do ácido cítrico, o acetaldeído eventualmente pode formar acetato. Apesar de ser um produto secundário minoritário, o acetato provoca o acúmulo de $NADH$ que induz a formação de glicerol (BABAZADEH et al., 2017; BIDEAUX et al., 2006).

No decorrer da fermentação, o acúmulo de etanol no meio causa estresse à célula. Isso retarda o processo e provoca morte celular. Ademais, as leveduras podem ser inibidas pela concentração de substrato. O estresse provocado pela diferença de pressão osmótica fora e no interior da célula resulta em perda de células viáveis, crescimento reduzido e células com tamanhos menores (STANLEY et al., 2010; VOORDECKERS et al., 2020).

Além disso, a fermentação na produção de etanol é não estéril. Devido ao alto teor de compostos orgânicos e inorgânicos das matérias primas, a fermentação é suscetível ao crescimento de vários microrganismos contaminantes, que afetam a eficiência da fermentação da levedura. Um dos problemas mais pertinentes na fermentação industrial é a contaminação microbiana (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; PETERS, 2006; SEO et al., 2020).

2.4 Contaminação na produção de etanol

A produção industrial de etanol combustível já ocorre na presença de contaminações microbianas (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011). As matérias-primas utilizadas para a produção de etanol em geral constituem ambientes hospícios para o crescimento de vários tipos de microrganismos; sendo fontes de nutrientes orgânicos e inorgânicos (PETERS, 2006). A redução do rendimento de etanol está frequentemente associada ao aumento da contaminação microbiana na dorna de fermentação (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; TSE; WIENS; REANEY, 2021).

É possível escalar várias implicações associadas à contaminação microbiana durante o processo fermentativo (Figura 5): redução do rendimento e da produtividade de etanol, consumo de açúcares fermentescíveis, oxidação do etanol através da fermentação acética, perda de velocidade de crescimento da levedura e aumento do tempo de batelada ou mesmo causando morte celular das leveduras devido à toxinas e ácidos orgânicos secretados no mosto. O ácido láctico e o ácido acético, formados pela contaminação bacteriana, podem inibir o metabolismo e o crescimento de leveduras que é agravado pela presença das bactérias viáveis. Isso porque a síntese de ácidos orgânicos diminui o pH do meio. A contaminação pode inclusive impossibilitar o reciclo de leveduras (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007; SEO et al., 2020).

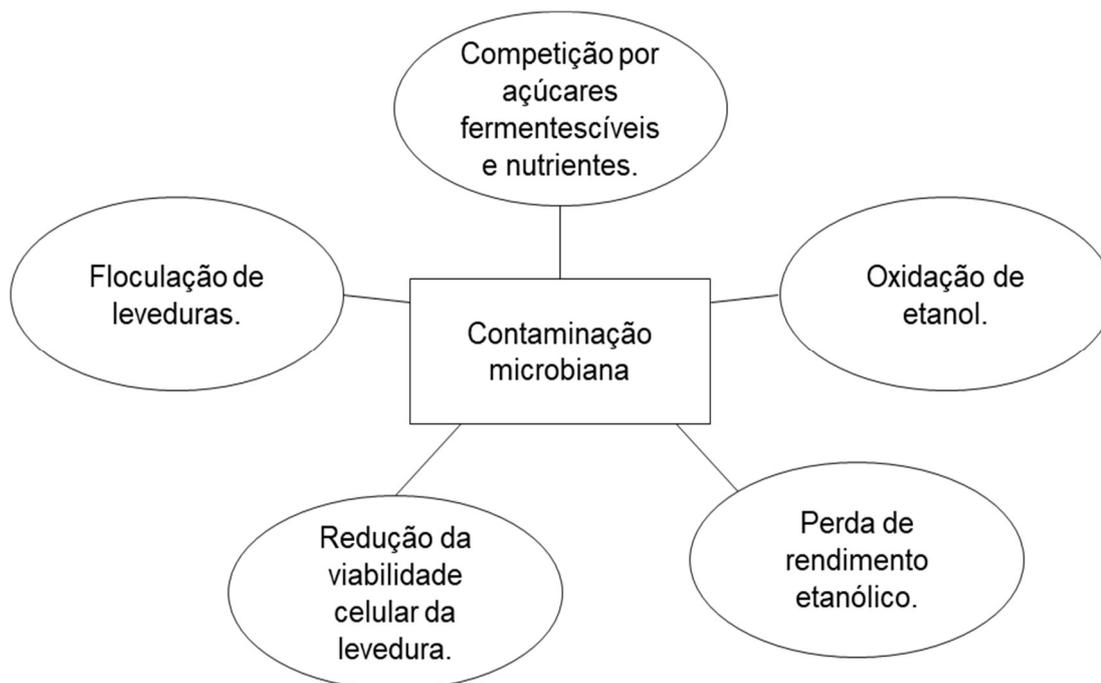


Figura 5: Implicações associadas à contaminação microbiana na fermentação etanólica. Fonte: Baseado em BREXÓ; SANT'ANA (2017); NOBRE; HORII; ALCARDE (2007).

Dentre as bactérias contaminantes no bioprocessamento de etanol, espécies dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, principalmente, afetam a eficiência da fermentação, ou mesmo, podem estagnar o processo, sendo necessário parar a planta para limpeza antes de iniciar uma nova fermentação (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). As bactérias ácido lácticas (BAL) são infecções bem comuns no bioprocessamento etanólico, isso porque são tolerantes ao etanol e à baixo pH (LUCENA et al., 2010). BISCHOFF e colaboradores (2009), avaliaram o efeito da contaminação de sacarificado de milho por *Lactobacillus fermentum* na produção de etanol e constataram que uma contaminação de 10^8 UFC·mL⁻¹ provocou uma redução de 27% no rendimento de etanol e aumento de 39,3 g·L⁻¹ na concentração de glicose residual.

A contaminação por leveduras selvagens também é um problema recorrente. Muitos gêneros de leveduras são capazes de sintetizar etanol, em especial, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Pichia* (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

As relações intermicrobianas definem a comunidade permanente, assim como sua dinâmica e sua funcionalidade. Um estudo do efeito da contaminação abrange

vários fatores, tais como, tipo de matéria-prima, os tipos de estirpes e a sinergia microbiana, a carga de contaminantes e a cinética bioquímica (LINO et al., 2021).

Mediante sua relevância, a diversidade microbiana na produção de etanol vem sendo investigada em muitos estudos (COSTA et al., 2015; FIRMINO et al., 2020; LI; HEIST; MOE, 2016; QUEIROZ et al., 2020). Identificar a contaminação microbiana e entender a contaminação potencialmente persistente e dominante é uma informação chave para entender e escolher quando e qual método de controle da contaminação é mais apropriado (CECCATO-ANTONINI, 2018).

2.5 Método de identificação e caracterização de microrganismos

Por muitos anos, a identificação e caracterização microbiana foi realizada exclusivamente pela abordagem fenotípica (caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica). Porém, esse método é considerado demorado, requer trabalho intensivo e seus resultados conduzem muitas vezes a incertezas (FRANCO-DUARTE et al., 2019). O advento das tecnologias omicas (genômica, transcriptômica, proteômica, metagenômica, metatranscriptômica e metabolômica) ampliou as fronteiras da ciência. Via de regra, tais tecnologias possibilitaram cada vez melhor realizar a caracterização de microrganismos. Além do progresso tecnológico, busca-se constantemente estratégias para reduzir os custos, tornando essas ferramentas mais acessíveis (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; YUGI et al., 2016). Na Figura 6 foi apresentado um esquema com uma visão geral dos métodos de identificação microbiana.

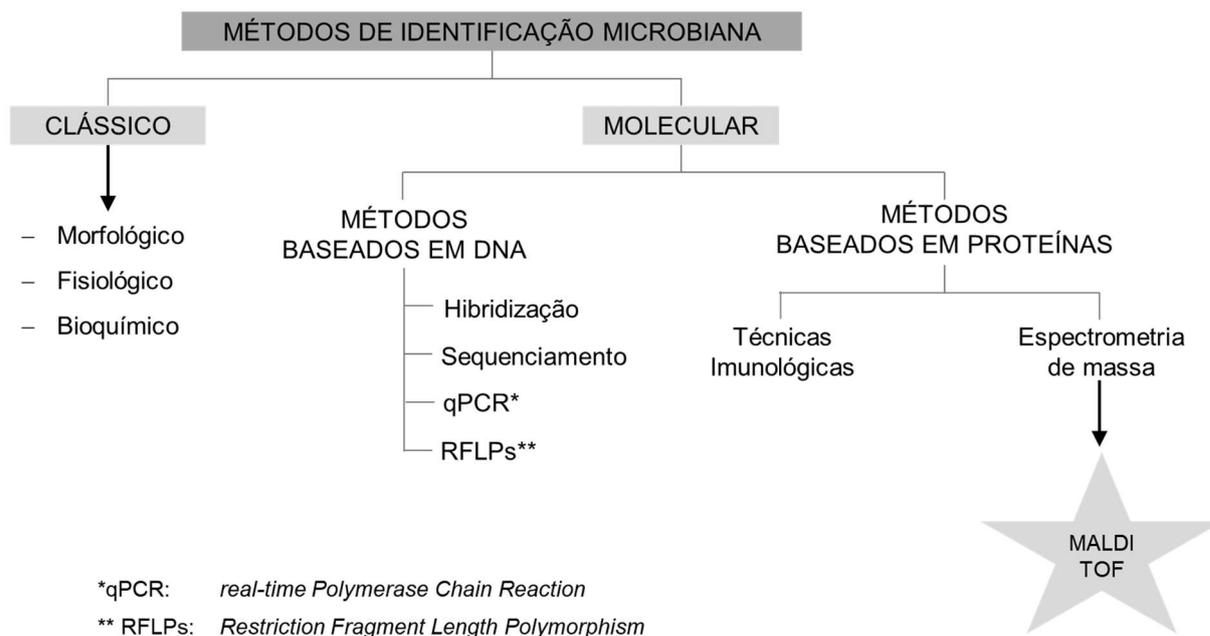


Figura 6: Fluxograma sintetizando os métodos de identificação de microrganismos. Fonte: Adaptado de QUINTELA BALUJA et al. (2014).

Os microrganismos são tradicionalmente classificados com base em suas propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (HIERRO et al., 2004). Os métodos utilizados levam em consideração muitos aspectos, tais como, a morfologia da colônia, crescimento em meio seletivo, velocidade de crescimento, metabolismo, patogenicidade, resistência a antibióticos, entre outros (NELSON; COX, 2018). Porém, além de ser um método complicado e demorado, também pode ser ambíguo conduzindo à resultados equivocados. O advento de tecnologias biomoleculares possibilitou caracterizar e identificar microrganismos com base no DNA de maneira rápida e precisa em relação aos métodos mais tradicionais (HIERRO et al., 2004).

As técnicas moleculares representam uma ferramenta importante para a identificação de microrganismos. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) possibilitam a diferenciação intraespécie e a identificação de espécies de microrganismos. Na reação de PCR, sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* - DNA) são amplificadas *in vitro*. Por meio dela, é possível amplificar exponencialmente o DNA a partir de uma quantidade inicial de material

genético pequena (DEVESA-PEIRÓ; SÁNCHEZ-REYES; DÍAZ-GIMENO, 2020; VALONES et al., 2009).

Instrumentações analíticas inovadoras possibilitaram a aplicação da espectrometria de massas na identificação de biomoléculas. Isso porque tornou-se possível obter espectros com boas resoluções de proteínas intactas. E, assim, emergiu um método proteômico de identificação microbiana mais rápido e mais econômico, baseado em impressões digitais ribossomais (CLARK et al., 2018).

Um entendimento mais detalhado do sequenciamento genético e da identificação microbiana por meio de espectrometria de massas, alguns dos principais métodos de identificação amplamente utilizados, pode ser adquirido nos subtópicos 2.5.1 e 2.5.2 desta seção.

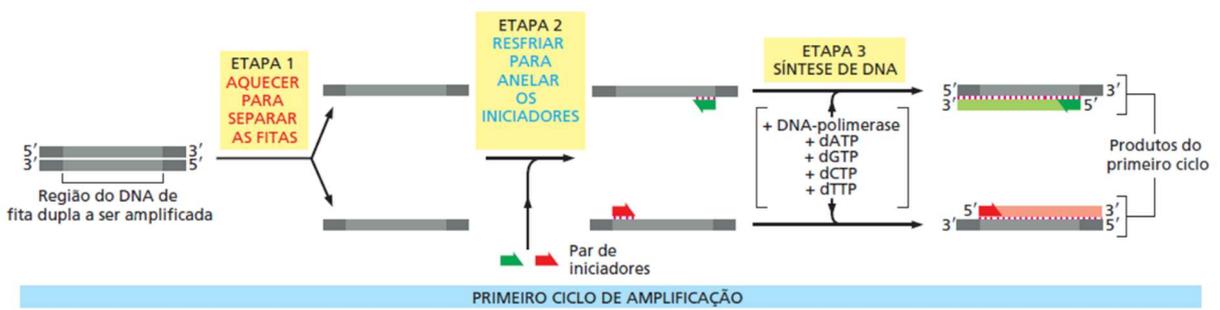
2.5.1 Identificação pelo sequenciamento do gene 16S/18S

O sequenciamento de pequenas subunidades do gene rRNA é uma abordagem amplamente aplicada na identificação e caracterização microbiana, devido à sua ubiquidade em todos os domínios da vida. Então, sequências de DNA amplificadas (*amplicons*) do gene 16S rRNA em Bactérias e Archaea ou gene 18S rRNA em Eukarya são impressões digitais dos microrganismos. Essa técnica envolve as seguintes etapas: rompimento celular, purificação do DNA e amplificação pela reação de PCR, eletroforese, purificação do produto de PCR, sequenciamento genético e análise dos dados (SINCLAIR et al., 2015).

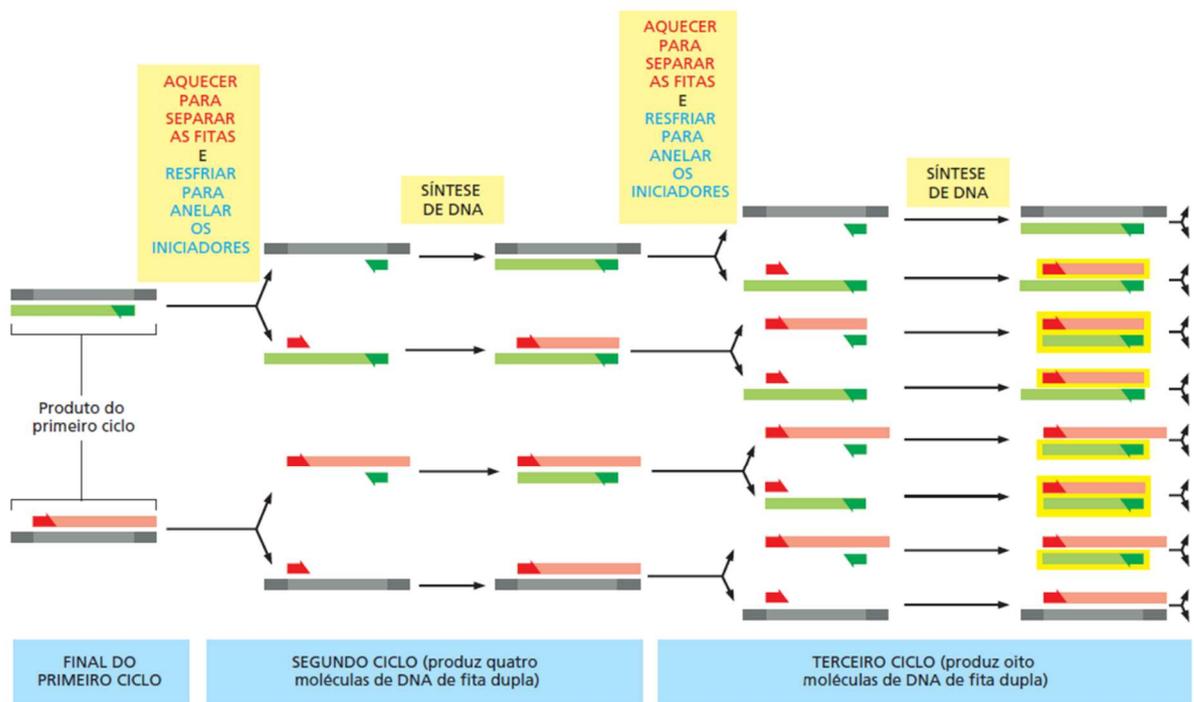
Normalmente utilizados no rompimento celular, detergentes como CETAB (brometo de cetiltrimetil amônio), lauril sulfato de sódio, triton e dodecil sulfato de sódio (SDS) são capazes de emulsificar lipídeos da membrana e dissociam lipoproteínas. Detergentes promovem a lise celular por meio da remoção das camadas lipídicas da membrana externa e da parede celular, expondo o DNA para a purificação. Os solventes orgânicos atuam como agentes desproteinizantes. Esses agentes rompem a integridade celular e desnaturam proteínas. Assim, eles fazem com que os ácidos nucleicos fiquem em solução aquosa. O EDTA é um agente quelante bastante

utilizado. Ele quelata íons divalentes, por exemplo, o íon de magnésio Mg^{2+} . Muitas proteínas de membrana e muitos constituintes celulares dependem desses cátions de valência. Ademais, o íon Mg^{2+} é um cofator enzimático de muitas nucleases, principalmente DNAses. Ao formar um complexo quelante com o Mg^{2+} , o EDTA inibe a ação dessas enzimas e, conseqüentemente, a degradação do DNA (HARRISON, 2011; OTTO et al., 2012; PRAPULLA; KARANTH, 2014).

Na amplificação enzimática do DNA pela reação de PCR, cópias de DNA são feitas *in vitro* (Figura 7). Para isso, misturam-se elementos básicos da replicação natural do DNA: o DNA molde, dois iniciadores de oligonucleotídeos (*primers*) que definem a sequência gênica a ser amplificada, a enzima Taq ou outra polimerase de DNA termoestável, desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs) e um tampão (OTTO et al., 2012; SHENDURE et al., 2017). A técnica é feita por meio do termociclador onde é possível programar temperatura e tempo de atuação de cada etapa da reação, a fim de amplificar um fragmento de interesse definido pelos oligonucleotídeos iniciadores senso (5'-3') e antissenso (3'-5') específico que se liga ao DNA molde naquele ponto de interesse (BANOS et al., 2018; WAGNER et al., 2018).



(A)



(B)

Figura 7: Representação esquemática da reação em cadeia da enzima polimerase (PCR). Em (A), detalhe do primeiro ciclo da PCR. E, em (B), a reação em (A) foi resumida para vários ciclos consecutivos da PCR. Fonte: ALBERTS et al. (2017).

Na reação de PCR, em geral, a Taq polimerase e dois pares de oligonucleotídeos iniciadores universais, correspondentes ao gene que codifica RNA ribossomal 16S em bactérias ou 18S em fungos são utilizados. O rRNA é componente dos ribossomos e está presente em todas as células e, assim, ele é considerado um biomarcador ideal. Portanto, os microrganismos isolados devem amplificar utilizando esses iniciadores (KOUNOSU et al., 2019; LIU et al., 2019; SAMBO et al., 2018; THIJIS et al., 2017).

Para a identificação dos microrganismos, o material genético sequenciado é comparado às informações num banco de dado público, o BLAST utilizando o banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (AGARWALA et al., 2016).

2.5.2 Identificação dos microrganismos por espectrometria de massas: MALDI-TOF

A espectrometria de massas foi desenvolvida para identificar moléculas de baixo peso molecular em misturas complexas. Entretanto, tecnologias mais avançadas possibilitam sua aplicação também para a identificação de macromoléculas biológicas. Tipicamente, um espectrômetro de massas possui uma fonte ionizante, um analisador de massas e um detector. Na fonte ionizante, as amostras são ionizadas e os íons transferidos para a fase gasosa. Então, os íons podem ser separados por campo magnético ou elétrico e, eventualmente, por tempo de voo, dependendo do analisador de massas (TORRES-SANGIAO; LEAL RODRIGUEZ; GARCÍA-RIESTRA, 2021).

Há muitos tipos de fontes ionizantes e analisadores. Porém, na identificação microbiana, a fonte de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês, matrix-assisted laser desorption ionization) é uma das principais utilizadas, pois é uma fonte de ionização branda evitando degradação da amostra. O analisador mais comumente associado à fonte de ionização MALDI é o analisador de massas por tempo de voo (TOF, do inglês, time-of-flight). Então, no sistema MALDI-TOF, a amostra imersa numa solução matriz forma íons protonados na fase gasosa, quando o feixe de laser (337 nm) incide sobre a mesma (Figura 8). Um campo eletrostático acelera os íons fazendo com que passem pelo analisador de massas, onde ocorre a separação. Os íons com maior massa possuem maior tempo de voo, ou seja, gastam mais tempo no tubo do analisador e demoram mais para chegar até o detector (AVANZI et al., 2016; PARCHEN; DE VALK, 2019). E então, um espectro baseado na razão entre a massa e sua carga líquida ($m \cdot z^{-1}$), na forma ionizada, de uma molécula e seus fragmentos possibilita identificar a amostra (POSTERARO et al., 2013).

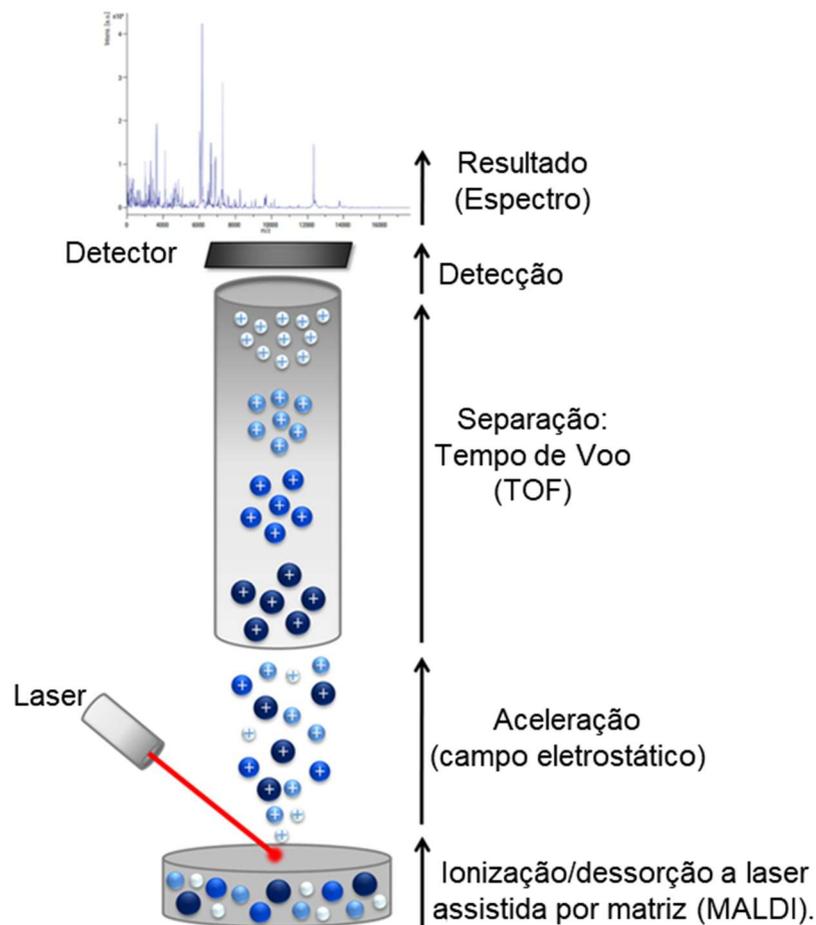


Figura 8: Esquema dos componentes do espectrômetro de massas MALDI-TOF e das etapas desde a ionização de proteínas até o espectro. Fonte: (PARCHEN; DE VALK, 2019).

O espectro de massas é emitido de acordo com os íons de superfície das células. Esses elementos de superfície estão relacionados com as características fisiológicas microbianas e, portanto, à identidade do microrganismo. Além disso, os espectros podem registrar proteínas ribossomais. A constituição proteica varia entre espécies, estirpes e subespécies. Então, por meio do espectro específico gerado, é possível identificar até microrganismos muito relacionados. O comparativo entre espectros de microrganismos desconhecidos e referências levam à identificação (PATEL, 2015; SINGHAL et al., 2015).

O MALDI-TOF tem sido aplicado com muito sucesso na identificação de microrganismos. Ele se tornou o método de referência por ser simples, rápido e

altamente reprodutível (BLOISE et al., 2022). Essa técnica possui grande potencial para substituir as técnicas moleculares (WELKER et al., 2019).

À medida que esta técnica é mais aplicada, os bancos de dados vão sendo aprimorados e ficando mais completos. Nesse caso, ao contrário do BLAST que é de uso livre, o banco de dados é particular. Então, os dados são avaliados mais criteriosamente antes de serem atualizados (PATEL, 2015; SINGHAL et al., 2015).

2.6 Controle da contaminação microbiana

Na indústria de etanol combustível, a contaminação microbiana é um aspecto pertinente e deve sempre ser monitorada especialmente durante a fermentação. Às vezes, é necessário intervir no processo para reduzir a contaminação microbiana de modo incisivo, aplicando procedimentos de descontaminação química, biológica ou física.

Embora antibióticos sejam utilizados industrialmente, alternativas para o controle da contaminação evitando usar os mesmos são mais propensas, devido aos impactos ambientais causados pelos resíduos contendo os antibióticos e ao surgimento de microrganismos resistentes (HOFF et al., 2021; NARENDRANATH; POWER, 2004). Os processos de descontaminação química (com ácidos, amônia, peróxido de hidrogênio, entre outras formas), apesar de serem soluções efetivas no controle da contaminação, apresentam efeito deletério em relação às leveduras e são tóxicos ao meio ambiente (SEO et al., 2020).

O controle da carga microbiana por feixe de elétrons é um processo alternativo eficiente de descontaminação que pode ser instalado na linha de produção visando controlar a contaminação do mosto. Essa tecnologia é segura e requer um curto tempo de exposição à radiação ionizante (CALEGARI et al., 2023).

2.6.1 Controle da contaminação microbiana por radiação ionizante

O acelerador de elétrons é um sistema dotado de um cátodo, um ânodo e um tubo de vácuo, onde um potencial de milhões de volts é estabelecido. O cátodo emite feixe de elétrons, um tipo de radiação ionizante, denominado raios catódicos ou feixes eletrônicos (LUNG et al., 2015). Um esquema representando os componentes e a funcionalidade do acelerador de elétrons pode ser observado na Figura 9.

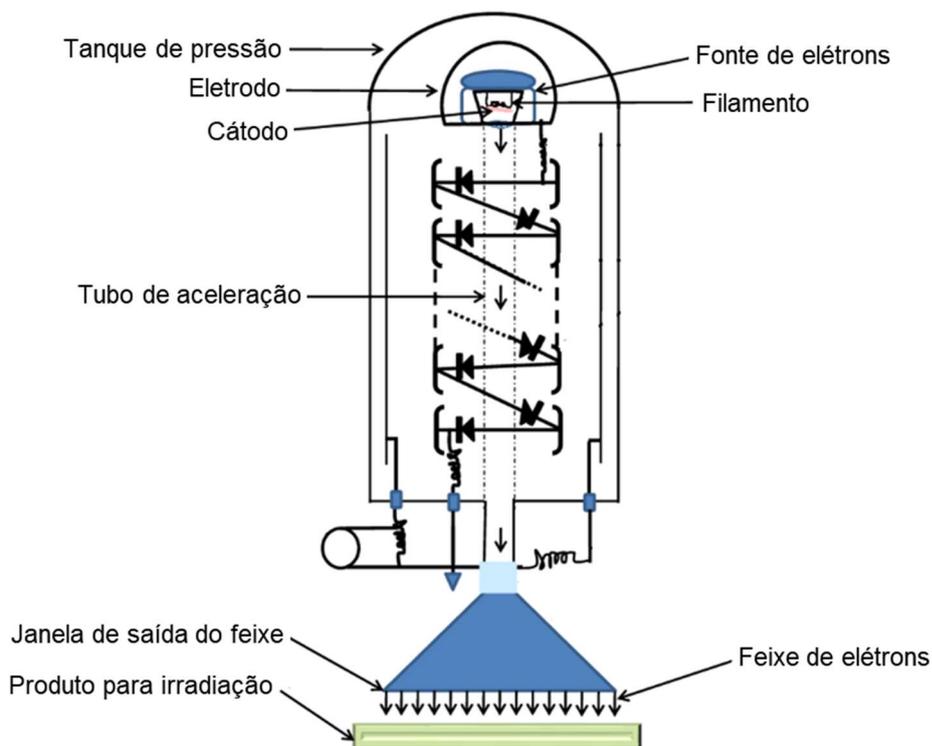


Figura 9: Representação do acelerador de elétrons Dynamitron®. Fonte: Adaptado de CHAUDHARY et al. (2020).

A ionização gera íons, elétrons, átomos e moléculas excitadas. Então, a energia adquirida é distribuída à matéria circundante até que o equilíbrio seja reestabelecido. A energia absorvida pela matéria ao redor pode gerar outras espécies, tais como, radicais livres reativos H^+ (agente redutor) ou OH^- (agente oxidante). Esses são bastante reativos e podem oxidar, reduzir, dissociar e degradar outras moléculas. Os radicais livres podem ainda interagir entre si formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3), por exemplo. Assim, tanto a radiação ionizante pode incidir diretamente sobre a molécula, quanto produtos da interação da mesma com a água podem reagir com a molécula alvo (LUNG et al., 2015).

A radiação tem efeitos antimicrobianos diretos e indiretos. Ela pode afetar o material genético da célula, impedindo suas funções vitais e reprodução (FELLOWS, 2018). Ela também pode causar mutações no DNA ou sua degradação. Logo, em condições mais severas, a radiação é letal.

Além disso, a radiação pode lesionar a membrana plasmática e incidir sobre proteínas. Os produtos da interação entre a radiação e moléculas de água no interior da célula também podem interagir com ácidos nucleicos e podem apresentar efeitos similares àqueles diretos da radiação. A resistência à ionização está proporcionalmente associada ao peso molecular de compostos orgânicos. A radiação ionizante já foi amplamente testada para o controle da contaminação. Os esporos de bactérias são mais resistentes, sendo necessário doses entre 10 e 50 kGy para descontaminação dos mesmos (KHANEGHAH et al., 2020; MADIGAN et al., 2010a).

Em processos com mosto de cana submetido a doses de 2 a 10 kGy, o rendimento de etanol aumentou sendo similar aquele obtido com antibiótico químico. O sistema de radiação ionizante por feixe de elétrons pode ser instalado na própria linha de produção da indústria sucroalcooleira. Ademais, o acelerador de elétrons equipado com sistema liga/desliga é uma opção prática e interessante (PODADERA, 2007).

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da contaminação inerente às matérias-primas no rendimento etanólico da fermentação de mosto misto. Buscando cumprir seu propósito, o trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a comunidade microbiana cultivável de amostras de hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana;
- Estudar o efeito da contaminação microbiana inerente às matérias-primas no rendimento de etanol na fermentação de mosto misto;
- Analisar a influência da concentração inicial de inóculo de Ethanol red™ no rendimento etanólico;
- Realizar o aumento de escala das condições ótimas de fermentação em relação à proporção de mosto misto, ao tratamento de controle da contaminação e à concentração de inóculo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios conduzidos nesse projeto seguiram duas principais abordagens: a caracterização da microbiota presente nas amostras de matérias-primas e o efeito da contaminação no rendimento etanólico. Uma visão geral do projeto pode ser observada por meio da Figura 10 e da Figura 11.

Inicialmente, foi realizado o isolamento microbiano das amostras de matéria-prima em três meios de cultivo. Os microrganismos isolados foram identificados por dois métodos, o método proteômico MALDI-TOF e o método de sequenciamento genético. Também foram analisadas a cinética de crescimento e a mínima concentração de etanol que inibiria o crescimento deles.

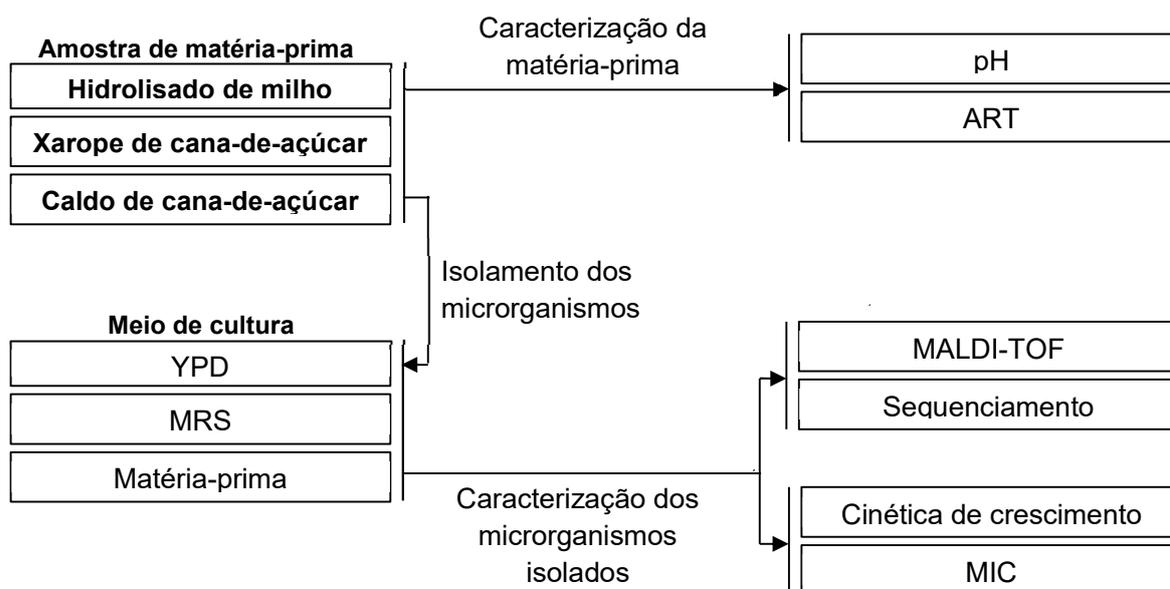


Figura 10: Fluxograma do processo de caracterização da microbiota das matérias-primas.

No segundo segmento, o efeito da contaminação no rendimento etanólico foi analisado contemplando duas óticas. Na primeira delas, sob diferentes condições de mosto misto (à esquerda na Figura 11). Os mostos mistos consistiram em três proporções de hidrolisado de milho e xarope de cana. Então, cada mosto misto foi submetido à dois tratamentos que possibilitariam eliminar a contaminação advinda das matérias-primas. Ademais, objetivou-se verificar o rendimento etanólico variando a concentração inicial de inóculo (à direita na Figura 11). Amostras de mosto e vinho

foram analisadas em relação à contaminação, ao rendimento de etanol e à síntese de glicerol.

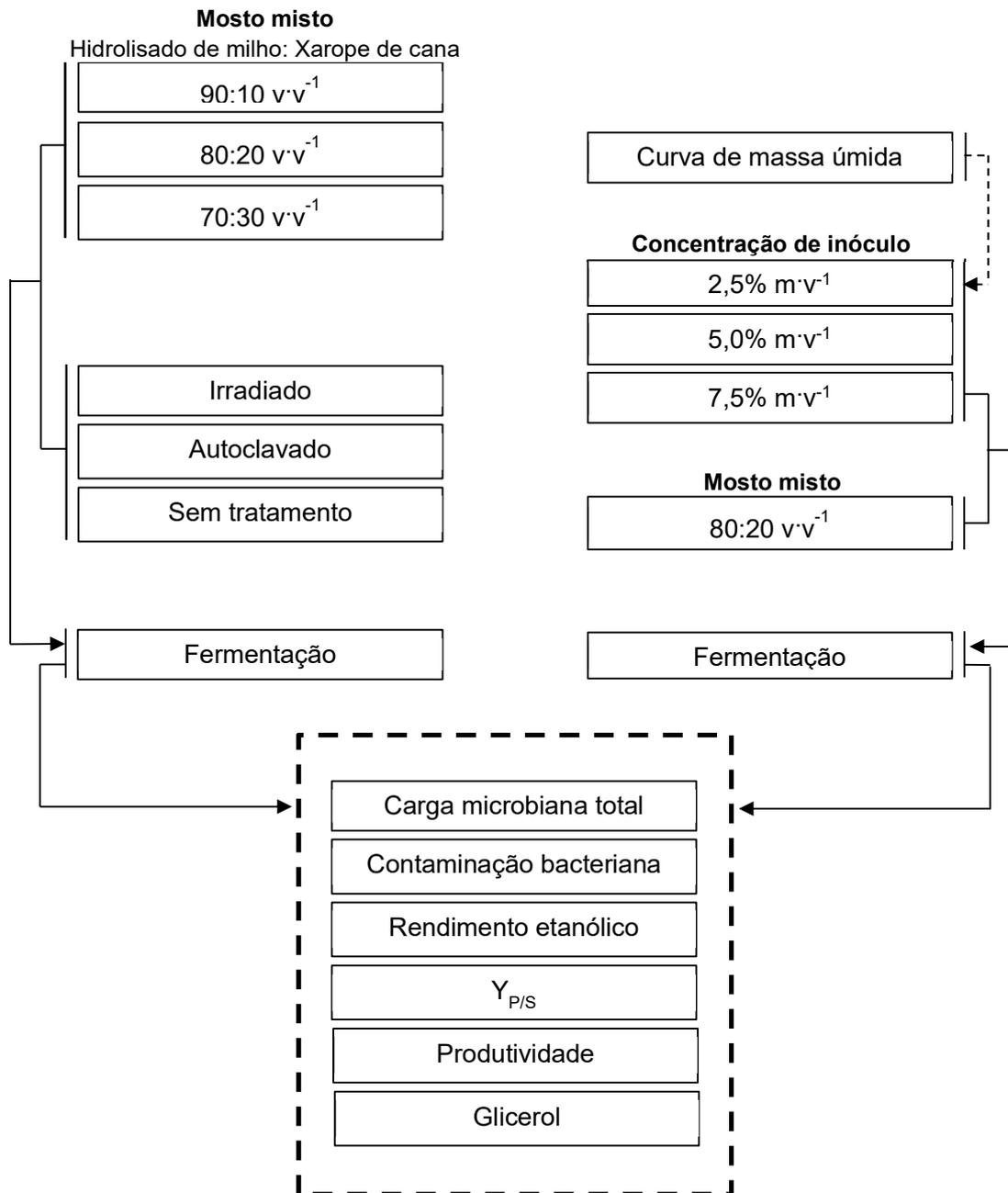


Figura 11: Fluxograma do estudo do efeito da contaminação no rendimento de etanol.

4.1 Obtenção das matérias-primas

As matérias-primas utilizadas foram: hidrolisado de milho, xarope de cana-de-açúcar e caldo de cana-de-açúcar. O hidrolisado de milho e o xarope de cana-de-açúcar foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (GTS-Bio) da ESALQ-USP. Enquanto, o caldo de cana-de-açúcar foi obtido por meio de um garapeiro do comércio local.

Durante a recepção das matérias primas, todo hidrolisado de milho fracionado foi homogeneizado num único recipiente e foi novamente distribuído em frascos para armazenamento à -20°C. O mesmo procedimento foi realizado para o armazenamento do xarope de cana. Além disso, amostras das matérias primas foram coletadas para subsequente caracterização da composição de açúcares redutores.

4.2 Meios de cultivo

Neste trabalho foram utilizados os meios de cultivo YPD e MRS (Merck). O meio YPD foi preparado conforme composição descrita na Tabela 2. Enquanto, o meio de cultura seletivo MRS possui composição descrita por de Man, Rogosa e Shape (1960) (Tabela 3).

Tabela 2: Composição do meio de cultivo YPD.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de levedura	10
Bacto-peptona	20
Dextrose	20

Fonte: ALBERS; LARSSON (2009).

Tabela 3: Composição do meio de cultivo MRS.

Componente	Concentração (por litro)
Peptona	10 g
Extrato de carne	10 g
Extrato de levedura	5 g
Glicose	20 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3(\text{H}_2\text{O})$	5 g
$\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$	2 g
$\text{MgSO}_4\cdot 5(\text{H}_2\text{O})$	0,2 g
$\text{MgSO}_4\cdot 4(\text{H}_2\text{O})$	0,05 g
Tween 80	1 mL

Fonte: DE MAN; ROGOSA; SHARPE (1960).

Ademais, foram preparados meios de cultivo à base de hidrolisado de milho, xarope de cana-de-açúcar e caldo de cana-de-açúcar, diluindo a matéria-prima até obter cerca de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares redutores totais. Para preparar meios sólidos, foram adicionados $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ágar-ágar.

4.3 Isolamento e manutenção de microrganismos

Foram realizadas diluições decimais seriadas de 10^{-1} à 10^{-4} vezes a concentração original das amostras de matérias-primas: hidrolisado de milho, xarope de cana-de-açúcar e caldo de cana-de-açúcar. Alíquotas de $5 \mu\text{L}$ das diluições e das amostras originais foram transferidas com o auxílio de uma micropipeta para placas de Petri contendo meio sintético YPD ou meio seletivo MRS utilizando a técnica de

semeadura por espalhamento. As amostras e suas diluições também foram inoculadas em meios de cultivo sólidos à base do respectivo substrato. As placas foram incubadas em estufa a 30,5°C por aproximadamente 48 horas. E então, as colônias microbianas morfológicamente distintas foram repicadas pela técnica de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo o mesmo tipo de meio de cultivo do qual foram isoladas (MURUAGA et al., 2016; TAO; GAO; LIU, 2011). As placas foram incubadas a 30,5°C por cerca de 48 horas.

Para a manutenção criogênica dos microrganismos isolados, primeiramente, foram realizadas fermentações submersas. Então, uma colônia isolada obtida de cada microrganismo apresentando morfologia distinta foi inoculada em tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL do respectivo meio de cultivo. Os tubos foram incubados a 30,5°C por aproximadamente 48 horas. Após o período de fermentação submersa, alíquotas de 5 µL foram plaqueadas em placas de Petri contendo o mesmo tipo de meio de cultivo de origem do inóculo. Esse procedimento visou verificar a obtenção de microrganismos isolados.

Na mesma fermentação submersa, foram adicionados em cada tubo Falcon 10 mL de solução de glicerol 40% v·v⁻¹. Foi adicionada uma solução de glicerol 40% v·v⁻¹ para facilitar sua homogeneização no meio de cultivo. A concentração final de glicerol em cada tubo atingiu 20% v·v⁻¹. Após homogeneizar bem cada meio, alíquotas de 1mL foram distribuídas em microtubos tipo Eppendorf de 2 mL. Enfim, as culturas foram estocadas em ultracongelador à -80°C (AUSTIN, 2017; KOH, 2013).

4.4 Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF

A identificação dos microrganismos isolados foi feita por espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser por matriz assistida, utilizando o equipamento MALDI-TOF Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Colônias frescas dos microrganismos isolados cultivados em meio YPD ágar em placa de Petri foram transferidas para a placa de análise “Placa Ground Steel”. E então, adicionou-se 1 µL da solução matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em solução saturada com 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido

trifluoracético. A calibração do equipamento foi feita submetendo *Escherichia coli* como padrão. Cada espectro teve 240 leituras de 50 incidências de laser em sítios distintos da amostra (AVANZI et al., 2016).

Naqueles casos em que não foi obtida nenhuma correspondência entre o espectro de proteínas do microrganismo isolado e os espectros do banco de dados, sendo indeferida sua identificação, foi realizado então a extração de proteínas previamente à análise da espectrometria de massas. Para isso foram misturados em cada procedimento 900 µL de etanol, 300 µL de água deionizada e uma colônia microbiana e centrifugados por 3 minutos a 10000 rpm, enfim, o sobrenadante foi descartado. E então, foram adicionados ao microtubo 50 µL de solução de ácido fórmico 70% v·v⁻¹ e 50 µL de acetonitrila e centrifugado novamente por 3 minutos a 10000 rpm. Alíquotas de 1 µL do sobrenadante foram transferidas para placa de análise e foi adicionado 1 µL da solução matriz.

O software Biotyper 3.0 correlacionou o espectro obtido na análise com os espectros em um banco de dados abrangendo os domínios Archaea, Bacteria e Eukarya e expressou o grau de similaridade entre os mesmos por meio de uma pontuação (Tabela 4).

Tabela 4: Pontuação e correspondente confiança da identificação obtida pelo MALDI-TOF.

Pontuação	Descrição
2,000 a 3,000	Identificação altamente confiável.
1,700 a 1,999	Identificação pouco confiável.
0,000 a 1,699	Identificação não possível.

Fonte: BRUKER (2021).

4.5 Identificação de microrganismos por método genômico

O RNA ribossomal é um biomarcador referência, pois é um componente do ribossomo presente em todas as células, específico e pouco suscetível a mutações.

Bancos de dados genéticos fornecem informações sobre as sequências dos genes de RNAr catalogadas, possibilitando o diagnóstico de microrganismo pela correspondência entre as informações genéticas. Esse procedimento ocorre inicialmente pelo cultivo microbiano e extração do DNA cromossômico. E, subsequentes amplificação e purificação do material genético. A averiguação do processo foi feita por meio de eletroforese (CHAUDHARY et al., 2015; ENDO; TANIZAWA; ARITA, 2019).

4.5.1 Extração de DNA genômico das células microbianas

A extração do DNA genômico foi feita utilizando o kit de extração DNeasy UltraClean Microbial da Qiagen®. Ele é próprio para o isolamento do material genético de microrganismos. Os procedimentos de extração foram realizados conforme o protocolo fornecido pelo fabricante (QIAGEN, 2020). Por meio da Figura 12 é possível observar as etapas do procedimento.

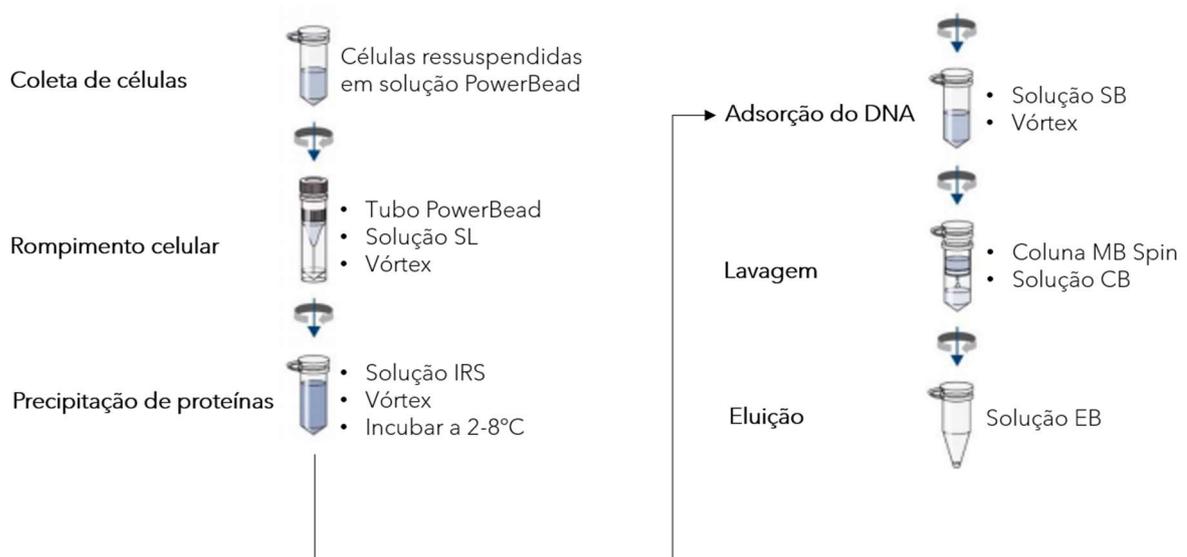


Figura 12: Representação das etapas de extração do DNA microbiano utilizando o kit DNeasy UltraClean Microbial da Qiagen®. Fonte: Adaptado de QIAGEN (2020).

Os microrganismos isolados foram cultivados em meio YPD em tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio, incubados em agitador orbital termostatizado a 30,5°C por cerca de 24 horas. Alíquotas da fermentação submersa, foram

centrifugadas e as células ressuspendidas em solução PowerBead, uma solução salina tamponante que possibilita a estabilidade e a dispersão homogênea das células, preparando as mesmas para subsequente rompimento celular. A solução SL contém dodecil sulfato de sódio (SDS) e outros agentes disruptivos importantes para a lise das células. O SDS é um detergente e atua removendo ácidos graxos e lipídeos associadas à membrana plasmática. Ele pode formar emulsões com os lipídeos da membrana e dissociar lipoproteínas, expondo o DNA para purificação.

Após o rompimento celular, a solução IRS precipita material orgânico ou inorgânico não associado ao DNA, tais como, debris celulares e proteínas. Ou seja, reduz contaminantes que podem comprometer a pureza do DNA e a aplicação do seu downstream. A purificação do DNA iniciou-se pela adsorção do DNA à membrana de sílica da coluna MB Spin. A solução SB propiciou as condições necessárias para que essa ligação ocorresse. Trata-se de uma solução salina altamente concentrada. Já a solução CB, aplicada diretamente à membrana, contendo etanol foi utilizada para limpar a membrana, carreando impurezas possibilitando a permanência da ligação do DNA à membrana.

Então, aplicou-se a solução EB para eluir o DNA através da membrana até o tubo de coleta. Isso porque o DNA permanece ligado à membrana apenas quando há sal. E, a solução EB é livre de sal. Essa solução já é apropriada para a manutenção do DNA extraído à -20°C.

4.5.2 Amplificação do material genético extraído: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando o kit ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix da Sigma-Aldrich. Ele possui a maior parte dos componentes necessários para a reação de PCR, exceto os oligonucleotídeos iniciadores e o DNA molde. As concentrações dos reagentes seguiram as instruções do fornecedor (Tabela 5). As reações foram preparadas em microtubo tipo Eppendorf® de 200 µL.

Tabela 5: Protocolo de PCR utilizando o kit ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix da Sigma-Aldrich, disponibilizado pelo fornecedor.

Reagente	[] Estoque	[] Final	Volume total: 50 µL
ReadyMix Taq PCR Reagent Mix	1,5 unidades Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, MgCl ₂ 1,5 mM, 0,001% de gelatina, 0,2 mM dNTP, estabilizadores	-	25 µL
Oligonucleotídeo iniciador senso	10 µM	0,4 µM	2 µL
Oligonucleotídeo iniciador antissenso	10 µM	0,4 µM	2 µL
Amostra de DNA	10 pg - 1µg	-	2 µL
Água ultrapura (nuclease-free)	-	-	19 µL

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F e 1492R, sendo eles 5'-3' e 3'-5', respectivamente, para o sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S. Eles amplificam uma sequência com cerca de 1500 pares de bases (Tabela 6). Tratam-se de iniciadores padrões para genes altamente conservados em bactérias. E, para amplificar o gene correspondente ao RNA ribossomal 18S, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 5'-3' 18SF e 3'-5' 18SR, com amplicon de aproximadamente 1800 pb.

Tabela 6: Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizado na reação de PCR para amplificar as sequencias que codificam os genes de 16S rRNA em bactérias e 18S rRNA em fungos.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Fonte
27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	(HUGHES et al., 2017)
1492R	5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'	(HUGHES et al., 2017)
18SF	5' CCTGGTTGATCCTGCCAG 3'	(BANOS et al., 2018)
18SR	5' TTGATCCTTCTGCAGGTTCA 3'	(BANOS et al., 2018)

Os oligonucleotídeos liofilizados foram obtidos a 50 nmol, marca Invitrogen da empresa Thermo Fisher Scientific. Então, foi realizada a reconstituição dos mesmos numa solução estoque de 50 µM, pela adição em cada tubo de 1000 µL de água DNase free (água ultra pura tipo 1 com resistividade elétrica mínima de 18,0 MΩ·cm⁻¹ autoclavada a 121°C por 30 min).

Optou-se em preparar a solução estoque e fracionar a solução de trabalho, pois isso reduz os ciclos de congelamento e descongelamento e, em caso de contaminação, ainda é possível recorrer à solução estoque. Ademais, utilizar os iniciadores em concentrações muito elevadas pode comprometer o resultado da PCR. A solução de trabalho foi preparada efetuando uma diluição a 10 µM e fracionado 1 mL em tubos criogênicos estéreis. A solução estoque e as soluções de trabalho foram armazenadas a -20°C.

Enfim, foi conduzida a reação de PCR em termociclador modelo Veriti da Applied Biosystems. O equipamento foi programado conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Programação da reação de PCR utilizada em termociclador.

Ciclos	30
Desnaturação inicial	95,0°C 3 min
Desnaturação	95,0°C 45 s
Anelamento	50°C 1 min
Extensão	72°C 2 min
Final da extensão	72°C 7 min
Resfriamento	4°C

Fonte: Baseado em OLIVEIRA et al. (2007).

4.5.3 Eletroforese em gel de agarose

O produto de PCR foi verificado por meio de eletroforese. Após a reação de PCR, 15 µL dos produtos obtidos (*amplicons*) foram analisados em gel de agarose 1,0%. O gel de agarose foi preparado a partir de tabletes de agarose da marca FastBio já contendo o tampão TAE 1%. Seu preparo foi realizado dissolvendo um tablete de agarose em 65 mL de água deionizada por aquecimento em micro-ondas. As amostras foram preparadas adicionando 3 µL do corante de corrida Gel Loading Dye, Blue (concentrado 6X), corante à base de azul de bromofenol. Foram adicionados 18 µL das amostras preparadas e 18 µL do padrão de peso molecular aos poços do gel (WARMT et al., 2021).

A corrida ocorreu numa corrente de 75 V por aproximadamente 4 horas. E, a visualização foi feita em transluminador sob luz UV. O tamanho dos fragmentos amplificados é analisado por comparação com padrão de massa molecular (Figura 13). O padrão de peso molecular de 1 kb (1000bp) da marca Kasvi utilizado apresenta 13 fragmentos numa faixa de 250 bp a 10000 bp, sendo 1000 bp e 3000 bp suas bandas de maior intensidade. E então, devem surgir bandas de aproximadamente 1500 bp para as bactérias e 1800 bp de acordo com o padrão de peso molecular (APÊNDICE A).

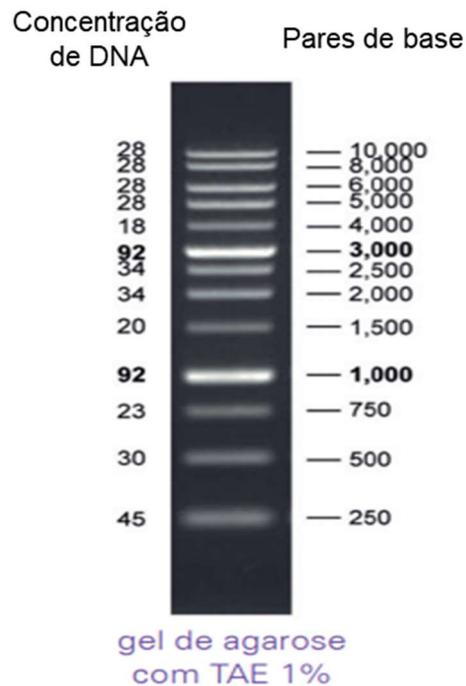


Figura 13: Padrão de peso molecular de 1 kb (1000bp) da marca Kasvi.
Fonte: KASVI (2021).

4.5.4 Purificação do material genético

A purificação do produto de PCR foi feita utilizando o kit de purificação NucleoSpin® Gel e PCR Clean-up da Macherey-Nagel. O protocolo utilizado foi o mesmo disponibilizado pelo fornecedor.

A separação e concentração do material genético ocorreu pela adsorção do DNA à membrana NucleoSpin® na presença de sal caotrópico. Para isso, foi necessário ajustar as condições de ligação do DNA adicionando à amostra o tampão NTI que mantem o pH dentro faixa ótima de adsorção, entre 5,0 e 6,0. Então, foi realizada a lavagem da membrana com o tampão etanólico NT3 visando eliminar contaminates. Em condições de baixo teor de sal, foi conduzida a eluição por meio do tampão NE (5 mM Tris-HCL, pH 8,5). Todos os reagentes são disponibilizados no kit e suas composições não são totalmente indicadas pelo fabricante.

4.5.5 Sequenciamento do material genético

Para a identificação dos microrganismos isolados pelo método genômico, o produto de PCR purificado foi submetido ao sequenciamento de DNA (Sanger) no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing. E, as sequências foram obtidas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1. A análise do sequenciamento foi feita utilizando o software BLAST atrelado ao banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.6 Cinética de crescimento

Os perfis de crescimento dos microrganismos isolados e do microrganismo de referência, a levedura comercial Ethanol Red™, foram foco desse estudo. Os ensaios foram realizados em microplaca Elisa de 96 poços (PERIS et al., 2020). Os inóculos foram aliqüotados a partir de fermentação submersa. Foram adicionados em cada poço da microplaca 180 µL de meio YPD concentrado, o volume de inóculo que resultaria numa absorbância de 600 nm de 0,2 (de 7,5 a 12,5 µL de inóculo) e o volume final foi obtido adicionando água deionizada estéril até atingir 200 µL. Durante aproximadamente 20 horas, o crescimento foi monitorado utilizando leitor de microplacas multimodal de absorbância modelo Infinite® 200 PRO da marca Tecan. O cultivo foi realizado a 30°C e a absorbância a 600 nm foi aferida em intervalos de 20 minutos.

4.7 Determinação da concentração mínima inibitória

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de etanol ao crescimento celular foi realizada utilizando o leitor de microplacas de 96 poços (ANDREWS, 2001). O volume total em cada poço foi de 200 µL. A fermentação submersa foi analisada em meio de cultivo YPD contendo concentrações variadas de etanol: 0% p/v, 2% p/v, 4% p/v, 6% p/v, 8% p/v, 10% p/v, e 12% p/v. A solução estoque de etanol foi esterilizada por filtração com pressão positiva em filtro estéril de 0,22 µm

de poro. O inóculo foi cultivado em meio YPD a 30,5°C e 180 rpm. E então, obteve-se a cinética de crescimento dos microrganismos por meio da espectrofotometria a 600 nm em intervalos de 20 minutos por 20 horas a 30,5°C e subsequente correlação entre a absorbância aferida e a concentração celular.

4.8 Descontaminação por feixe de elétrons

As amostras de matérias-primas foram submetidas ao tratamento de irradiação no Centro Tecnológico de Radiação (CTR) do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN). O procedimento foi realizado por meio do acelerador industrial de elétrons Dynamitron – Job 188 (modelo DC 1500/25/4, da companhia Radiation Dynamics Incorporation® - RDI).

As amostras de hidrolisado de milho e xarope de cana foram previamente diluídas para atingirem a concentração de ART estimada em 150 g·L⁻¹. Para realizar o tratamento, as amostras foram dispostas em recipientes refratários em vidro borosilicanato (Figura 14). A altura máxima de líquido no refratário é de 4 mm, sendo o volume máximo de amostra por recipiente de 300 mL. Portanto, o tratamento por feixe de elétrons foi realizado em batelada. Para atingir a carga de radiação final cumulativa de 20 kGy cada batelada foi submetida ao processo de radiação 4x, cada seção correspondendo à radiação de 5 kGy.

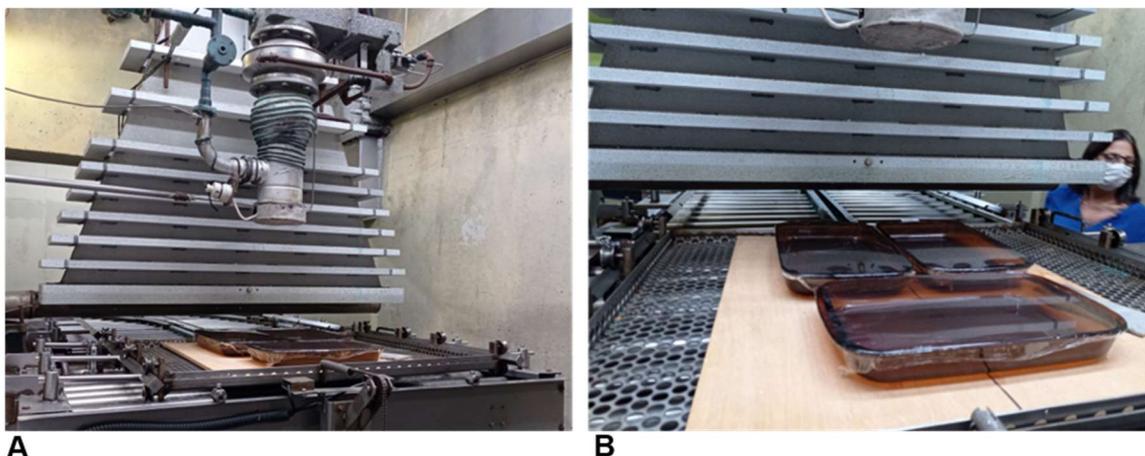


Figura 14: (a) Acelerador industrial de elétrons Dynamitron – Job 188 do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN); (b) Amostras em recipientes refratários de vidro borosilicanato para procedimento em batelada.

4.9 Fermentação variando a proporção de mosto misto, descontaminado ou sem tratamento de descontaminação

O hidrolisado de milho e o xarope de cana, com a concentração de ART ajustada de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com e sem esterilização por feixe de elétrons foram utilizados para preparar o mosto misto. Foram utilizados mostos mistos variando a proporção entre hidrolisado de milho e xarope de cana em 90:10% v·v⁻¹, 80:20% v·v⁻¹ e 70:30% v·v⁻¹. Uma amostra de cada mosto misto não irradiado também foi submetido à esterilização por vapor úmido a 121°C por 15 minutos.

A fermentação foi realizada em tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de mosto misto. Então, foram realizadas nove condições de fermentação, com três proporções de mosto misto, cada uma submetida à três tratamentos (radiação por feixe de elétrons à 20 kGy, vapor úmido a 121° por 15 minutos ou nenhum tratamento). O inóculo foi preparado em meio YPD também em tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio incubado a 30,5°C e 180 rpm por aproximadamente 24 horas. Foi retirado um volume suficiente para iniciar a fermentação com uma absorbância de 0,2. As fermentações foram realizadas em triplicata. O processo fermentativo foi interrompido e as amostras de vinho foram coletadas quando a variação do peso foi inferior a 0,02 g·h⁻¹. As fermentações foram realizadas em triplicata.

4.10 Curva de massa úmida da *Saccharomyces cerevisiae*

A correlação entre a absorbância a 600 nm e a massa úmida de células em fermentação submersa é um método indireto utilizado para estimar a concentração percentual de inóculo em massa úmida (SINHA et al., 2021; ZHA et al., 2012). Nesse caso, foi realizada a curva de massa úmida da levedura comercial Ethanol red™ em meio YPD 20 g·L⁻¹ de glicose. A fermentação foi realizada em tubos Falcon com capacidade para 50 mL contendo 10 mL de meio. Iniciou-se o cultivo com um inóculo correspondente à absorbância de 0,2 a 600 nm. E, a fermentação foi conduzida a 180 rpm e 30,5°C. Realizado o inóculo, foram coletadas amostras ao completar os seguintes períodos de fermentação: 1 h, 2 h, 3,5 h, 5 h, 6,5 h, 24 h, 28 h e 48 h.

A absorvância da amostra coletada foi medida em espectrofotômetro UV/VIS a 600 nm. Como branco foi utilizado o meio de cultivo sob a mesma diluição da amostra. Para obter a relação percentual da massa úmida de células, 2 mL do meio foi transferido para microtubo Eppendorf previamente pesado. O microtubo contendo o meio também foi pesado. Então, foi realizada a centrifugação do microtubo a 10000xg por 15 min. Uma vez descartado o sobrenadante, foi realizada novamente a pesagem do microtubo contendo o pellet. A determinação da massa úmida foi realizada por meio da Equação 3.

$$\text{Massa úmida (\%)} = \frac{(\text{Peso do microtubo contendo o pellet}) - (\text{Peso do microtubo vazio})}{(\text{Peso do microtubo contendo toda amostra}) - (\text{Peso do microtubo vazio})} \quad (3)$$

4.11 Fermentação de mosto misto variando a concentração de inóculo

Por meio do primeiro ensaio de fermentação em tubo cônico, foi selecionada a condição de fermentação em relação à proporção de mosto misto e ao tratamento de descontaminação microbiana. A condição de fermentação foi selecionada de acordo com os parâmetros analisados neste estudo (rendimento de etanol, açúcar residual, glicerol formado e ácidos orgânicos). A fermentação de mosto misto constituído por 80% v·v⁻¹ de hidrolisado de milho e 20% v·v⁻¹ de melaço de cana foi estudada variando a concentração de inóculo em 2,5% m·v⁻¹, 5,0% m·v⁻¹ e 7,5% m·v⁻¹.

4.12 Aumento de escala em biorreator de bancada

Subsequente à fermentação em tubo cônico, foi realizado o aumento de escala da fermentação em biorreator de bancada em batelada (Figura 15). O biorreator possui capacidade para 1,5 L. Ademais, ele possui sensor de temperatura, sensor de pH e sensor de nível de espuma. O controle de temperatura foi feito com refrigeração por serpentina e banho termostático e aquecimento com manta de silicone, e a agitação por impelidores acoplados ao motor.

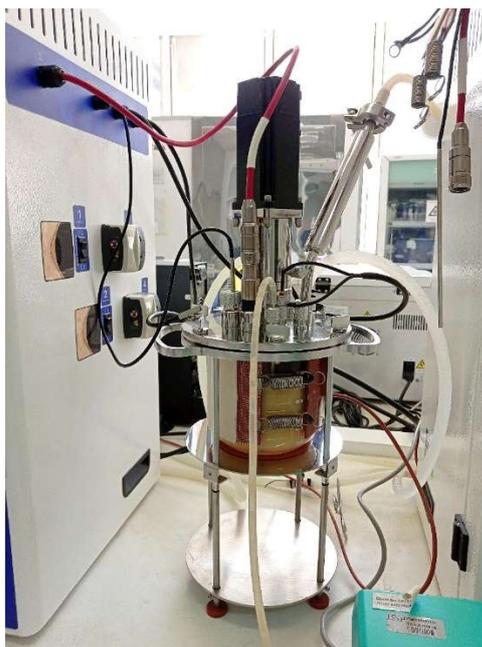


Figura 15: Biorreator de bancada em funcionamento.

As condições de fermentação empregadas nos ensaios em biorreator foram selecionadas a partir dos ensaios em tubo cônico que apresentaram os melhores parâmetros de fermentação, tais como, maior rendimento de etanol, menor açúcar residual, ausência ou menor formação de ácidos orgânicos e menor concentração de glicerol obtido. Os ensaios foram realizados com mosto misto contendo 80% $v \cdot v^{-1}$ de hidrolisado de milho e o restante, 20% $v \cdot v^{-1}$, de melaço de cana. Foram utilizados 900 mL de mosto misto. O controle de temperatura foi ativado para manter a temperatura em 30,5°C. E, a agitação foi realizada a 180 rpm. Não foi realizado nenhum tratamento de descontaminação no mosto misto. Foram testadas concentrações de inóculo em massa úmida de 5,0% m/v e 7,5% m/v. Durante todo o processo o pH foi medido. E, as amostras foram coletadas em aproximadamente 0, 15, 24, 42, 48 e 72 horas de fermentação. Essas amostras foram analisadas em IC e HPLC e também foi realizada a determinação da concentração bacteriana (conforme descrito no item 4.12).

4.13 Controle da fermentação por pesagem

Durante a fermentação de etanol, dióxido de carbono é gerado e liberado. A fermentação submersa foi realizada em tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio de fermentação. Assim, o peso do tubo variou conforme ocorria a reação. O controle da fermentação foi realizado acompanhando a variação do peso por meio de

uma balança analítica nos períodos de cerca de 1, 2, 5, 7, 23, 28, 29, 30, 46, 49, 51 e 52 horas desde o inóculo. Quando essa variação foi menor do que $0,02 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$, o processo foi interrompido.

4.14 Contaminação bacteriana

A concentração da contaminação total e da contaminação bacteriana foram determinadas antes e após o processo fermentativo, tanto para as amostras de mosto logo antes de adicionar o fermento quanto para o vinho assim que foi interrompido a fermentação. Foram efetuadas diluições seriadas das amostras e microgotas de $10 \mu\text{L}$ de cada diluição foram injetadas em triplicata em placas de Petri contendo meio de cultivo. O meio YPD agar foi utilizado para a determinação da contaminação total. E, o meio YPD agar contendo $0,1\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ do antifúngico cicloheximida foi utilizado para determinar a concentração da contaminação bacteriana. As placas de Petri foram incubadas a $30,5^\circ\text{C}$ por aproximada 48h. A placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias foram selecionadas para contagem (HAHNE et al., 2019; ZHU et al., 2018). E então, as colônias que cresceram isoladas ou unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e a concentração microbiana ($\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi obtida por meio da Equação 4.

$$\frac{UFC}{\text{mL}} = \frac{UFC}{\text{volume inoculado} \cdot \text{fator de diluição}} \quad (4)$$

4.15 Determinação da viabilidade celular da levedura

Nos ensaios em biorreator, a viabilidade da levedura foi determinada por microscopia óptica, em objetiva de 40x, utilizando câmara de Neubauer. A coloração diferencial das células com azul de metileno possibilitou diferenciar células viáveis (não coradas) de células não viáveis (coradas). A parede celular de células mortas ou não viáveis é degradado, por isso o corante azul de metileno pode permear e corar a célula. A viabilidade celular em porcentagem foi calculada pela razão entre o total de células vivas e o total de células (viáveis e não viáveis) (BAYROCK; INGLEDEW, 2001; SALVINO DA SILVA et al., 2019).

4.16 Quantificação de carboidratos

A análise instrumental por cromatografia de íons possibilitou estimar as concentrações dos carboidratos: sacarose, glicose, maltose e frutose. As amostras de mosto foram diluídas 10x e 250x, empregando água ultrapura, enquanto que as amostras de vinho foram diluídas 50x, para obter um volume total de 5 mL para análise. As diluições das amostras foram necessárias para que as concentrações dos analitos estivessem dentro dos limites de detecção do dispositivo detector. E então, as amostras diluídas foram filtradas por pressão positiva utilizando filtros de seringa de porosidade 0,22 µm (Millipore).

As análises foram realizadas utilizando o cromatógrafo de íons modelo Professional IC 850 Metrohm AG equipado com detecção amperométrica pulsada (PAD), acoplado à Coluna Metrosep Carb 2 – 250/4,0. A fase móvel ou eluente foi uma solução de hidróxido de sódio 200 mM e acetato de sódio 20 mM preparada com água ultrapura (com resistividade de 18,2 MΩcm), desgaseificada com ultrassom. O fluxo aplicado foi 0,5 mL·min⁻¹ por 30 minutos à 35,0°C. O volume de injeção da amostra foi de 5 µL. A obtenção e processamento de dados foi feita por meio do software MagIC Net 3.3 (Metrohm AG) (STEINBACH; WILLE; SUBRAMANIAN, 2008).

4.17 Determinação da concentração de etanol e ácidos orgânicos

As concentrações de etanol, acetato e lactato foram aferidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) com detector de índice de refração (RID – *Refractive Index Detector*). A quantificação dos metabólitos foi realizada conforme metodologia descrita por COLA et al. (2020). Inicialmente, as amostras foram diluídas 1:10 e filtradas por pressão positiva utilizando filtros de porosidade 0,22 µm (Millipore), sendo 1 mL de cada filtrado transferido para frasco vial para análise em HPLC. Glicose, lactato, acetato, glicerol e etanol foram separados numa coluna de exclusão iônica (modelo Aminex HPX-87H, marca Bio-rad, Hercules, CA, USA) utilizando H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, numa vazão de 0,6 mL·min⁻¹, 60°C e volume de injeção de 10 µL.

4.18 Cálculos dos parâmetros de fermentação

Os parâmetros cinéticos da fermentação foram calculados de acordo com Schmidel (2021). Foram abordados a velocidade específica de crescimento microbiano (μ), o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{EtOH/S}$) para obter o rendimento etanólico e a produtividade (Tabela 8).

Tabela 8: Parâmetros cinéticos da fermentação.

Velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) (h^{-1})	$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$	(5)
Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{EtOH/S}$) ($\text{g}_{\text{Etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$)	$Y_{EtOH/S} = \frac{dP}{-dS}$	(6.1)
	$Y_{EtOH/S} \left(\frac{\text{g}_{\text{Etanol}}}{\text{g}_{\text{ART}}} \right) = \frac{[EtOH]_{\text{Final}} - [EtOH]_{\text{Inicial}}}{[ART]_{\text{Inicial}} - [ART]_{\text{Final}}}$	(6.2)
Rendimento etanólico (R) (%)	$E = Y_{EtOH/S} \cdot \frac{100}{0,511}$	(7)
Produtividade em produto (QP) ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Q_P = \frac{dP}{dt}$	(8)

Fonte: SCHMIDELL (2021).

Na fase de crescimento exponencial a velocidade específica de crescimento é constante e máxima. Então, reescrevendo e integrando a Equação 5, obtém-se as Equações 9 e 10 (SCHMIDELL, 2021).

$$\frac{1}{X} dX = \mu dt \quad (9)$$

$$\ln X = \mu \cdot t + \ln X_0 \quad (10)$$

4.19 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. Para verificar diferenças estatisticamente significativas (p valor $< 0,05$) nas taxas específicas máximas de crescimento dos microrganismos e nos parâmetros fermentativos, foi realizada análise de variância por ANOVA de fator único e Tukey por meio do Software OriginPro (OriginLab, USA) (BLOMQVIST et al., 2018; DEVI; ARCHER; HALAMI, 2015; MINICH et al., 2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização microbiana

5.1.1 Isolamento dos microrganismos

Por meio da Figura 16 à Figura 18 é possível observar os plaqueamentos realizados a partir de cada uma das amostras de matéria-prima em cada um dos meios de cultura (YPD, MRS e meio baseado no próprio substrato). No caso do isolamento realizado a partir da amostra de xarope de cana não foi necessário realizar a diluição da amostra. Entretanto, a carga microbiana elevada da amostra de caldo de cana requereu fatores de diluição mais elevados. Então, nesse caso, algumas amostras microbianas foram coletadas a partir de plaqueamentos mais concentrados e foram inoculadas por sementeira de esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Isso foi realizado a fim de obter um isolamento mais representativo, uma vez que amostras muito diluídas podem omitir microrganismos presentes em concentrações muito baixas na amostra original e subestimar a diversidade microbiana. Mesmo assim, as colônias isoladas da amostra de caldo apresentaram pouca variedade morfológica.

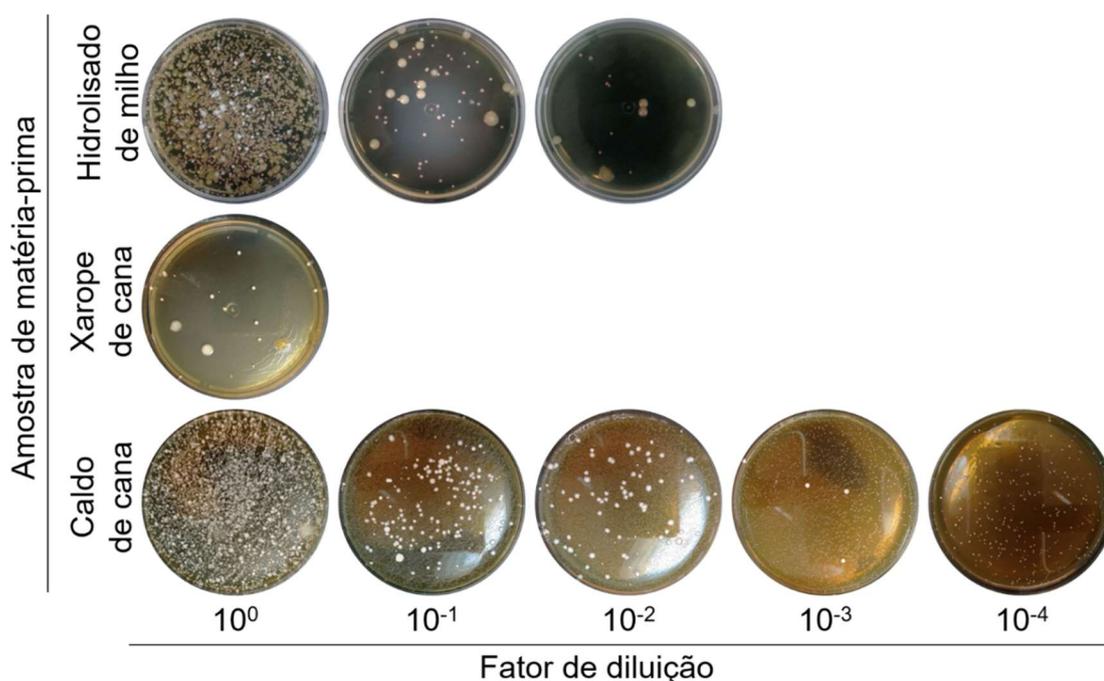


Figura 16: Isolamento microbiano das três amostras de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em meio YPD ágar.

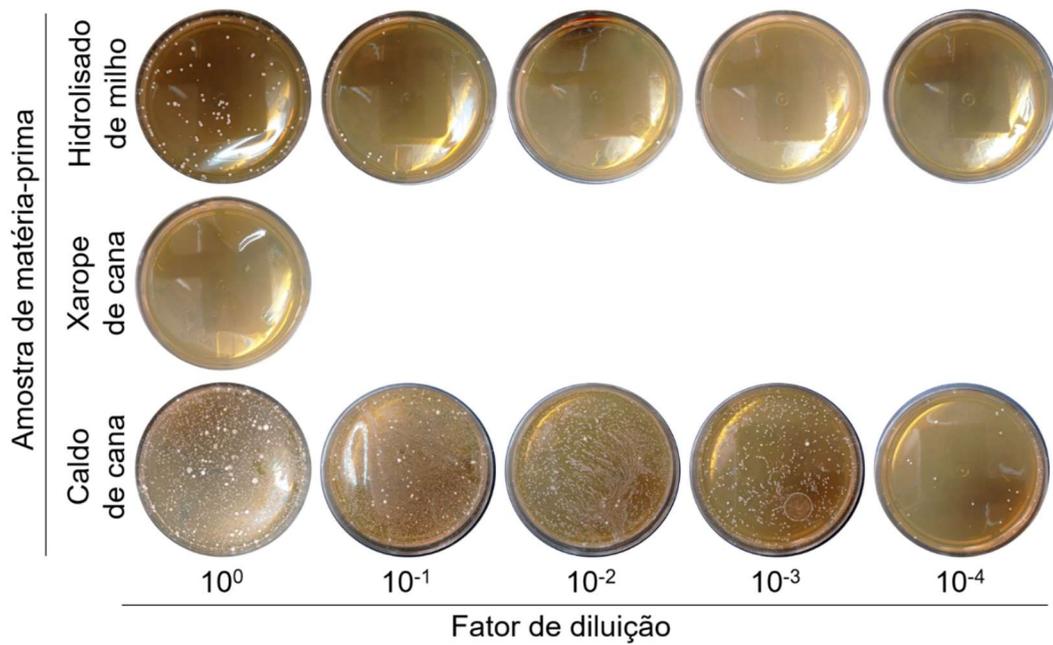


Figura 17: Isolamento microbiano a partir das três amostras de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em meio MRS ágar.

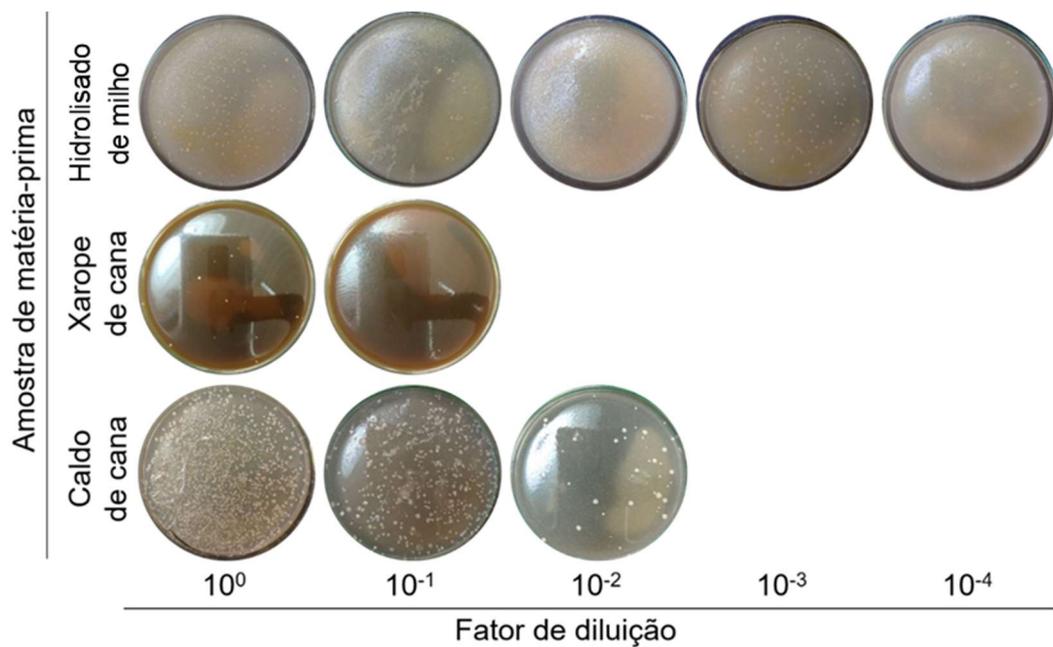


Figura 18: Isolamento microbiano a partir das três amostras de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em meio sólido à base do respectivo substrato.

A amostra com maior concentração microbiana nas culturas realizadas nos meios YPD e MRS foi a amostra de caldo de cana (Figura 19). O xarope de cana é preparado pela evaporação e concentração do caldo da cana, resultando em elevada pressão osmótica. Esse preparo gera condições inóspitas para a contaminação microbiana. Por isso, a amostra de xarope apresentou menor carga microbiana, em todos os casos de isolamento. A contagem de UFCs nas amostras de hidrolisado de milho foi maior quando o cultivo ocorreu no meio à base do próprio substrato. Isso sinaliza que o hidrolisado de milho supre melhor a demanda nutricional da carga microbiana do que os meios sintéticos YPD e MRS.

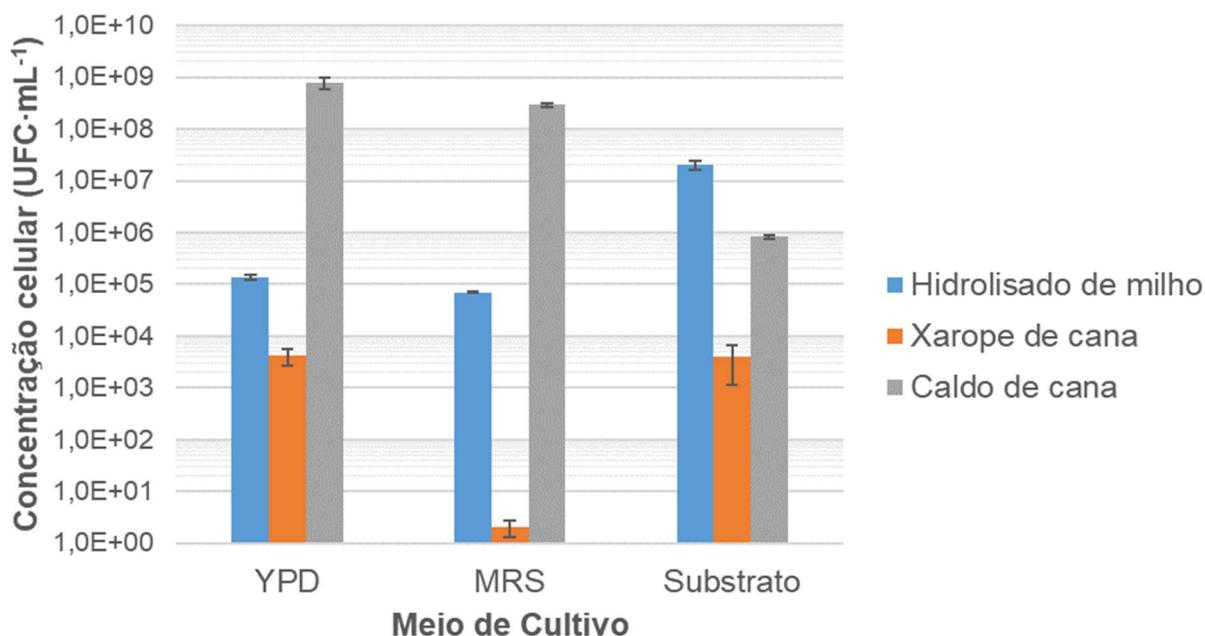


Figura 19: Concentrações microbianas, em UFC·mL⁻¹, de cada amostra de matéria-prima (hidrolisado de milho, xarope de cana e caldo de cana) em três tipos de meio de cultivo sólido (YPD, MRS, meio à base da respectiva matéria-prima).

Da amostra de hidrolisado de milho, foram isolados 9 microrganismos em meio YPD, 6 em meio MRS e 4 em meio à base de hidrolisado de milho. Da amostra de xarope de cana, foram isolados 6 microrganismos em meio YPD, 5 em meio MRS e 4 em meio à base de xarope de cana. E, da amostra de caldo de cana, foram isolados 7 microrganismos em meio YPD, 8 em meio MRS e 4 em meio à base de caldo de cana. Ao todo, foram isolados 53 microrganismos. Os microrganismos isolados foram

codificados. Uma representação explicativa sobre as informações contidas nos códigos pode ser observada na Figura 20.

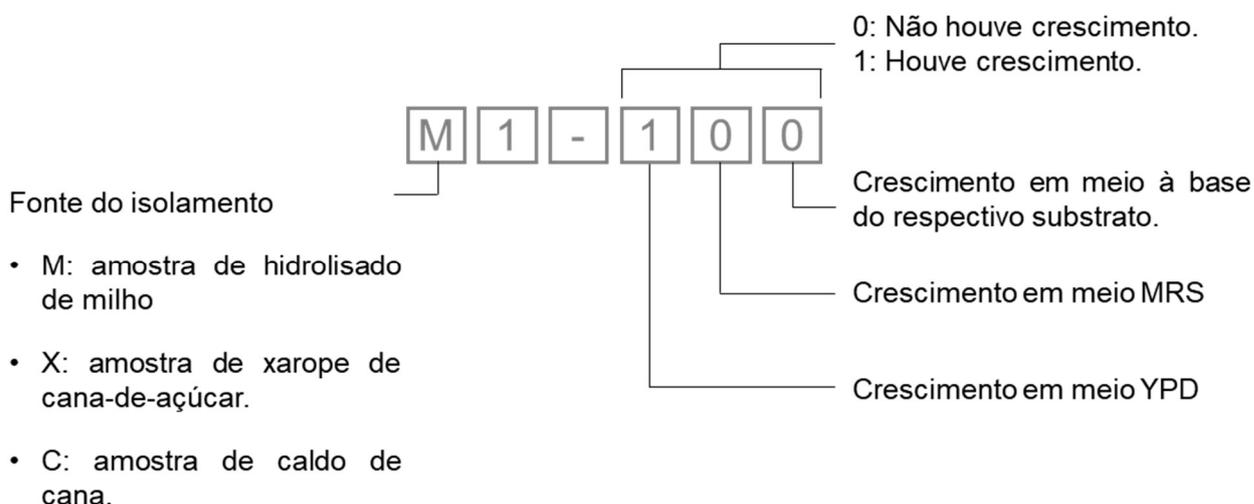


Figura 20: Descrição das informações contidas nos códigos de identificação de cada microrganismo isolado.

O primeiro dígito do código indica a partir de qual amostra de matéria-prima o microrganismo foi isolado. Os três últimos dígitos indicam em qual tipo de meio de cultivo esse microrganismo foi encontrado, na seguinte ordem: meio YPD, meio MRS e meio à base do respectivo substrato. O dígito um indica que houve crescimento e zero indica que o microrganismo não foi encontrado naquele meio de cultivo. E, o segundo dígito apenas representa um controle por contagem dos microrganismos encontrados à medida em que foram sendo isolados.

5.1.2 Identificação dos microrganismos isolados

Os microrganismos isolados foram identificados por MALDI-TOF. E então, procedeu-se a identificação microbiana por sequenciamento do gene que codifica 16S rRNA em bactérias e 18S rRNA em fungos. O sequenciamento foi realizado para confirmar a identificação obtida pelo MALDI-TOF e também para obter as identificações de alguns microrganismos que não puderam ser obtidas pelo primeiro método utilizado. As informações referentes à identificação constam nas Tabela 9 a Tabela 11.

Da amostra de hidrolisado de milho foram isoladas as bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Rahnella aquatilis* e os fungos *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Candida guilliermondii* (Tabela 9). Todas as variedades de microrganismos isoladas no meio à base de hidrolisado de milho já haviam sido isoladas no meio de cultura YPD. E, apenas um novo tipo foi isolado usando o meio MRS.

A identificação do microrganismo M11-010 foi *Candida guilliermondii* por MALDI-TOF e *Meyerozyma guilliermondii* por sequenciamento. Ambas as designações referem-se ao mesmo microrganismo, cuja forma anamorfa é chamada *Candida guilliermondii* (ATZMÜLLER; ULLMANN; ZWIRZITZ, 2020; YAN et al., 2021).

Tabela 9: Identificação dos microrganismos isolados da amostra de hidrolisado de milho por MALDI-TOF e por sequenciamento do gene 16S rRNA (bactérias) e 18S rRNA (fungo).

Amostra	Identificação microbiana	Nível de confiança	
		MALDI-TOF	BLAST
M1-100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,13	97%
M2-111	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,95	97%
M4-110	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2,14	99%
M5-101	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,10	97%
M11-010	<i>Candida guilliermondii</i>	2,13	-
M11-010	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	99%

Dentre os microrganismos isolados da amostra de xarope de cana (Tabela 10), somente a identificação do microrganismo X4-100 diferiu entre os métodos utilizados. Entretanto, a identificação obtida por MALDI-TOF não foi tão acurada, sendo a pontuação de confiança obtida menor do que 2,00. Enquanto, a identificação por sequenciamento apresentou alto nível de confiança (99%) e foi considerada válida.

Tabela 10: Identificação dos microrganismos isolados da amostra de xarope de cana-de-açúcar por MALDI-TOF e por sequenciamento do gene 16S rRNA (bactérias) e 18S rRNA (fungo).

Amostra	Identificação microbiana	Nível de confiança	
		MALDI-TOF	BLAST
X2-100	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2,17	98%
X3-100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,20	97%
X4-100	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	1,93	-
X4-100	<i>Mycolicibacterium phocaicum</i>	-	99%
X5-100	<i>Pantoea séptica</i>	2,00	97%
X7-010	<i>Kodamaea ohmeri</i>	2,13	100%
X8-010	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	97%
X12-001	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	98%
X13-001	<i>Bacillus megaterium</i>	2,03	97%
X15-101	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,83	99%

Na maior parte dos casos, uma variedade microbiana foi encontrada exclusivamente em um tipo de meio de cultivo. Por exemplo, no caso dos microrganismos isolados da amostra de xarope de cana, exceto *Schizosaccharomyces pombe* (X15-101) (Tabela 10), a maior parte cresceu apenas em um tipo de meio (YPD, MRS ou meio à base de xarope de cana).

Em geral, um meio de cultivo deve conter água, uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais. É possível mediar o crescimento de alguns tipos de microrganismos suprindo ou suprimindo as exigências nutricionais microbianas (BONNET et al., 2019; MADIGAN et al., 2010b; SANDLE, 2011). O meio não seletivo YPD é completo para cultivo de leveduras. Ele contém extrato de leveduras, disponibilizando amino ácidos necessários para leveduras (BERGMAN, 2001).

Não existe um meio de cultivo “universal”. Os meios não-seletivos possibilitam o crescimento indiscriminado de microrganismos. E, alguns meios são seletivos,

contendo inibidores da flora microbiana indesejada (BONNET et al., 2019; MADIGAN et al., 2010b). O meio MRS foi desenvolvido objetivando favorecer o crescimento de lactobacilos. Ademais, ele contém acetato de sódio que inibe o crescimento de muitas outras bactérias (SCHILLINGER; HOLZAPFEL, 2003). As variedades de meios de cultivo possibilitam abranger uma diversidade microbiana, conforme os objetivos e necessidades de sua aplicação (BONNET et al., 2019).

Apesar de apresentar carga microbiana inferior, os microrganismos isolados da amostra de xarope (Tabela 10) apresentaram maior diversidade microbiana em relação aos microrganismos isolados das demais amostras. Foram obtidas maior diversidade de espécies em relação aos microrganismos isolados da amostra de milho (Tabela 9) e maior diversidade de gêneros em relação ao isolamento da amostra de caldo (Tabela 11).

Tabela 11: Identificação dos microrganismos isolados da amostra de caldo de cana-de-açúcar por MALDI-TOF e por sequenciamento do gene 16S rRNA (bactérias) e 18S rRNA (fungo).

Amostra	Identificação microbiana	Nível de confiança	
		MALDI-TOF	BLAST
C1-100	<i>Leuconostoc citreum</i>	2,15	97%
C2-100	<i>Pichia bruneiensis</i>	-	99%
C5-100	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2,25	99%
C8-010	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,06	97%
C9-011	<i>Kodamaea ohmeri</i>	2,00	98%
C13-010	<i>Pichia manshurica</i>	-	97%
C16-001	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	1,71	97%
C17-001	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	2,08	98%
C18-001	<i>Asaia bogorensis</i>	-	98%

Estudos mostram que os atributos competitivos de um microrganismo podem ser determinantes para sua ocupação e proliferação no ambiente em que vivem. Os

microrganismos podem competir por espaço e recursos. E eles podem ter mecanismos para prejudicar o crescimento ou causar morte dos concorrentes. Assim, as competições entre duas populações tendem a eliminar uma, principalmente se estiverem disputando o mesmo conjunto de recursos. Nesse contexto, as habilidades de um microrganismo em enfrentar condições bióticas adversas são relevantes para sua perpetuação, sendo às vezes mais importantes do que sua capacidade de enfrentar condições abióticas estressantes (FEDOREC et al., 2021; HIBBING et al., 2010; WOOD; TANG; FRANKS, 2018).

Dentre as bactérias isoladas da amostra do caldo de cana, as mais comuns foram espécies de *Leuconostoc*, gênero pertencente à família Lactobacillaceae, uma família de bactérias ácido lácticas. Os principais gêneros de bactérias lácticas são: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* (WANG et al., 2021).

Conforme pode ser observado pela Figura 21, os microrganismos foram classificados em bactérias, Gram (+) ou Gram (-), fungos ou leveduras e em anaeróbios facultativos ou aeróbios. Então, tais características foram atribuídas simultaneamente. Todos os fungos isolados são leveduras, logo, são anaeróbios facultativos (SHIMOMURA-SHIMIZU; KARUBE, 2010).

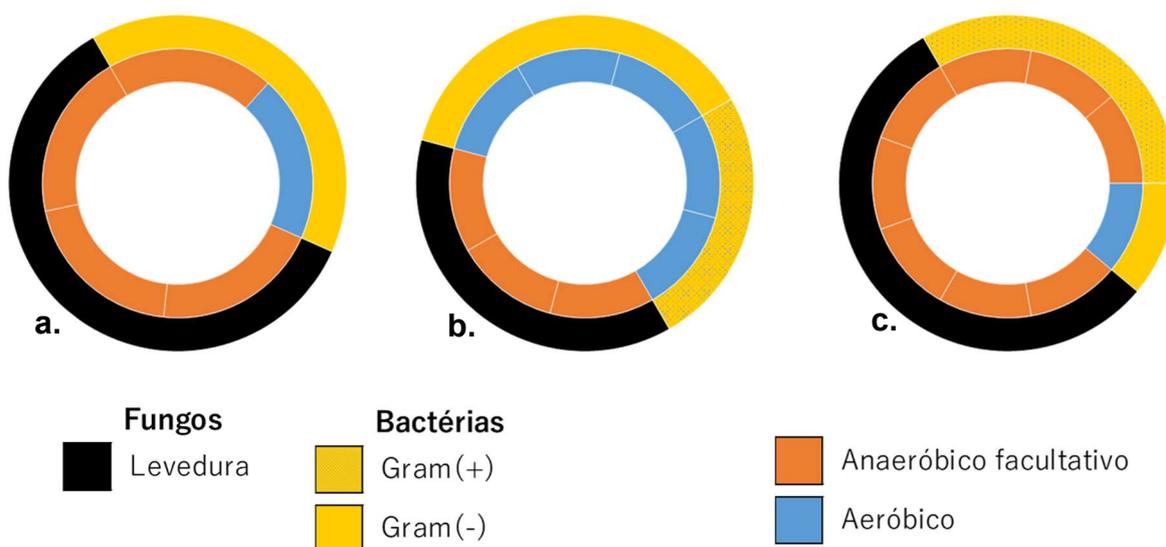


Figura 21: Classificação referente aos domínios e ao metabolismo energético dos microrganismos isolados das amostras de matéria-prima: (a) do hidrolisado de milho; (b) do xarope de cana-de-açúcar; e (c) do caldo da cana-de-açúcar.

Microrganismos do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* são importantes rizobactérias que fixam nitrogênio atmosférico. Espécies desses gêneros são amplamente estudadas para aplicações como inoculantes agrícolas, pois podem aumentar a solubilização de minerais e sua absorção pela planta. Além disso, eles também podem ser usados para controle biológico. Espécies do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos aeróbios restritos. *Pseudomonas fluorescens* é um dos mais eficazes antagonistas selecionados pelo solo para a supressão de doenças (JUYAL et al., 2021; TAO et al., 2020a).

A filogenia microbiana possibilita verificar a interrelação das espécies pela presença de genes comuns entre elas. Ademais, a filogenia suscita características compartilhadas entre algumas espécies. A partir do gênero, uma informação imediata disponível na identificação dos microrganismos, já é possível realizar inferências e discriminações sobre os microrganismos isolados. A filogenia possibilita uma visão geral, estendendo essa abordagem a outros níveis taxonômicos (MADIGAN et al., 2010c).

A árvore filogenética dos microrganismos isolados com base na sequência de nucleotídeos do gene 16S e 18S rRNA foi apresentada na Figura 22. Em relação às bactérias, a comunidade microbiana foi dominada por membros dos filos Firmicutes, principalmente bactérias ácido lácticas, e Proteobacteria. Esses resultados conferem com resultados reportados na literatura sobre a diversidade microbiana no bioprocessamento de etanol (COSTA et al., 2015; FIRMINO et al., 2020; LI; HEIST; MOE, 2016; QUEIROZ et al., 2020).

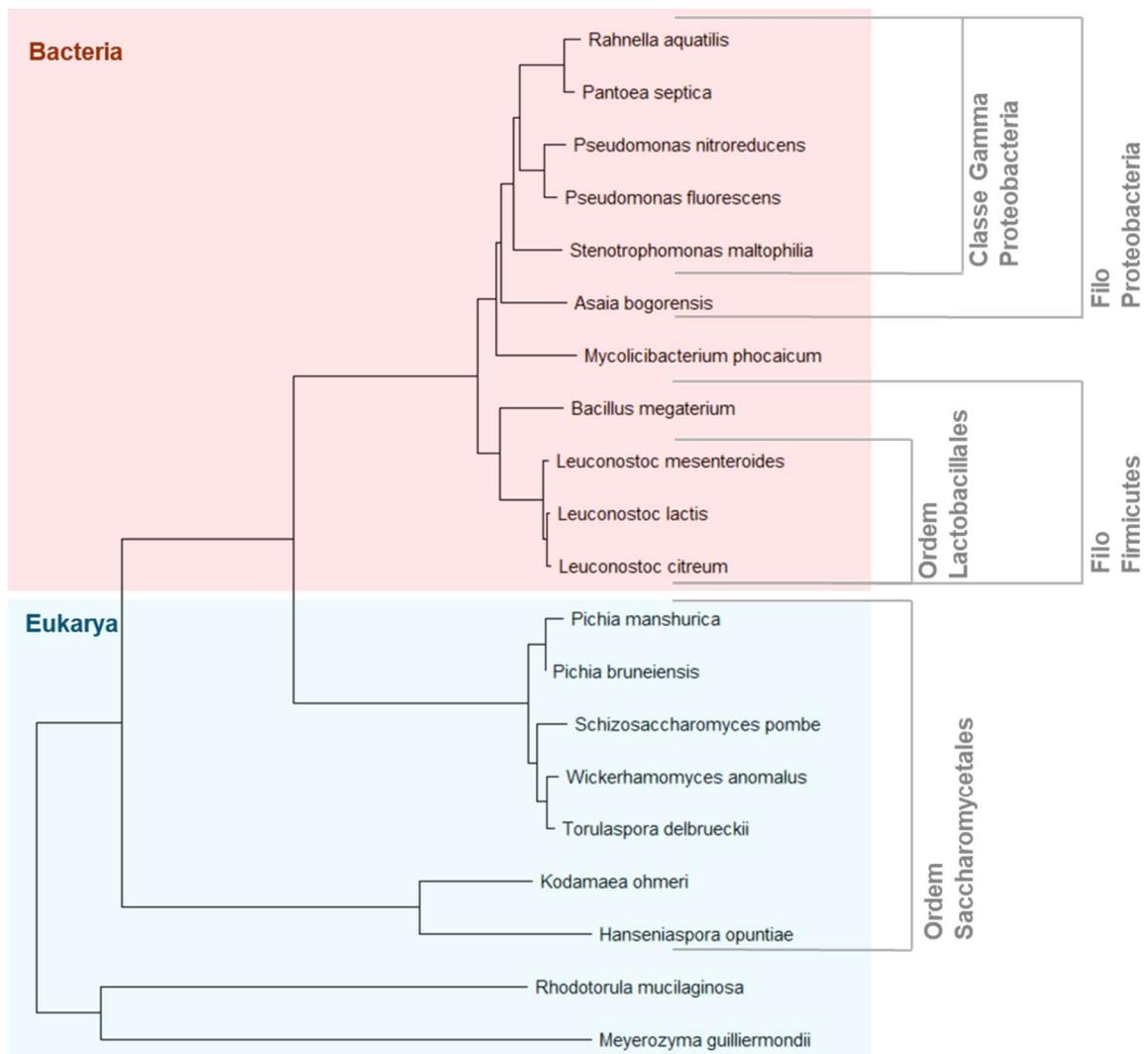


Figura 22: Árvore filogenética (software MEGA 7) com base na sequência de nucleotídeos do gene 16S e 18S rRNA. As sequências foram alinhadas com MUSCLE e analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança. A confiabilidade da árvore foi testada por reamostragem de bootstrap (1000 replicações).

5.1.3 Cinética de crescimento sob estresse etanólico

O estresse etanólico é uma condição inerente ao processo fermentativo e um fator limitante da produtividade. O acúmulo de etanol no meio durante o processo pode reduzir a velocidade específica de crescimento das leveduras, reduzir a fermentação e provocar morte celular. Na indústria alcooleira, a concentração de etanol pode atingir valores tão elevados (superiores a 10% v·v⁻¹) que se tornam tóxicos inclusive para a própria levedura.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é mais tolerante ao estresse etanólico do que muitos microrganismos. A principal razão para isso está associada à capacidade da própria levedura de produzir etanol.

Além disso, *Saccharomyces cerevisiae* é Crabtree-positiva. Em 1926, Herbert G. Crabtree postulou o Efeito Crabtree em leveduras estudando o efeito Warburg em células tumorais. Segundo o Efeito Crabtree, mesmo havendo oxigênio, a levedura obtém ATP preferencialmente por fermentação alcoólica do que por respiração celular. Esse processo é induzido sob concentração de glicose ou frutose excedendo um valor limite, dependendo da cepa. Em outras palavras, o Efeito Crabtree é definido pela repressão do metabolismo respiratório induzida pela glicose, reversível e de curto prazo (DIAZ-RUIZ; RIGOULET; DEVIN, 2011; NATTER; KOHLWEIN, 2013; PFEIFFER; MORLEY, 2014). Isso provavelmente ocorre porque a velocidade de obtenção de ATP pela fermentação é maior do que pela respiração celular e também devido ao efeito deletério do etanol sobre o crescimento de microrganismos concorrentes.

O etanol atua principalmente sobre a membrana celular, alterando sua estrutura e sua função. Sob estresse etanólico, a membrana celular torna-se mais fluida e menos seletiva, possibilitando a transição de íons e até metabólitos de baixo peso molecular. Além disso, o etanol também afeta proteínas e o retículo endoplasmático. A redução da atividade de água pode desnaturar enzimas importantes da via glicolítica (CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015; STANLEY et al., 2010).

Claro e colaboradores (2007) estudaram o efeito deletério do etanol à *S. cerevisiae* em meio YPD. Eles verificaram que quando a concentração de etanol atingiu 10% v·v⁻¹, a morte celular atingiu 10% em 8 horas e 40% em 24 horas.

Em relação à levedura comercial de referência Ethanol red™, os microrganismos isolados apresetaram $\mu_{\text{máx}}$ sob estresse etanólico estatisticamente pelo método ANOVA ($p < 0,05$) e pela comparação par a par feita pelo método Tukey. Essa informação pode ser verificada por meio da análise estatística anexada no APÊNDICE B.

Mediante Os microrganismos isolados já apresentaram velocidade específica máxima de crescimento na condição inicial (sem adição de etanol) inferior em relação à levedura (Figura 23). Os parâmetros cinéticos foram determinados em monocultura. Então, fatores inerentes à sinergia e competição microbiana não influenciaram a cinética de crescimento. Sob estresse etanólico, a maior parte deles apresentou súbita perda na velocidade específica de crescimento. Em geral, a levedura comercial tolerou melhor o estresse etanólico do que os contaminantes. A taxa de crescimento dos microrganismos isolados diminuiu mais rápido e em concentrações inferiores às observadas nos perfis de crescimento da levedura comercial usada como referência. A tolerância ao estresse é uma vantagem para a levedura comercial em relação à contaminação.

A bactéria ácido láctica *Leuconostoc mesenteroides* (C8-010) apresentou velocidade específica de crescimento máxima maior do que a Ethanol red™ sob concentrações de etanol superiores à 10% v·v⁻¹. Dentre os microrganismos isolados, elas foram as mais tolerantes ao estresse etanólico. Ambas foram isoladas da amostra de caldo de cana-de-açúcar em meio MRS. Em geral, bactérias ácido lácticas são organismos tolerantes ao etanol. Os principais contaminantes na indústria alcooleira são BALs, devido à capacidade das mesmas em lidar com altas concentrações de etanol e baixa concentração de pH (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; PITTET; MORROW; ZIOLA, 2011; SKINNER; LEATHERS, 2004).

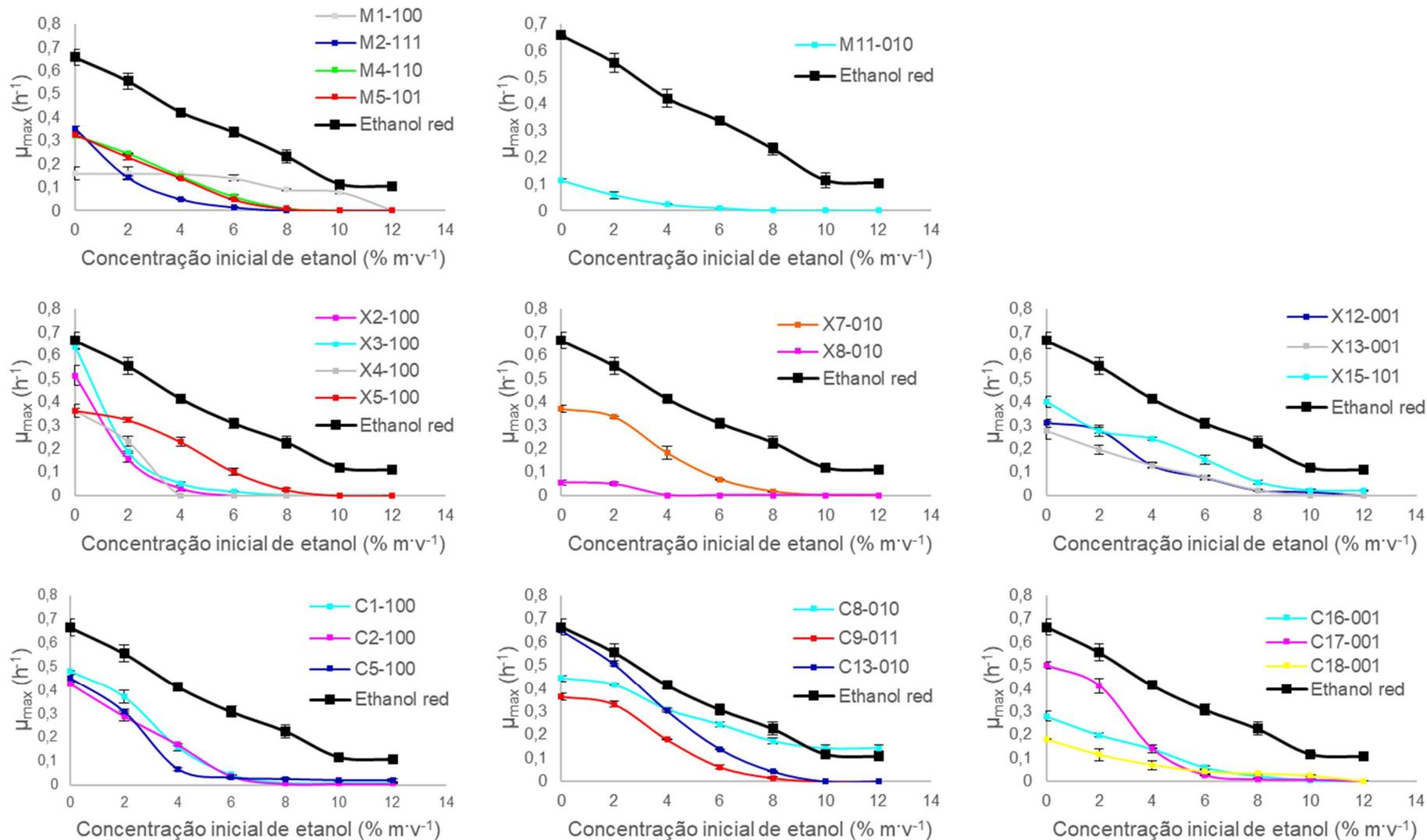


Figura 23: Perfis da variação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) em função da concentração inicial de etanol de todos os microrganismos isolados. Foram ensaiadas cinéticas em meio YPD acrescido de etanol entre 0 e 12% m·v⁻¹.

5.2 Efeito da contaminação no rendimento etanólico

O hidrolisado de milho e o xarope de cana estão entre as matérias-primas mais empregadas na indústria de produção de etanol combustível. O mosto constituído pela mistura dos dois compostos pode apresentar duas vantagens principais: obter um mosto mais suplementado nutricionalmente e fornecer à indústria mais possibilidades economicamente favoráveis. Por exemplo, a indústria pode optar pela cultura da cana para suprir a demanda energética pela queima do bagaço de cana (SICA et al., 2021).

A fermentação foi realizada utilizando a levedura *S. cerevisiae* como inóculo, sendo selecionada a cepa comercial Ethanol red™. Assim, já era esperado encontrar nas amostras dos mostos submetidas à descontaminação após a fermentação apenas a levedura inoculada. Mas, nas amostras de mosto com contaminação inata após a fermentação nenhuma colônia bacteriana cresceu. Isso porque a contaminação bacteriana das amostras de matérias-primas estavam presentes numa concentração inicial baixa ou porque não conseguem resistir ao processo fermentativo. A contaminação microbiana crônica, entretanto, tem sido associada à capacidade de formação de biofilmes, geralmente mais resistentes aos processos de limpeza e antibióticos do que as células suspensas (DELLIAS et al., 2018).

Amostras dos vinhos livres de células por centrifugação foram coletadas para a quantificação de metabólitos, tais como, açúcares redutores totais, etanol e glicerol. Ademais, os analitos citados também foram determinados nas amostras de mosto misto previamente ao inóculo. Os rendimentos etanólicos e os valores de ART obtidos estão indicados na Figura 24.

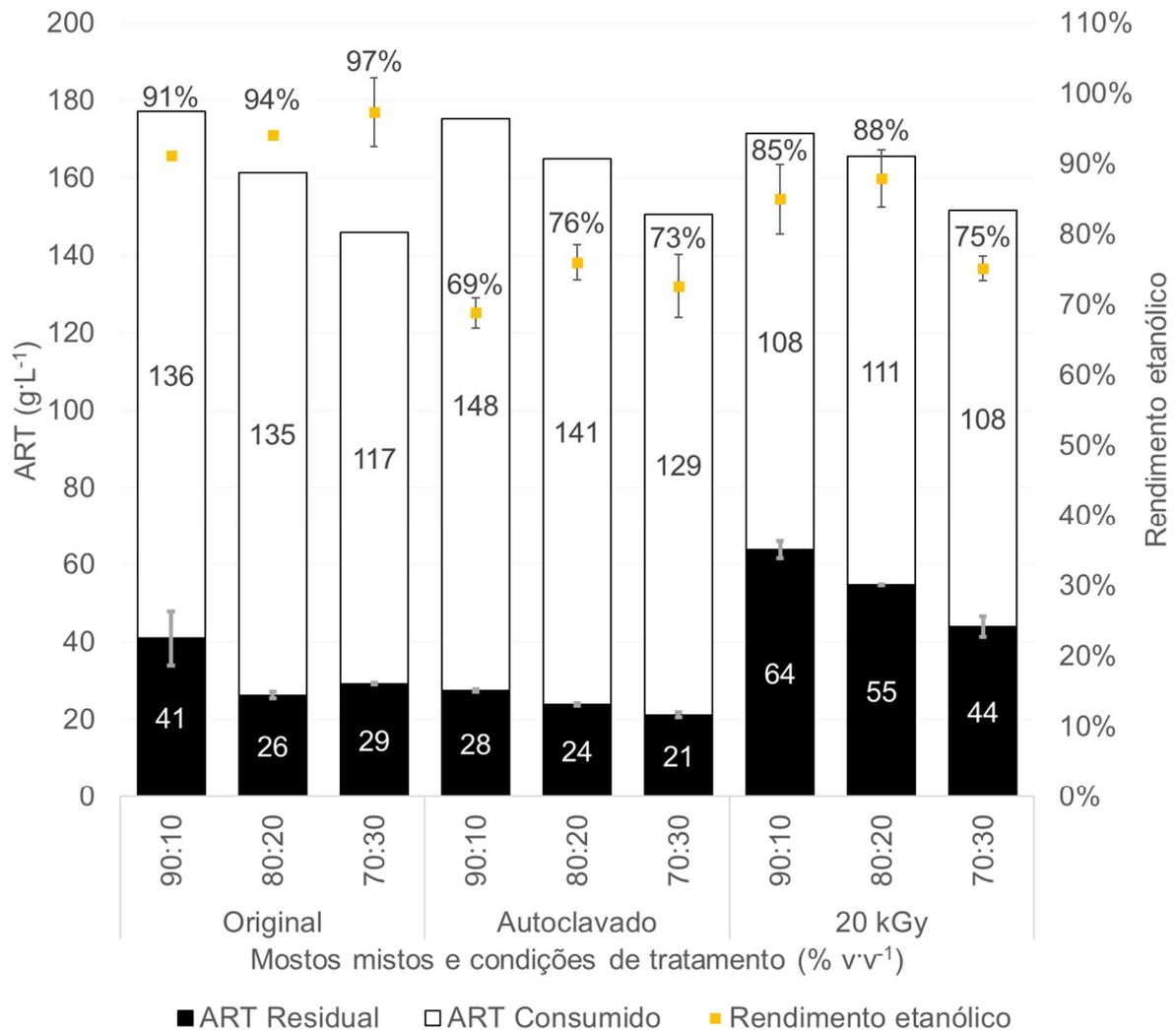


Figura 24: Rendimentos etanólicos, concentrações de ART residual e consumido em cada uma das condições de fermentação ensaiadas: mostos mistos 90:10, 80:20 e 70:30% v·v⁻¹ submetidos à radiação ionizante de 20kgy, vapor úmido a 121°C por 15 minutos e sem tratamento.

Em relação ao efeito do procedimento de tratamento da contaminação no rendimento de etanol, verificou-se que as condições sem nenhum tratamento tiveram rendimentos de etanol superiores aos esterilizados em autoclave e aos submetidos à radiação ionizante de 20 kGy. Os menores rendimentos etanólicos foram encontrados na fermentação do mosto misto autoclavado. O tratamento do mosto em autoclave como método de esterilização relaciona-se com o aumento do efeito inibitório (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). Calegari e colaboradores (2023) estudaram a desinfecção de mosto por feixe de elétrons e verificaram que o tratamento do mosto

não implicou na inversão de açúcares e formação de compostos inibitórios, tais como, flavonóides, furfural e 5-HMF, porém ocorreu formação de compostos fenólicos.

As concentrações de ART residual foram maiores nas fermentações de mosto misto irradiado. A hipótese sugerida para as concentrações residuais de ART obtidas é a baixa concentração de inóculo (absorbância de 0,2 a 600 nm) realizada nos primeiros ensaios em tubo cônico. Os rendimentos de etanol foram maiores nas fermentações originais do mosto misto (sem tratamento de descontaminação microbiana) de 80:20% v·v⁻¹ e 70:30% v·v⁻¹, sendo 94% e 97%, respectivamente. Não foi possível verificar a diferença entre os rendimentos obtidos nestes dois casos, considerando o desvio padrão. O mosto misto ótimo foi constituído por 80% v·v⁻¹ de hidrolisado de milho e 20% v·v⁻¹ de melação de cana sem tratamento de descontaminação, pois apresentou maior rendimento (94%) e menor ART residual (26 g·L⁻¹). Assim, esta condição de mosto misto foi usada para todas as fermentações subsequentes.

As concentrações de glicerol obtidas ao final dos processos fermentativos ensaiados estiveram dentro da faixa de 4,3 e 6,6 g·L⁻¹ (Figura 25), que está de acordo com os dados de concentração de glicerol encontrados na literatura não associados à perda de rendimento por estresse osmótico (PERSSON; GALBE; WALLBERG, 2020). O glicerol é o principal subproduto da fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* e pode indicar estresse osmótico (KUMAR; SINGH; GHOSH, 2022; WALKER; BASSO, 2020; YU; KIM; HAN, 2010). O glicerol é formado para reoxidar o excesso de NADH que surge através da síntese de biomassa (DE VALK et al., 2022). Porém, sob estresse osmótico as células de levedura produzem mais e retêm glicerol no citoplasma buscando controlar o desequilíbrio osmótico. A produção de glicerol contrapõe o rendimento etanólico. A síntese de glicerol pela levedura em geral pode consumir até 4% dos açúcares fermentescíveis (BABAZADEH et al., 2017; HOHMANN, 2002; ZHANG et al., 2013).

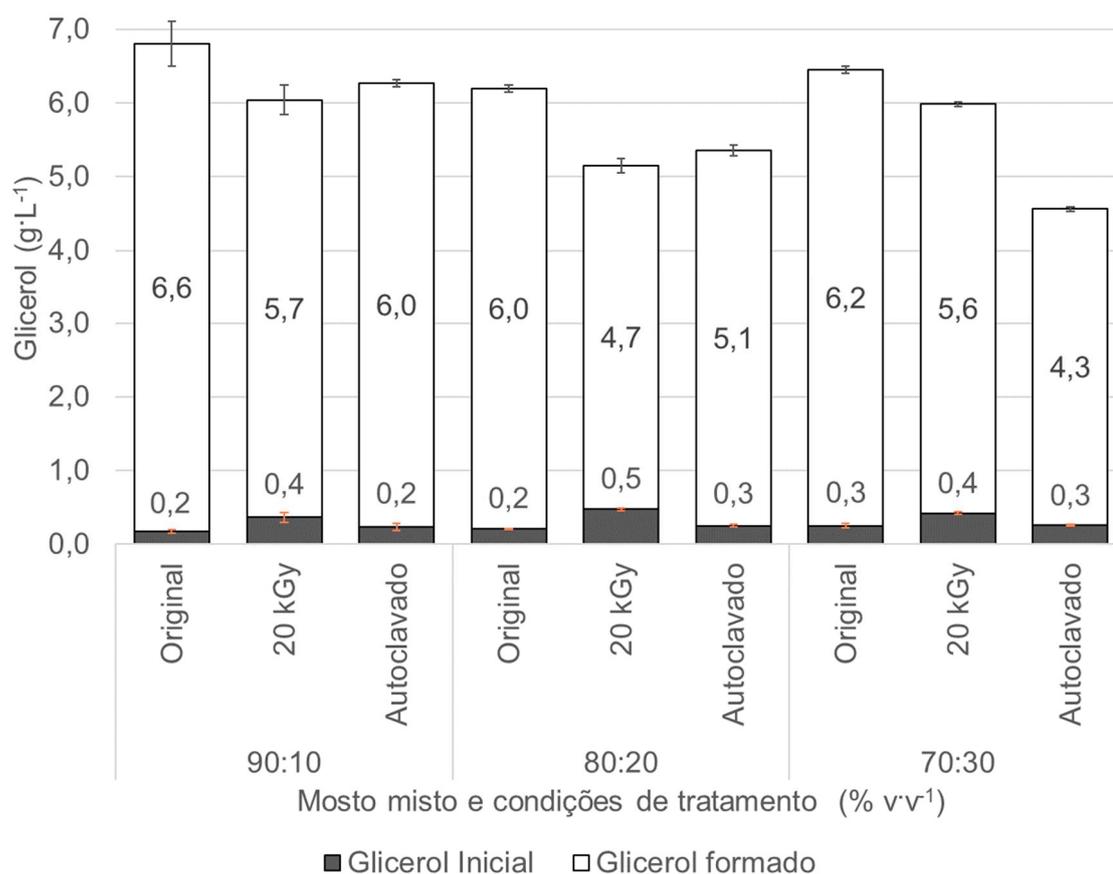


Figura 25: Concentrações de glicerol inicial e formado em cada uma das condições de fermentação ensaiadas: mostos mistos 90:10, 80:20 e 70:30% v·v⁻¹ submetidos à radiação ionizante de 20kGy, vapor úmido a 121°C por 15 minutos e sem tratamento.

5.3 Efeito da concentração de inóculo no rendimento etanólico

A concentração inicial de inóculo pode afetar o rendimento de etanol. Pois, o crescimento celular consome açúcares fermentescíveis. Concentrações baixas de inóculo pode aumentar demasiadamente o período de fermentação. E, concentrações iniciais de inóculo maiores tendem a aumentar a velocidade de formação de etanol (AZHAR et al., 2017; HASHEM et al., 2021; WANDERLEY; SOARES; GOUVEIA, 2014). Os ensaios na terceira seção deste projeto foram conduzidos em mosto misto 80:20% v·v⁻¹ variando a concentração inicial de inóculo em 2,5% m·v⁻¹, 5,0% m·v⁻¹ e 7,5% m·v⁻¹, em massa úmida.

A duração total da fermentação foi de 41,5 horas. Os resultados obtidos de cada uma das condições de concentração de inóculo ensaiadas constam na Tabela 12. Ao final da fermentação de mosto misto com a menor concentração de inóculo testada (2,5% m·v⁻¹) foi obtida uma concentração de ART residual de 6,71 g·L⁻¹, enquanto a concentração final de etanol foi de 76,87 g·L⁻¹. Sob condições de fermentação de concentrações de inóculo de 5,0% m·v⁻¹ e de 7,5% m·v⁻¹ observou-se uma depleção quase completa de açúcares redutores totais, com ART residual neste caso sendo 0,68 g·L⁻¹ e 0,59 g·L⁻¹, nessa ordem.

Tabela 12: Concentrações de açúcares redutores totais e etanol obtidos ao final do processo e rendimento etanólico de cada uma das condições de fermentação do mosto misturado variando o tamanho do inóculo.

Concentração de inóculo (% m·v ⁻¹)	ART _{Residual} (g·L ⁻¹)		Concentração de etanol (g·L ⁻¹)		Rendimento etanólico	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
2,5	6,71	± 0,48	76,87	± 0,95	97%	± 1,47%
5,0	0,68	± 0,01	86,29	± 1,89	104%	± 2,28%
7,5	0,59	± 0,03	84,24	± 0,08	102%	± 0,09%

É desejável que o ART residual seja minimizado. Isso porque sobras de açúcar indicam prejuízo na indústria. Além disso, o descarte desse açúcar no efluente pode ter implicações ambientais. A exaustão do açúcar indica um processo de fermentação completo (ORTIZ et al., 2013; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001). Na indústria de fermentação de etanol, o açúcar residual ao final da fermentação é estritamente controlado num nível muito baixo (não mais que 5 g·L⁻¹) (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Já as concentrações finais de etanol foram 76,87 g·L⁻¹ e 86,29 g·L⁻¹ nas fermentações de mosto misto com concentrações de inóculo de 2,5% m·v⁻¹ e 5,0% m·v⁻¹, respectivamente. Na fermentação de mosto misto com 7,5% m·v⁻¹ de inóculo, a concentração de etanol foi 84,24 g·L⁻¹.

Conforme reportado na literatura (LALUCE et al., 2009), a concentração de etanol produzido aumenta com o aumento da concentração do inóculo. Porém, o aumento da concentração de inóculo conduz ao esgotamento de substrato, sendo que aumentar além disso a concentração de inóculo parece não propiciar melhores rendimentos da fermentação (ORTIZ et al., 2013; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001). Então, níveis mais elevados de inóculo tornam a fermentação mais rápida, mas nem sempre pode ser favorável ao processo (LALUCE et al., 2009). Existe, portanto, um ponto ótimo para concentração de inóculo, concentração de substrato (ART) e produtividade de etanol.

O menor rendimento etanólico ($97 \pm 1,47\%$) foi obtido com $2,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ de inóculo. Enquanto, os rendimentos etanólicos, considerando os desvios padrões, nas fermentações com $5,0\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ e $7,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ de inóculo não apresentaram distinção ($104\% \pm 2,28\%$ e $102\% \pm 0,09\%$, nessa ordem). Sob a ótica desses fatores, a fermentação de mosto misto com $5,0\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ de inóculo apresenta mais vantagem em maior escala, já que o inóculo é menor. Não foi possível verificar variação, considerando os desvios padrões obtidos, entre as concentrações celulares ao final do processo das fermentações conduzidas com inóculo de $2,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ e de $5,0\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$, conforme valores apresentados na Tabela 13. A fermentação de mosto misto com $7,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ de inóculo apresentou a maior concentração celular final.

Tabela 13: Concentração celular em massa úmida ao final da fermentação de mosto misto de cada uma das condições de concentração de inóculo testadas.

Condições de ensaio	Δ Peso (g)	
	Média	Desvio padrão
Concentração de inóculo ($\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$)		
2,5	1,05	$\pm 0,004$
5,0	1,12	$\pm 0,053$
7,5	1,16	$\pm 0,02$

A concentração do inóculo afeta os parâmetros cinéticos na fermentação do etanol (AZHAR et al., 2017; HASHEM et al., 2021). O aumento da concentração de

inóculo está relacionado ao aumento da concentração de biomassa, da taxa máxima de consumo e da taxa máxima de crescimento (TURHAN et al., 2010).

5.4 Aumento de escala da fermentação etanólica em biorreator de bancada

As condições de fermentação que apresentaram os melhores parâmetros de fermentação nos ensaios em tubos cônicos foram selecionadas para o aumento de escala da fermentação. Assim, a fermentação do mosto misto 80:20% v·v⁻¹ sem descontaminação e concentração de inóculo de 5,0% m·v⁻¹ foi a melhor condição analisada. Embora ao final da fermentação do mosto misto 80:20% v·v⁻¹ não tratado e com inóculo de 7,5% m·v⁻¹, as concentrações de etanol e de açúcar redutor residual foram muito semelhantes aos obtidos com a concentração de inóculo de 5,0% m·v⁻¹, a fermentação com maior concentração de inóculo (7,5% m·v⁻¹) também foi realizada em biorreator. Isso foi realizado para verificar o desempenho dos dois processos ao longo da fermentação, analisando amostras também durante o processo.

Conforme pode ser observado por meio da Figura 26, as concentrações de açúcares redutores totais, etanol e glicerol alteraram até, aproximadamente, as primeiras 15 horas de fermentação em biorreator. Ao final dos ensaios de fermentação em biorreator de bancada, tanto no ensaio A (inóculo 5,0% m·v⁻¹) quanto no ensaio B (inóculo 7,5% m·v⁻¹), as concentrações de ART esgotaram. Este mesmo comportamento foi verificado nos ensaios em tubo cônico. Os perfis de formação de glicerol em ambos os ensaios A e B foram semelhantes. Ao final da fermentação, as concentrações de etanol foram 80,08±0,51 g·L⁻¹ e 86,73±2,01 g·L⁻¹ nos ensaios A e B, respectivamente.

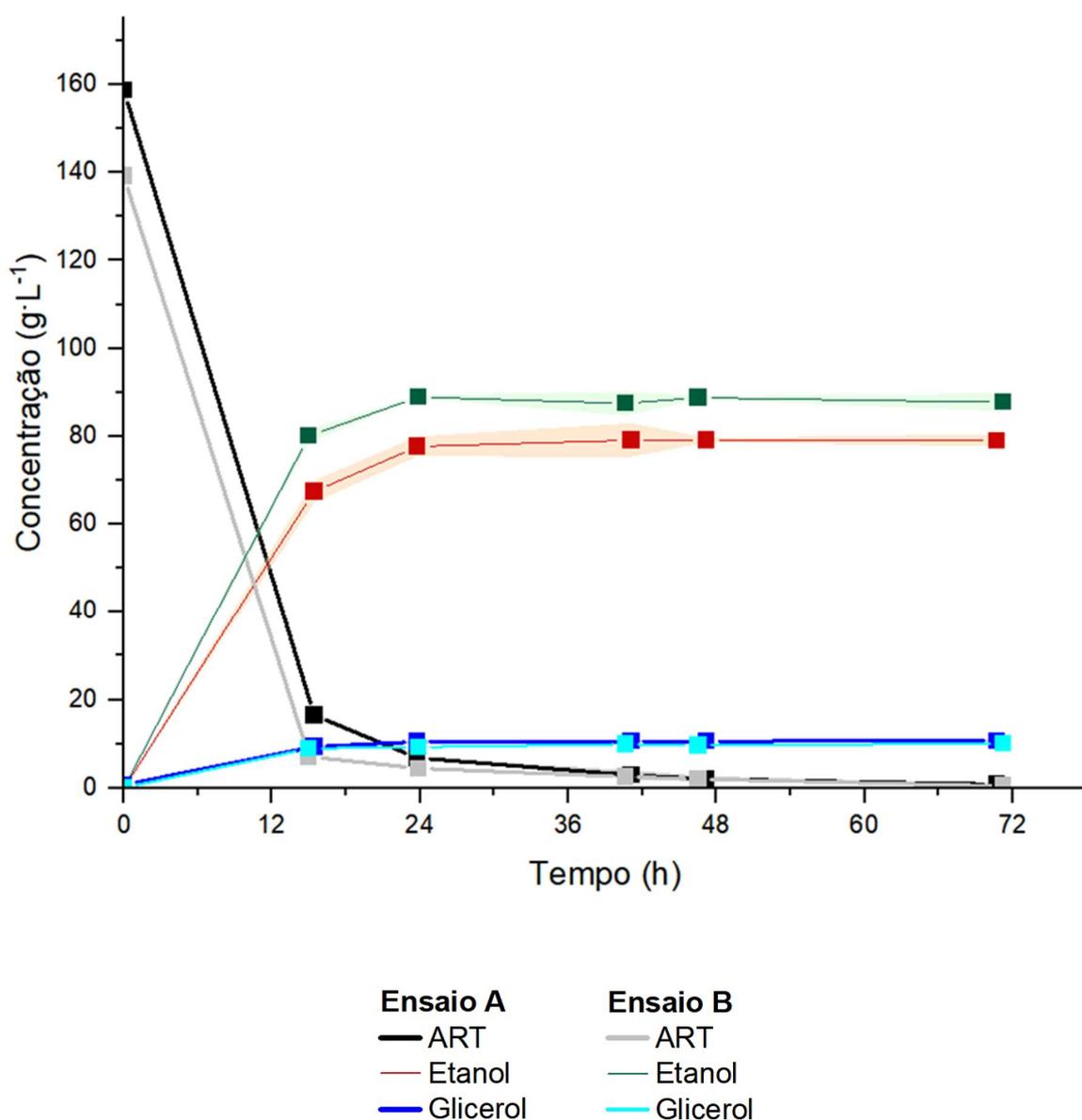


Figura 26: Redução das concentrações de açúcares redutores totais, aumento das concentrações de etanol e glicerol nos ensaios em biorreator: fermentação de mosto misto 80:20% v·v⁻¹ variando o inóculo em 5,0% m·v⁻¹ (ensaio A) e 7,5% m·v⁻¹ (ensaio B).

Os perfis de consumo de cada um dos açúcares (glicose, frutose, sacarose e maltose) dos dois ensaios em biorreator foram plotados e apresentados nas Figura 27 e Figura 28. Durante aproximadamente 15 horas de fermentação, a diminuição de açúcares foi exponencial. Ainda foi detectada glicose, sendo as concentrações de glicose nas amostras de cerca de 15 horas dos ensaios A e B foram $15,51 \pm 0,36$ g·L⁻¹ e $7,12 \pm 0,10$ g·L⁻¹, respectivamente. A hexose minoritária, a frutose, ainda foi

detectada em quantidades ínfimas ($0,85\pm 0,00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no ensaio A e $0,46\pm 0,01$ no ensaio B). Sendo que nas amostras subsequentes, a partir de cerca de 24 horas de fermentação, a frutose havia sido esgotada. Já a sacarose, um açúcar minoritário do mosto misto, foi completamente hidrolisada até as primeiras 15 horas de ensaio. A maltose foi lentamente consumida, sendo detectada ainda quando transcorridas cerca de 47 horas de fermentação em ambos os ensaios.

A maioria das leveduras pode converter uma variedade de hexoses em etanol pela via glicolítica (TSE; WIENS; REANEY, 2021). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* faz uso preferencial de glicose como fonte de carbono e energia, uma vez que ela pode naturalmente transportá-la para dentro da célula por difusão facilitada mediada transportadores de hexoses, onde a glicose é metabolizada pela via glicolítica (DE VALK et al., 2022; KAYIKCI; NIELSEN, 2015). Embora a frutose seja metabolizada simultaneamente à glicose, esta é consumida mais rapidamente (BERTHELIS et al., 2004; D'AMORE; RUSSELL; STEWART, 1989; NADAI et al., 2021).

O principal açúcar no xarope de cana-de-açúcar é a sacarose (BASSO et al., 2011). Vale ressaltar que a levedura *S. cerevisiae* pode hidrolisar a sacarose em glicose e frutose, principalmente pela invertase extracelular e captar as hexoses para o interior da célula onde são metabolizadas (BASSO et al., 2011; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004). A maltose proveniente do hidrolisado de milho também pode ser metabolizado pela levedura. A maltose é transportada para dentro da célula por meio de transportador transmembranar específico, e então, é hidrolisada pela maltase intracelular em duas unidades de glicose metabolizadas na via glicolítica (NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIĆ, 2004).

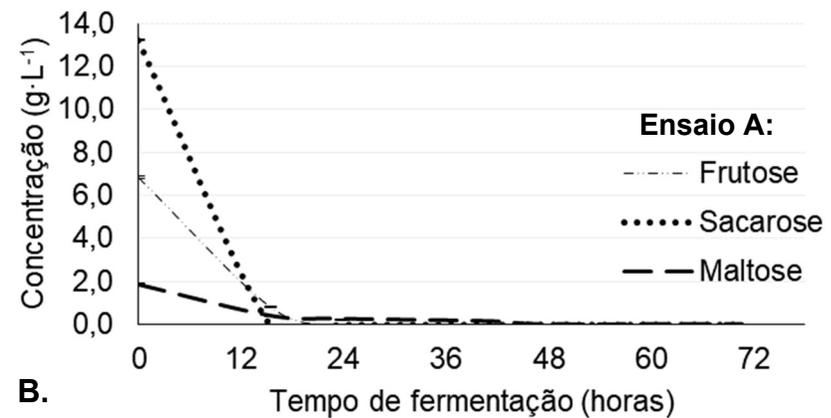
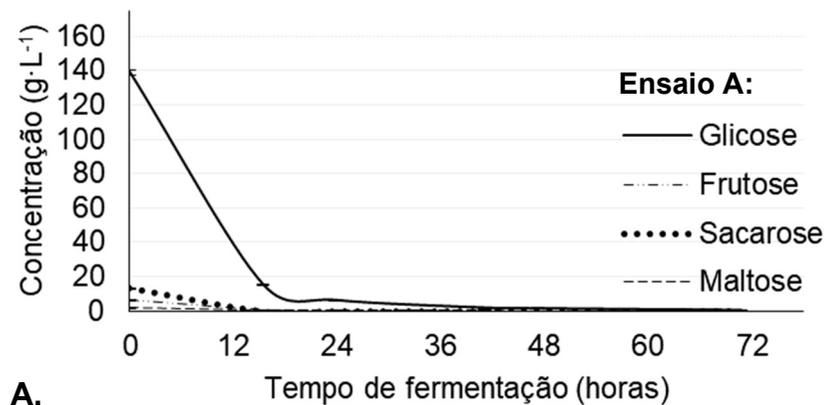


Figura 27: Perfis das concentrações de açúcares na fermentação de mosto misto com 5,0% $m \cdot v^{-1}$ de inóculo. À esquerda, consumo de todos os açúcares quantificados. E, à direita, perfis de metabolização de açúcares minoritários com mais detalhe.

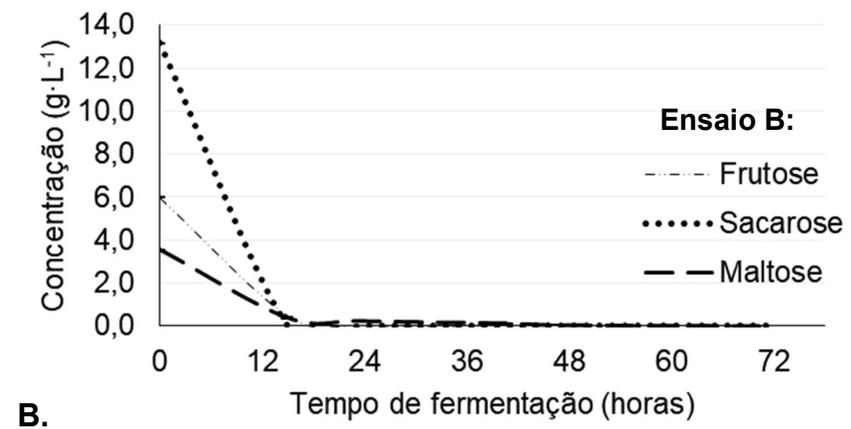
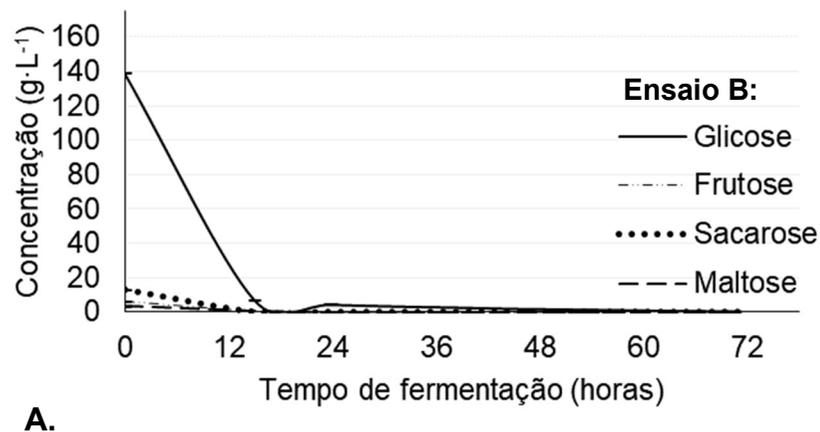


Figura 28: Perfis das concentrações de açúcares na fermentação de mosto misto 80:20% $m \cdot v^{-1}$ com 7,5% $m \cdot v^{-1}$. Em (A), constam os perfis de todos os açúcares quantificados e, em (B), com maior detalhe os perfis de consumo dos açúcares minoritários.

Na fermentação do mosto misto com inóculo $5,0\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ em biorreator, o rendimento etanólico obtido foi muito consistente com a concentração final de etanol obtida em tubo cônico (Figura 29). No entanto, no caso da fermentação do mosto misto com $7,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ em biorreator, o rendimento de etanol aumentou em relação ao rendimento obtido em tubo cônico. Nas fermentações em biorreator, foi possível verificar uma maior diferença entre os rendimentos de etanol dos dois ensaios, A e B, e o aumento do inóculo contribui para o aumento do rendimento de etanol. Isso pode ter ocorrido devido ao método de agitação por impelidores em biorreator possivelmente propiciar melhor homogeneização das células de levedura. A agitação é um fator central na fermentação, pois possibilita a dispersão suficiente propiciando um ambiente homogêneo e eficaz para a reação (AFEDZI; RATTANAPORN; PARAKULSUKSATID, 2022).

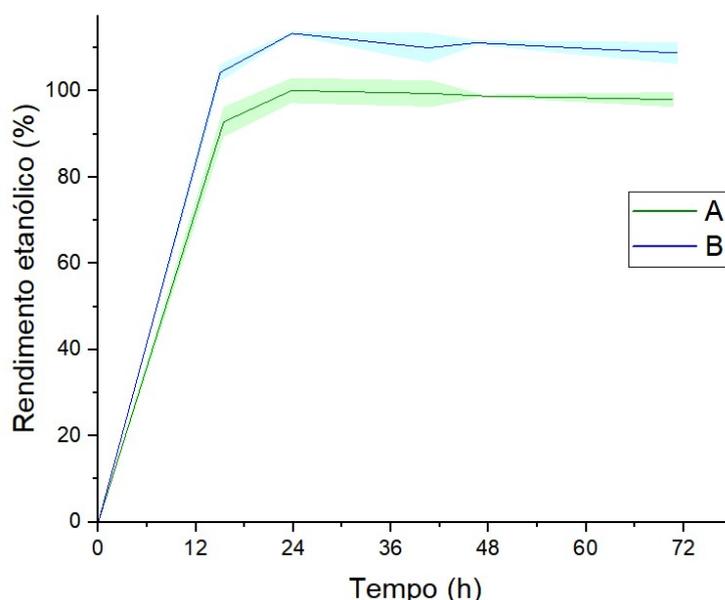


Figura 29: Perfil dos rendimentos etanólicos ao longo das fermentações de mosto misto $80:20\% \text{ v}\cdot\text{v}^{-1}$ em biorreator. Em (A), com $5,0\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ de inóculo e, em (B), com $7,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ de inóculo.

As amostras coletadas nos ensaios A e B em biorreator foram analisadas também em relação à contaminação bacteriana. Na Figura 30 constam as concentrações bacteriana obtidas em meio YPD contendo antifúngico cicloheximida e na Figura 31 a concentração bacteriana em meio MRS com cicloheximida. Nas duas condições de fermentação em biorreator, nenhuma colônia bacteriana cresceu no teste de contaminação em placa de Petri tanto no meio YPD quanto no meio MRS das

amostras de vinho coletadas após 36 horas de fermentação. Isso reitera os resultados obtidos nos ensaios em tubo cônico, em que nenhuma colônia bacteriana foi isolada das amostras de vinho das fermentações.

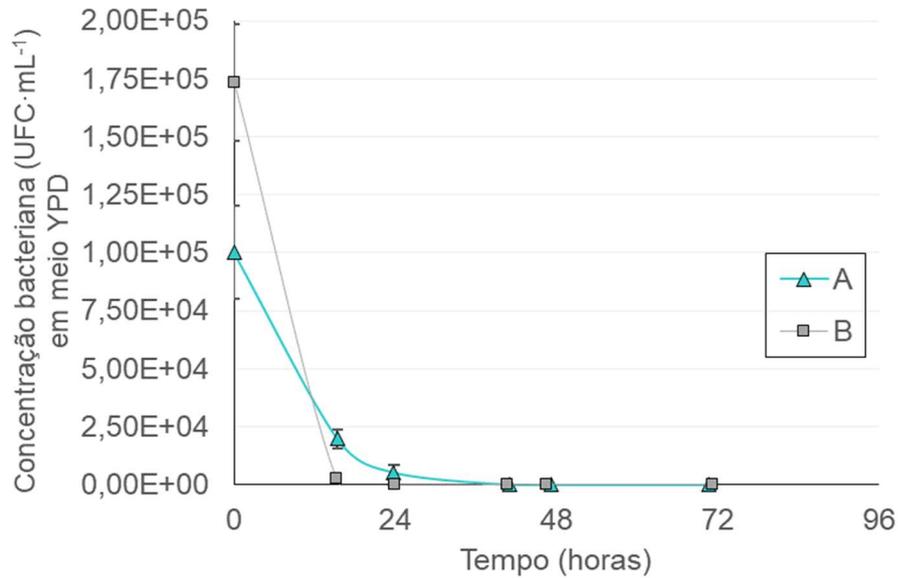


Figura 30: Perfis de carga bacteriana obtida em meio YPD a partir da fermentação de mosto misto 80:20% v·v⁻¹ em biorreator com 5,0% m·v⁻¹ de inóculo, em (A), e da com 7,5% m·v⁻¹ de inóculo, em (B).

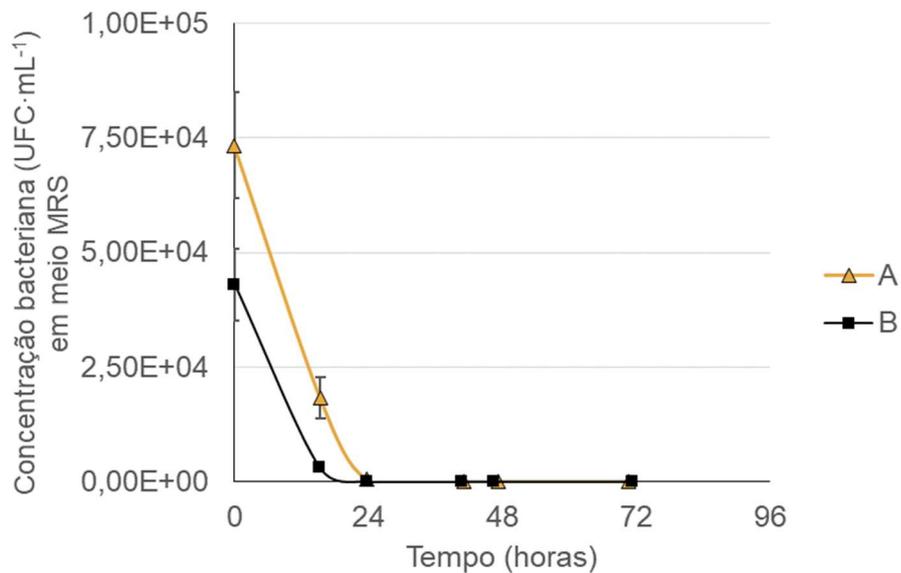


Figura 31: Concentração bacteriana obtida em meio MRS durante a fermentação de mosto misto 80:20% v·v⁻¹ em biorreator com 5,0% m·v⁻¹ de inóculo, em (A), e da com 7,5% m·v⁻¹ de inóculo, em (B).

O pH ótimo da fermentação etanólica na indústria situa-se entre 4 e 5 (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Acima de pH 5,0 o crescimento de bactérias é favorecido (KÁDÁR et al., 2007). Ao longo do processo, em ambas fermentações, o pH diminuiu (Figura 32). Na fermentação com inóculo 5,0% $m \cdot v^{-1}$, o pH inicial foi de 5,73 e o pH final foi de 3,73. Na fermentação com 7,5% $m \cdot v^{-1}$ de inóculo, o pH reduziu de 5,79 para 4,11.

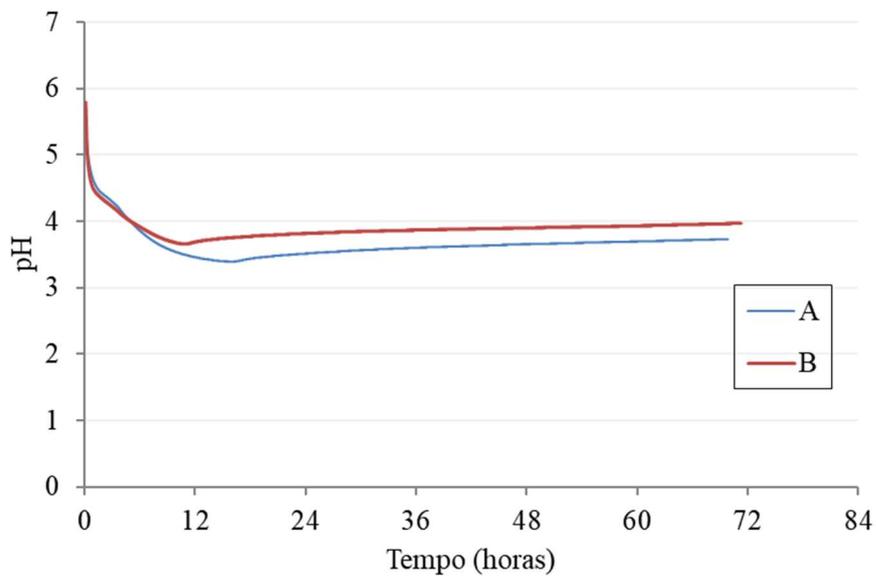


Figura 32: Variação do pH durante as fermentações de mosto misto 80:20% $v \cdot v^{-1}$ em biorreator. (A) refere-se ao ensaio com 5,0% $m \cdot v^{-1}$ de inóculo e, em (B), constam os valores do ensaio com 7,5% $m \cdot v^{-1}$ de inóculo.

Em relação à viabilidade celular (Figura 33), na primeira amostra coletada logo após o inóculo a viabilidade da levedura foi menor do que nas amostras seguintes, nas quais a viabilidade celular variou pouco (<2%). Isso deve estar relacionado à tensão cisalhante da separação das células durante a preparação do inóculo, que resulta em estresse e morte celular.

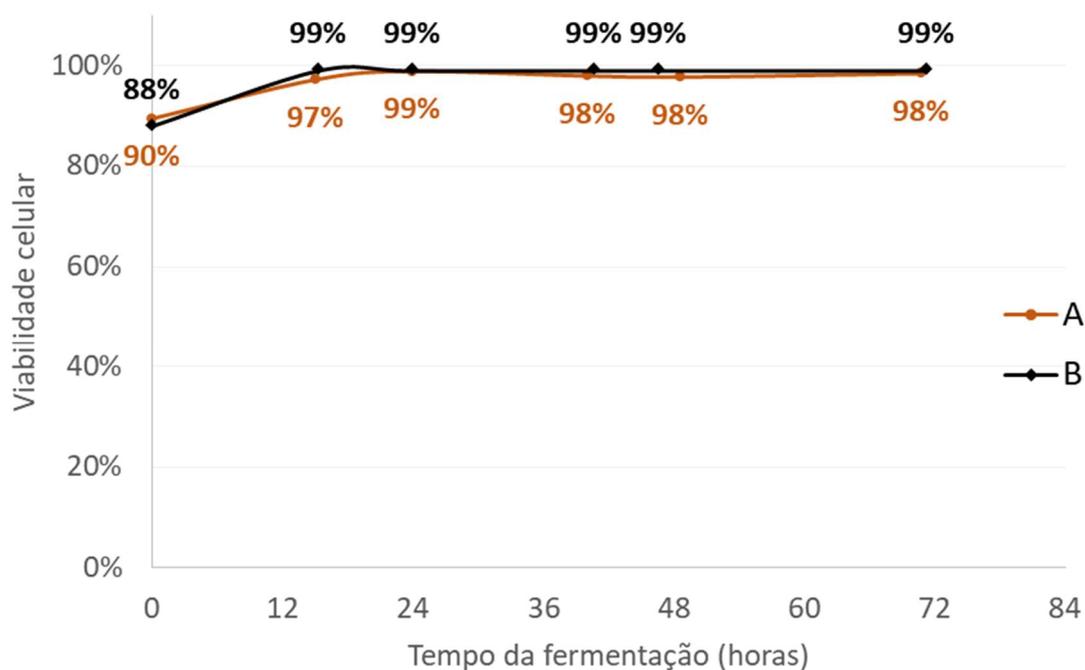


Figura 33: Perfis de viabilidade celular dos dois ensaios de fermentação de mosto misto 80:20% v·v⁻¹ em biorreator. Em (A), o inóculo foi de 5,0% m·v⁻¹ e, em (B), a fermentação ocorreu com 7,5% m·v⁻¹ de inóculo.

Durante a inoculação e a fermentação, vários fatores podem afetar as células de levedura. O estresse celular inclui fatores biológicos (competição microbiana, por exemplo), químicos (toxicidade de etanol, metabólitos e pH) e físicos (pressão osmótica). Mediante os efeitos deletérios do estresse celular, a contaminação microbiana, as mutações da levedura, a floculação de leveduras, podem oportunamente aumentar e afetar ainda mais as leveduras. A redução da atividade e da viabilidade da levedura influenciam o rendimento e a produtividade de etanol (TSE; WIENS; REANEY, 2021).

6 CONCLUSÕES

Das amostras de hidrolisado de milho, xarope de cana-de-açúcar e caldo de cana foram isolados 3 leveduras e 2 bactérias, 3 leveduras e 5 bactérias, 5 leveduras e 4 bactérias, respectivamente. Apesar de apresentar a menor carga microbiana dentre as amostras analisadas, a amostra de xarope apresentou relativamente diversidade microbiana. Das bactérias isoladas da amostra do caldo de cana, três foram espécies de *Leuconostoc*. Todos os microrganismos isolados apresentaram velocidades específicas máximas de crescimento menores do que a levedura. A bactéria ácido láctica *Leuconostoc mesenteroides* isolada da amostra de caldo de cana apresentou velocidade específica de crescimento máxima maior do que a Ethanol red™ sob concentrações de etanol superiores à 10% v·v⁻¹. Os demais microrganismos isolados apresentaram tolerância ao etanol inferior à observada no caso da levedura comercial de referência.

Em relação ao efeito do método de tratamento da contaminação no rendimento de etanol, verificou-se que as fermentações de mosto misto com contaminação inata apresentaram rendimentos de etanol superiores aos casos em que o mosto misto foi autoclavado ou submetido à radiação ionizante de 20 kGy. Os menores rendimentos etanólicos foram encontrados na fermentação do mosto misto autoclavado. E, as concentrações de ART residual foram maiores nas fermentações de mosto misto irradiado. De acordo com o maior rendimento de etanol (94%) e a menor concentração de açúcares residuais (26 g·L⁻¹) obtidos, o mosto misto ótimo foi aquele constituído por 80% v·v⁻¹ de hidrolisado de milho e 20% v·v⁻¹ de melaço de cana sem tratamento de descontaminação. A contaminação bacteriana não resistiu ao processo fermentativo. Após as fermentações, nenhuma colônia bacteriana foi isolada em todas as condições de mosto misto ensaiadas.

A produtividade do etanol aumentou com o aumento do tamanho dos inóculos. Embora níveis mais altos de inóculo levaram a uma fermentação mais rápida, há um ponto ótimo para concentração de inóculo, concentração de substrato (ART) e produtividade de etanol.

Ao final da fermentação de mosto misto 80:20% v·v⁻¹ variando a concentração de inóculo (41,5 horas de ensaio), ainda havia ART residual (6,71 g·L⁻¹) na fermentação com a menor concentração de inóculo ensaiada (2,5% m·v⁻¹), enquanto a depleção de ART nas condições de 5,0% m·v⁻¹ e de 7,5% m·v⁻¹ de inóculo foi quase completa (0,68 g·L⁻¹ e 0,59 g·L⁻¹, respectivamente). O menor rendimento etanólico (97± 1,47%) foi obtido com 2,5% m·v⁻¹ de inóculo. Não foi possível verificar variação, considerando os desvios padrões obtidos, entre os rendimentos etanólicos obtidos com os inóculos de 5,0% m·v⁻¹ e 7,5% m·v⁻¹ (104%± 2,28% e 102%± 0,09%, nessa ordem).

Nos ensaios em biorreator, o aumento do tamanho do inóculo contribuiu para o aumento do rendimento de etanol. Nas amostras coletadas após 36 horas de fermentação, não houve crescimento microbiano nos isolamentos em meio YPD quanto no meio MRS das amostras de vinho coletadas após 36 horas de fermentação. Isso reitera os resultados obtidos nos ensaios em tubo cônico, em que nenhuma colônia bacteriana foi isolada das amostras de vinho das fermentações.

REFERÊNCIAS

- ABO, B. O. et al. Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. **Reviews on Environmental Health**, v. 34, n. 1, p. 57–68, 2019.
- AFEDZI, A. E. K.; RATTANAPORN, K.; PARAKULSUKSATID, P. Impeller selection for mixing high-solids lignocellulosic biomass in stirred tank bioreactor for ethanol production. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100935, fev. 2022.
- AGARWALA, R. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D7–D19, 2016.
- ALBERS, E.; LARSSON, C. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1085–1091, 22 ago. 2009.
- ALBERTS, B. et al. Analisando células, moléculas e sistemas. In: **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. [s.l.] ArtMed, 2017. p. 473–474.
- ALCANTARA, G. U. et al. Brazilian “Flex Mills”: Ethanol from Sugarcane Molasses and Corn Mash. **Bioenergy Res.**, v. 13, n. 1, p. 229–236, 2020.
- ALONSO-GÓMEZ, L. A.; BELLO-PÉREZ, L. A. Four generations of raw materials used for ethanol production: challenges and opportunities. **Agrociencia**, v. 52, p. 967–990, 2018.
- AMJAD, A. et al. Changes in sugar contents and invertase activity during low temperature storage of various chipping potato cultivars. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 340–345, 2020.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- ATZMÜLLER, D.; ULLMANN, N.; ZWIRZITZ, A. Identification of genes involved in xylose metabolism of *Meyerozyma guilliermondii* and their genetic engineering for increased xylitol production. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.
- AUSTIN, B. The value of cultures to modern microbiology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 10, p. 1247–1256, 6 out. 2017.
- AVANZI, I. R. et al. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3717–3726, 2016.

AZHAR, S. H. M. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

BABAZADEH, R. et al. The yeast osmostress response is carbon source dependent. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

BAI, F. W. et al. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 287–293, jun. 2004.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89–105, jan. 2008.

BANOS, S. et al. A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 190, 2018.

BASSO, L. C.; BASSO, T. P.; BASSO, T. O. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da fermentação etanólica nas destilarias brasileiras. In: **Biociencia Industrial - Vol. 1 : Fundamentos**. [s.l.] Blucher, 2020. p. 243–280.

BASSO, T. O. et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694–703, nov. 2011.

BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Microbial Physiology**, v. 8, n. 1, p. 26–33, 2004.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 87–93, 1 ago. 2001.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BEHERA, S. et al. Scope of Algae as Third Generation Biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, 11 fev. 2015.

BERGMAN, L. W. Growth and Maintenance of Yeast. In: MACDONALD, P. N. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Two-Hybrid Systems ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2001. v. 177p. 9–14.

BERTHELIS, N. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 683–689, maio 2004.

BIDEAUX, C. et al. Minimization of Glycerol Production during the High-Performance Fed-Batch Ethanolic Fermentation Process in *Saccharomyces cerevisiae*, Using a Metabolic Model as a Prediction Tool. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 2134–2140, 2006.

BISCHOFF, K. M. et al. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 103, n. 1, p. 117–122, 2009.

BLOISE, I. et al. Microbial Identification in the Clinical Microbiology Laboratory Using MALDI-TOF-MS. In: CORRALES, F. J.; PARADELA, A.; MARCILLA, M. (Eds.). **Clinical Proteomics**. New York, NY: Humana, 2022. v. 2420p. 207–216.

BLOMQVIST, J. et al. Oleaginous yeast as a component in fish feed. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15945, 29 dez. 2018.

BONNET, M. et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New Microbe and New Infect**, v. 34, 2019.

BORINES, M. G.; DE LEON, R. L.; CUELLO, J. L. Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 22–29, jun. 2013.

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

BRUKER. **MALDI Biotyper® Changing Microbiology Innovation with Integrity MALDI-TOF Clinical Microbiology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <MALDI Biotyper® Changing Microbiology Innovation with Integrity MALDI-TOF Clinical Microbiology>. Acesso em: 8 jan. 2022.

CALEGARI, R. P. et al. Wort disinfection treatment with electron beam for bioethanol production. **Scientia Agricola**, v. 80, 2023.

CARVALHO, J. C. M. et al. Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Grown in Sugarcane Blackstrap Molasses Through a Fed-Batch Process: Optimization by Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 151–164, 2003.

CASPETA, L.; CASTILLO, T.; NIELSEN, J. Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 2015.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 80, 25 jun. 2018.

CHAUDHARY, N. et al. 16S Classifier: A Tool for Fast and Accurate Taxonomic Classification of 16S rRNA Hypervariable Regions in Metagenomic Datasets. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116106, 3 fev. 2015.

CHAUDHARY, N. et al. Electron Beam Induced Tailoring of Electrical Characteristics of Organic Semiconductor Films. **Chemistry Africa**, v. 3, n. 3, p. 571–592, 2020.

CLARK, C. M. et al. Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 19, p. 4981–4986, 2018.

CLARO, F. B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E. V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 693–700, mar. 2007.

COLA, P. et al. Differential effects of major inhibitory compounds from sugarcane-based lignocellulosic hydrolysates on the physiology of yeast strains and lactic acid bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 4, p. 571–582, 23 abr. 2020.

COSTA, O. Y. A. et al. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 73–84, 18 jan. 2015.

CUCOLO, G. R. **Produção de ciclodextrinas a partir de amidos de diferentes fontes vegetais e seu emprego na inclusão molecular de aroma cítrico**. Tese—Rio Claro: Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2009.

D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 315–323, jul. 1989.

DARODA, R. J.; CUNHA, V. S.; BRANDI, H. S. From Sugarcane to Bioethanol: The Brazilian Experience. In: **Advances in Carbon Management Technologies**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2021. v. 2p. 37–49.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. appl. Bact.**, v. 23, p. 130–135, 1960.

DE VALK, S. C. et al. Engineering proton-coupled hexose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 47, 7 dez. 2022.

DELLIAS, M. DE T. F. et al. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of lactobacilli contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2018.

DEVESA-PEIRÓ, A.; SÁNCHEZ-REYES, J. M.; DÍAZ-GIMENO, P. Molecular biology approaches utilized in preimplantation genetics: real-time PCR, microarrays, next-generation sequencing, karyomapping, and others. **Human Reproductive Genetics**, p. 49–67, 2020.

DEVI, S. M.; ARCHER, A. C.; HALAMI, P. M. Screening, Characterization and In Vitro Evaluation of Probiotic Properties Among Lactic Acid Bacteria Through Comparative Analysis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 7, n. 3, p. 181–192, 7 set. 2015.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOLET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 568–576, 2011.

DUQUE, A. et al. Advanced bioethanol production: From novel raw materials to integrated biorefineries. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 1–30, 2021.

EGGLESTON, G.; FINLEY, J. W.; DE MAN, J. M. Carbohydrates. In: MAN, J. M. DE et al. (Eds.). **Principles of Food Chemistry**. 4. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 165–230.

ENDO, A.; TANIZAWA, Y.; ARITA, M. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Environmental Samples. In: [s.l.: s.n.]. p. 3–13.

FEDOREC, A. J. H. et al. Single strain control of microbial consortia. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. [s.l.] Artmed, 2018. v. 4

FIRMINO, F. C. et al. Characterization of microbial communities in ethanol biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 183–195, 1 fev. 2020.

FRANCO-DUARTE, R. et al. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 130, 13 maio 2019.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. Biodegradable Polymers. In: CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. (Eds.). **Biodegradation - Life of Science**. Rijeka: InTech, 2013. p. 141–185.

GONÇALVES, F. et al. Strategies to improve the environmental efficiency and the profitability of sugarcane mills. **Biomass and Bioenergy**, v. 148, p. 106052, maio 2021.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 333–351, 2016.

HARRISON, S. T. L. **Cell Disruption**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2011. v. 2

HASHEM, M. et al. On the optimization of fermentation conditions for enhanced bioethanol yields from starchy biowaste via yeast co-cultures. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 4, p. 1–13, 2021.

HIBBING, M. E. et al. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8(1), n. 1, p. 15–25, 2010.

HIERRO, N. et al. New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 792–801, 2004.

HOFF, R. B. et al. Residues of antibiotics in yeasts from ethanol production: a possible contamination route for feedingstuffs. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 4, p. 307–312, 3 abr. 2021.

HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300–372, 2002.

HUGHES, R.-A. et al. Genome Sequence and Composition of a Tolyporphin-Producing Cyanobacterium-Microbial Community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 1068–1085, 2017.

IPCC. **Climate Change 2021: The Physical Science Basis**. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/#FullReport>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

JAISSWAL, D. et al. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **Nature Climate Change**, v. 7, n. 11, p. 788–792, 2017.

JUYAL, A. et al. Influence of soil structure on the spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil at microscaleX. **European Journal of Soil Science**, v. 72, n. 1, p. 141–153, 1 jan. 2021.

KÁDÁR, Z. et al. Ethanol fermentation of various pretreated and hydrolyzed substrates at low initial pH. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 847–858, abr. 2007.

KARNAUSKAS, K. B.; MILLER, S. L.; SCHAPIRO, A. C. Fossil Fuel Combustion Is Driving Indoor CO₂ Toward Levels Harmful to Human Cognition. **GeoHealth**, v. 4, n. 5, 2020.

KARP, S. G. et al. Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 3, p. 899–912, 2021.

KASVI. **Catálogo Geral**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://secureservercdn.net/104.238.71.140/98n.27d.myftpupload.com/wp-content/uploads/2021/05/catalogo-kasvi.pdf>>. Acesso em: 6 out. 2021.

KAYIKCI, Ö.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 6, p. 1–8, set. 2015.

KHANEGHAH, A. M. et al. Electron beam irradiation to reduce the mycotoxin and microbial contaminations of cereal-based products: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 143, 2020.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 6 nov. 2004.

KOH, C. M. Storage of Bacteria and Yeast. In: [s.l.: s.n.]. p. 15–21.

KOUNOSU, A. et al. Improved 18S and 28S rDNA primer sets for NGS-based parasite detection. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

KUMAR, R. S.; SINGH, P.; GHOSH, S. Sequential fermentation for enhanced volumetric productivity of bioethanol from mixed sugars. **Fuel**, v. 308, p. 121984, jan. 2022.

LALUCE, C. et al. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 627–637, 1 jun. 2009.

LI, Q.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Bacterial Community Structure and Dynamics During Corn-Based Bioethanol Fermentation. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 2, p. 409–421, 17 fev. 2016.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Processos fermentativos e enzimáticos. In: **Biotecnologia industrial**. São Paulo - SP: Edgard Blucher, 2001. v. 3p. 1–43.

LINO, F. S. DE O. et al. Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021.

LIU, C. et al. Development of a Blocking Primer to Inhibit the PCR Amplification of the 18S rDNA Sequences of *Litopenaeus vannamei* and Its Efficacy in *Crassostrea hongkongensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–15, 2019.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

LOYTE, A. et al. Recent developments in utilizing hydrous ethanol for diverse engine technologies. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 177, p. 108985, jul. 2022.

LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.

LUNG, H. M. et al. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 66–78, 2015.

MADIGAN, M. T. et al. Controle do Crescimento Microbiano. In: **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010a. p. 779–810.

MADIGAN, M. T. et al. Nutrição, Cultura e Metabolismo de Micro-organismos. In: **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010b. p. 107–140.

MADIGAN, M. T. et al. Evolução e Sistemática Microbianas. In: **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010c. p. 367–397.

MINICH, A. et al. Complex Analysis of Vanillin and Syringic Acid as Natural Antimicrobial Agents against *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1816, 5 fev. 2022.

MURUAGA, M. L. et al. Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. **Renewable Energy**, v. 85, p. 649–656, jan. 2016.

NADAI, C. et al. Different Gene Expression Patterns of Hexose Transporter Genes Modulate Fermentation Performance of Four *Saccharomyces cerevisiae* Strains. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 164, 23 ago. 2021.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 581–584, 14 dez. 2004.

NATTER, K.; KOHLWEIN, S. D. Yeast and cancer cells - Common principles in lipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 2, p. 314–326, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NOBRE, T. DE P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 20–25, 2007.

NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIĆ, V. Regulation of Maltose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol**, v. 42, p. 213–218, 2004.

ORTIZ, M. J. et al. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 371–377, mar. 2013.

OTTO, A. et al. Proteomics. From relative to absolute quantification for systems biology approaches. **Methods in Microbiology**, v. 39, p. 81–106, 2012.

PARCHEN, R. G.; DE VALK, C. G. The Ongoing Revolution of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Molecular Diagnostics. In: **Molecular Diagnostics**. [s.l.] Springer Singapore, 2019. p. 387–409.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100–111, 2015.

PERIS, D. et al. Synthetic hybrids of six yeast species. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2085, 29 dez. 2020.

PERSSON, M.; GALBE, M.; WALLBERG, O. A strategy for synergistic ethanol yield and improved production predictability through blending feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 156, 5 dez. 2020.

PETERS, D. Raw Materials. In: **White Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 1–30.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, n. OCT, 2014.

PIRES, J. C. M. et al. Recent developments on carbon capture and storage: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 9, p. 1446–1460, 2011.

PITTET, V.; MORROW, K.; ZIOLA, B. Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene *gtf*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, n. 1, p. 57–61, 2011.

PODADERA, P. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. Doutorado em Tecnologia Nuclear—São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, 2007.

POSTERARO, B. et al. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: Identification of fungi and beyond. **Expert Review of Proteomics**, v. 10, n. 2, p. 151–164, 2013.

PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Fermentation (Industrial): Recovery of Metabolites. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 2, p. 822–833, 2014.

QIAGEN. **DNeasy® UltraClean® Microbial Kit Handbook**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=a733f3a9-5a8b-4003-b28e-55bb050bad1e&lang=en>>. Acesso em: 2 out. 2021.

QUEIROZ, L. L. et al. Dynamics of microbial contaminants is driven by selection during ethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 303–312, 9 mar. 2020.

QUINTELA BALUJA, M. et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry, a Rapid and Reliable Method for the Identification of Bacterial Species in Food-Microbiology Laboratories. In: **Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 353–385.

REN21. **RENEWABLES 2021: GLOBAL STATUS REPORT**. Disponível em: <<https://www.unep.org/resources/report/renewables-2021-global-status-report>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

RFA. **Annual World Fuel Ethanol Production**. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

RUDOLF, A.; KARHUMAA, K.; HAHN-HAGERDAL, N. Ethanol Production from Traditional and Emerging Raw Materials. In: **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. 1. ed. Berlin: Springer, 2009. p. 489–513.

SAIKA, H. et al. A point mutation of Adh1 gene is involved in the repression of coleoptile elongation under submergence in rice. **Breeding Science**, v. 56, n. 1, p. 69–74, 2006.

SALVINO DA SILVA, M. A. et al. Real-Time Monitoring of Yeasts Growth Based on Bioimpedance Spectroscopy. In: **World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering**. Prague: Springer, 2019. v. 68/1p. 525–529.

SAMBO, F. et al. Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. **BMC Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2018.

SÁNCHEZ, C. et al. Profiling of organic compounds in bioethanol samples of different nature and the related fractions. **ACS Omega**, v. 5, n. 33, p. 20912–20921, 2020.

SANDLE, T. History and development of microbiological culture media. **The Journal (Institute of Science and Technology)**, p. 10–14, 2011.

SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Culture media for lactic acid bacteria. In: CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. (Eds.). **Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Science, 2003. v. 37p. 127–140.

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. [s.l.] Blucher, 2021. v. 2

SCHWEINBERGER, C. M.; TRIERWEILER, J. O.; TRIERWEILER, L. F. A simple equation for Total Reducing Sugars (TRS) estimation on sweet potato and ethanol yield potential. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 33–41, 2019.

SEO, S. O. et al. Anti-contamination strategies for yeast fermentations. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 1–13, 2020.

SEUNG, D.; SMITH, A. M. Starch granule initiation and morphogenesis—progress in Arabidopsis and cereals. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 3, p. 771–784, 2019.

SHENDURE, J. et al. DNA sequencing at 40: Past, present and future. **Nature**, v. 550, n. 7676, p. 345–353, 2017.

SHIMOMURA-SHIMIZU, M.; KARUBE, I. Yeast based sensors. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 117, p. 1–19, 2010.

SICA, P. et al. Effects of Energy Cane (*Saccharum* spp.) Juice on Corn Ethanol (*Zea mays*) Fermentation Efficiency: Integration towards a More Sustainable Production. **Fermentation**, v. 7, n. 1, p. 30, 22 fev. 2021.

SILVA, A. L. DA; CASTAÑEDA-AYARZA, J. A. Macro-environment analysis of the corn ethanol fuel development in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2021.

SINCLAIR, L. et al. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. AUG, p. 1–16, 2015.

SINHA, S. et al. Carotenoid Production by Red Yeast Isolates Grown in Agricultural and “Mandi” Waste. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 7, p. 3939–3949, 2 jul. 2021.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

STANLEY, D. et al. **The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae***. **Journal of Applied Microbiology**, 2010.

STEINBACH, A.; WILLE, A.; SUBRAMANIAN, N. H. Biofuel analysis by ion chromatography. **LC-CG Europe**, p. 35–38, 2008.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. et al. Structural changes of corn starch during fuel ethanol production from corn flour. **BioTechnologia**, v. 3, p. 333–341, 2012.

TAO, C. et al. Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 22 set. 2020a.

TAO, N.; GAO, Y.; LIU, Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: a promising candidate for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 668–675, jun. 2011.

TAO, Y. et al. Structural changes of starch subjected to microwave heating: A review from the perspective of dielectric properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 593–607, 2020b.

THIJS, S. et al. Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–15, 2017.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 5, p. 819–828, 18 maio 2001.

TOLEDO, L. E. T. et al. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 451–469.

TORRES-SANGIAO, E.; LEAL RODRIGUEZ, C.; GARCÍA-RIESTRA, C. Application and Perspectives of MALDI–TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, 2021.

TSE, T. J.; WIENS, D. J.; REANEY, M. J. T. Production of bioethanol—a review of factors affecting ethanol yield. **Fermentation**, v. 7, n. 4, 2021.

TURHAN, I. et al. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5290–5296, jul. 2010.

VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2009.

VOORDECKERS, K. et al. Ethanol exposure increases mutation rate through error-prone polymerases. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

WAGNER, K. et al. Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

WALKER, G. M.; BASSO, T. O. Mitigating stress in industrial yeasts. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 387–397, maio 2020.

WANDERLEY, M. C. DE A.; SOARES, M. L.; GOUVEIA, E. R. Selection of inoculum size and *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of sugar cane bagasse. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 27, p. 2762–2765, 2014.

WANG, Y. et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

WARMT, C. et al. Using Cy5-dUTP labelling of RPA-amplicons with downstream microarray analysis for the detection of antibiotic resistance genes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20137, 11 dez. 2021.

WELKER, M. et al. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. **Expert Review of Proteomics**, v. 16, n. 8, p. 695–710, 2019.

WONGSURAKUL, P. et al. Comprehensive Review on Potential Contamination in Fuel Ethanol Production with Proposed Specific Guideline Criteria. **Energies**, v. 15, n. 9, p. 2986, 20 abr. 2022.

WOOD, J. L.; TANG, C.; FRANKS, A. E. Competitive traits are more important than stress-tolerance traits in a cadmium-contaminated rhizosphere: A role for trait theory in microbial ecology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2018.

YAN, W. et al. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, 2021.

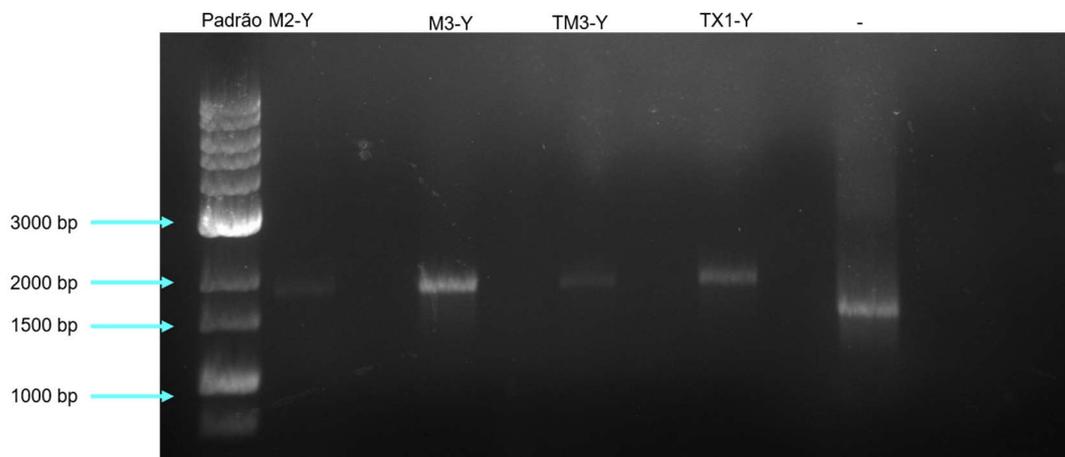
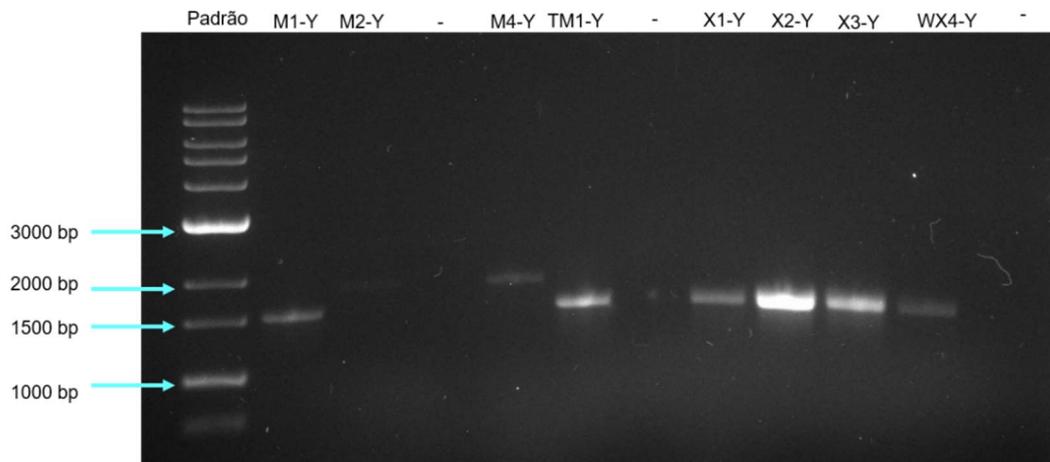
YU, K. O.; KIM, S. W.; HAN, S. O. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 209–214, 15 out. 2010.

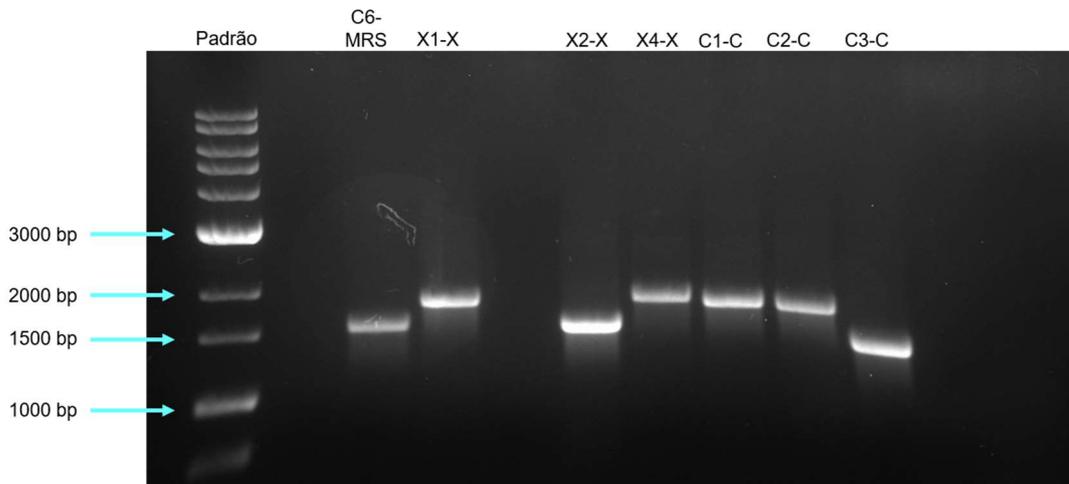
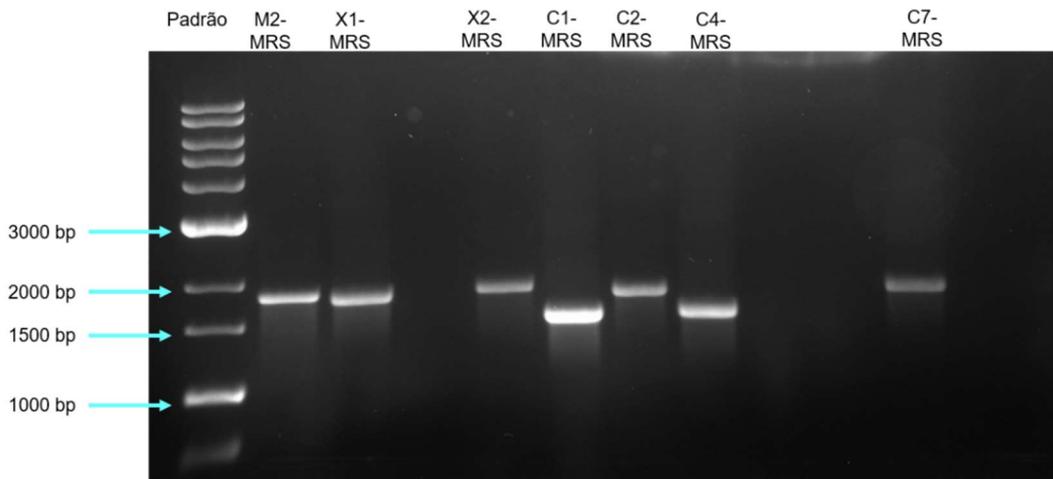
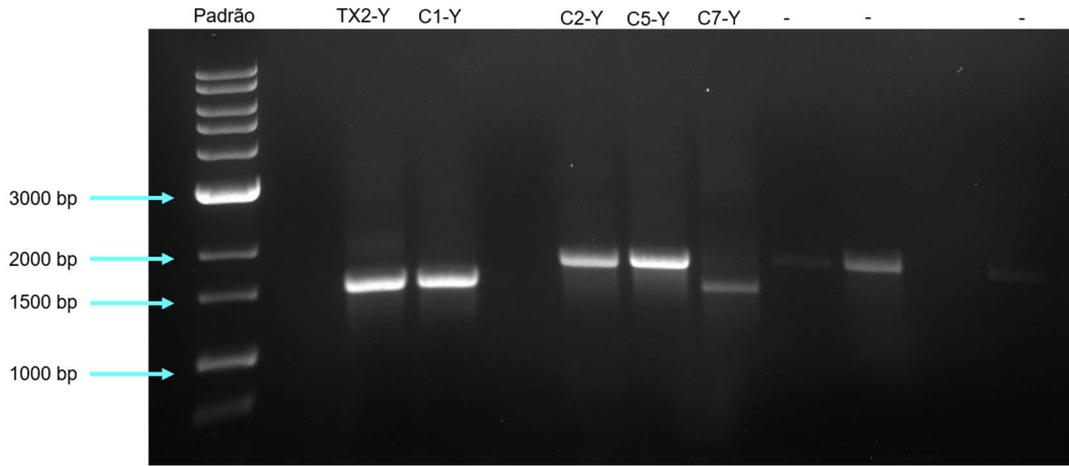
YUGI, K. et al. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 276–290, abr. 2016.

ZHA, Y. et al. Preparation and Evaluation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates for Growth by Ethanologenic Yeasts. In: [s.l: s.n.]. p. 245–259.

ZHANG, L. et al. Engineering of the glycerol decomposition pathway and cofactor regulation in an industrial yeast improves ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 1153–1160, 2013.

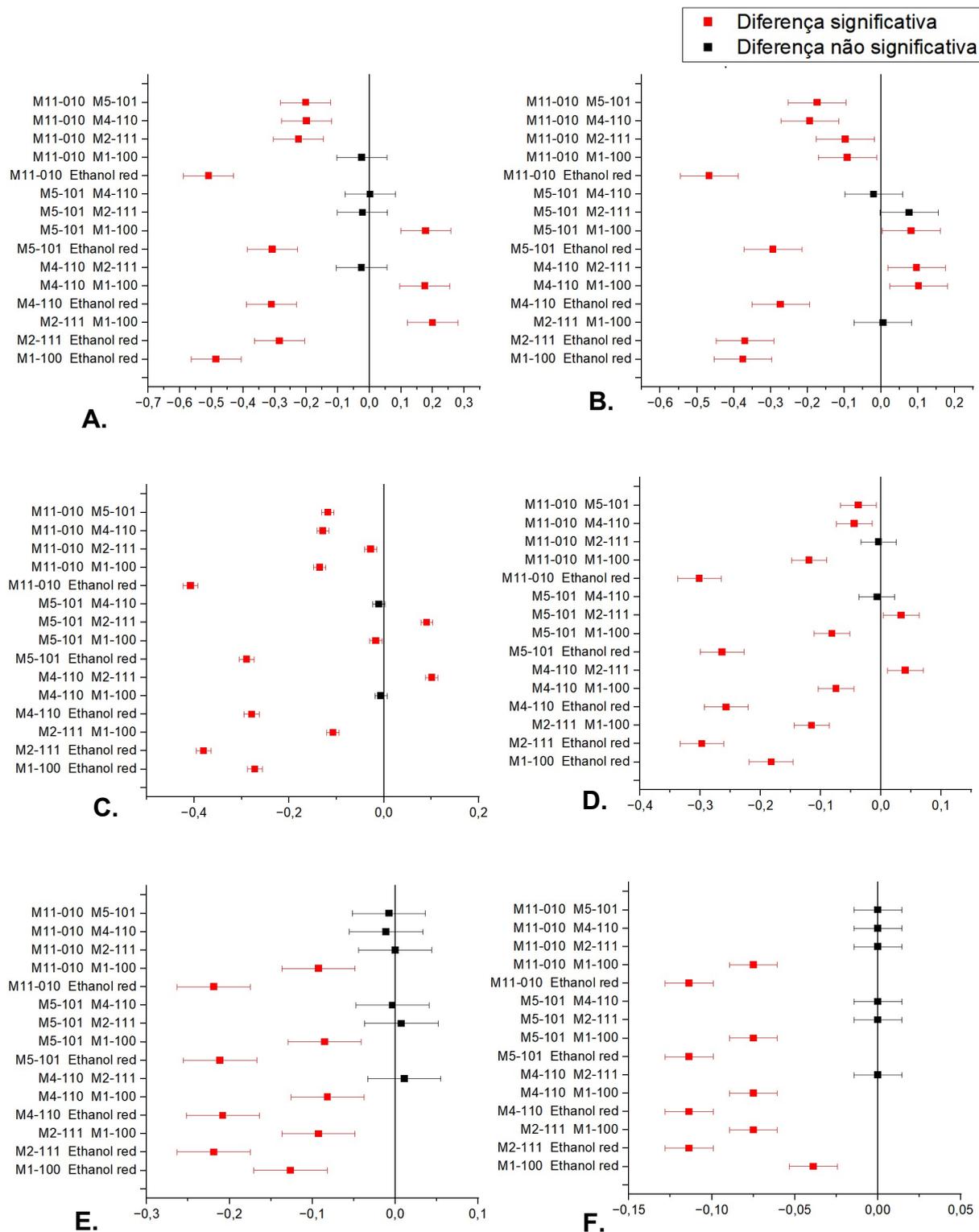
APÊNDICE A – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) para bandas de DNA dos microrganismos isolados





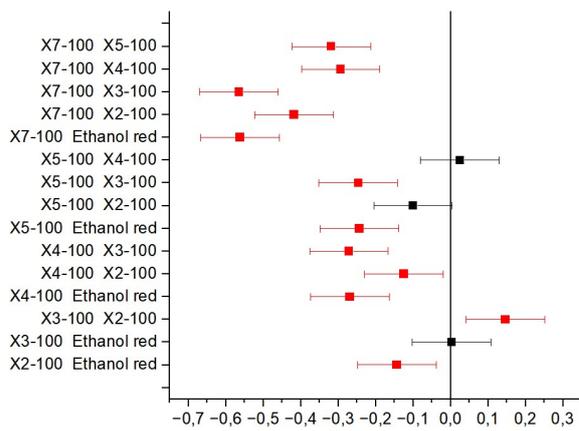
APÊNDICE B – Análise estatística da cinética microbiana sob estresse etanólico pelo método Tukey

Comparação das médias de $\mu_{\text{máx}}$ dos microrganismos isolados do hidrolisado de milho e da Ethanol red™ sob estresse etanólico de 0-10% v·v⁻¹ (de A à F).

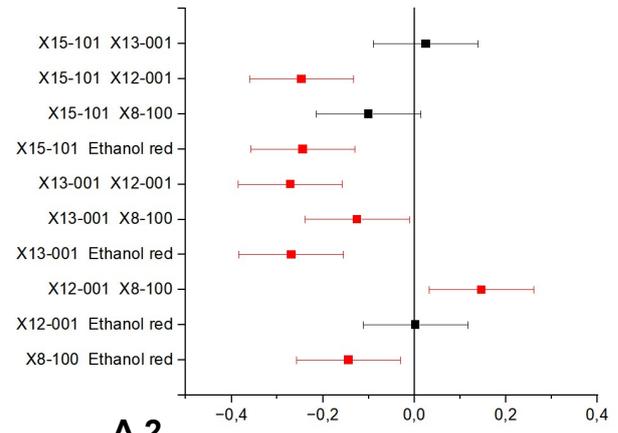


Comparação das médias de $\mu_{\text{máx}}$ dos microrganismos isolados da amostra de xarope de cana e da Ethanol red™ sob estresse etanólico de 0-10% v·v⁻¹ (de A à F).

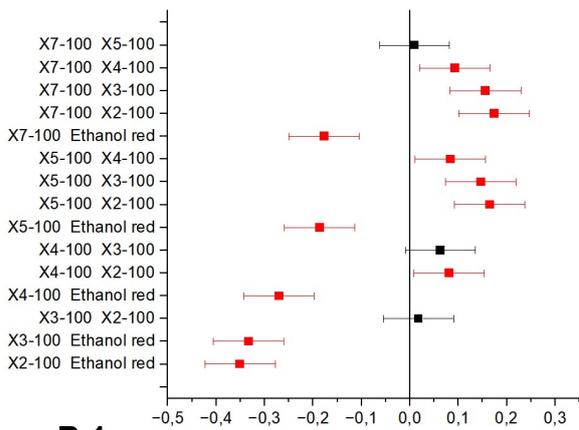
■ Diferença significativa
■ Diferença não significativa



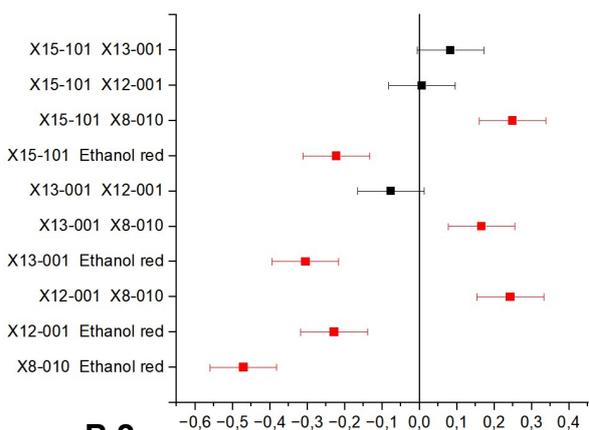
A.1.



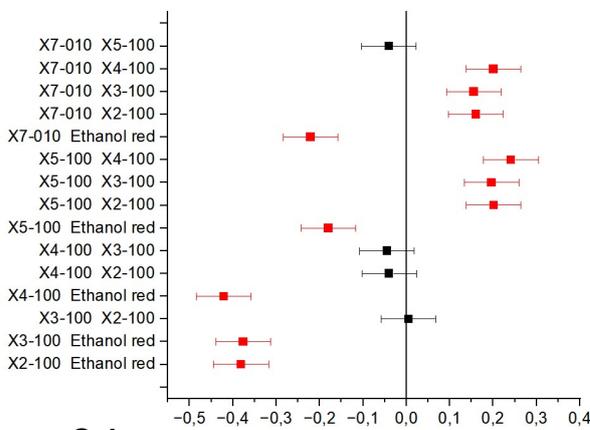
A.2.



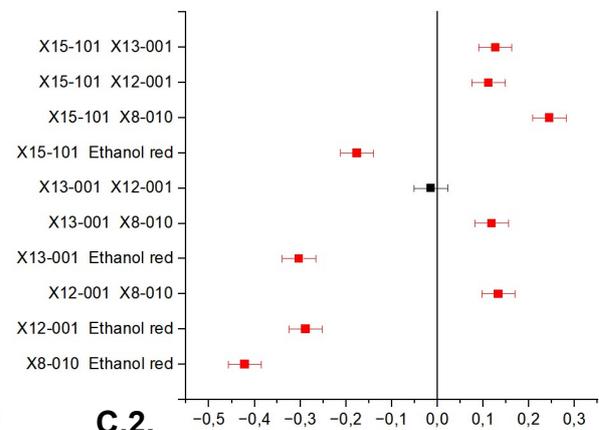
B.1.



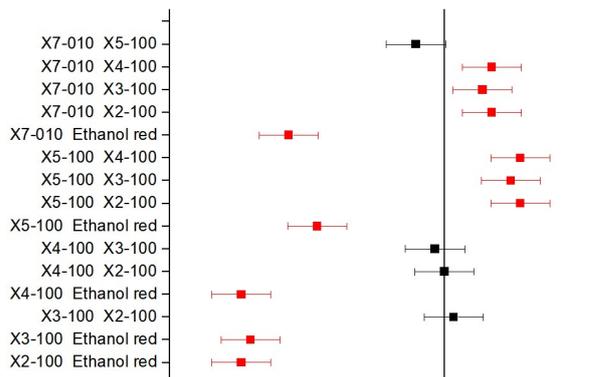
B.2.



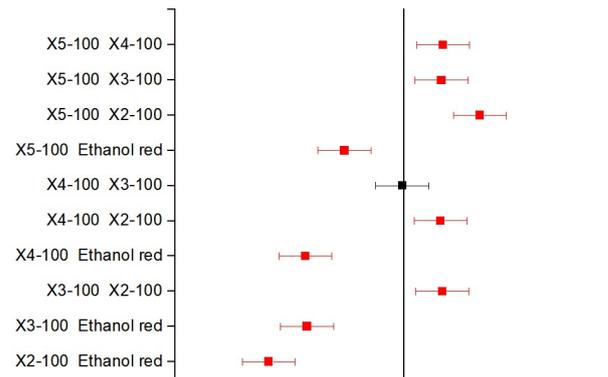
C.1.



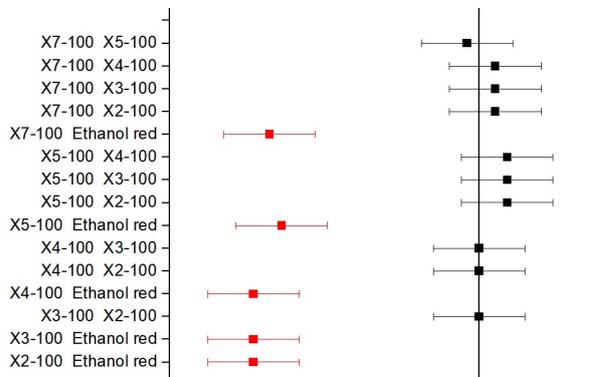
C.2.



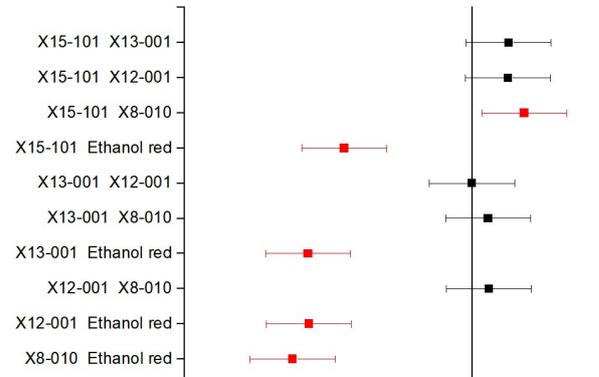
D.1.



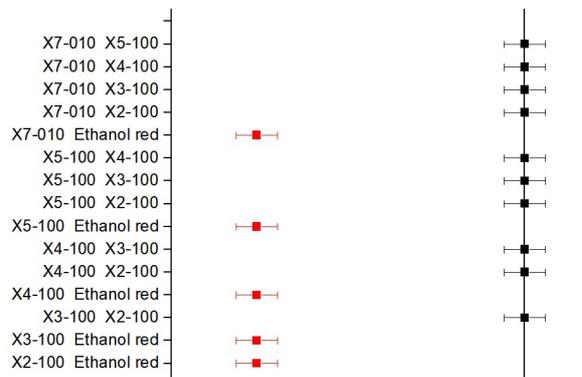
D.2.



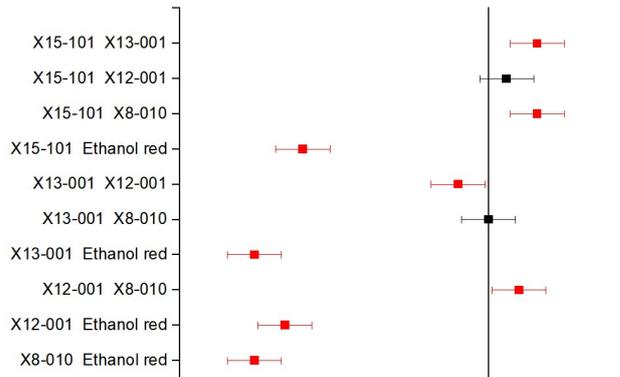
E.1.



E.2.

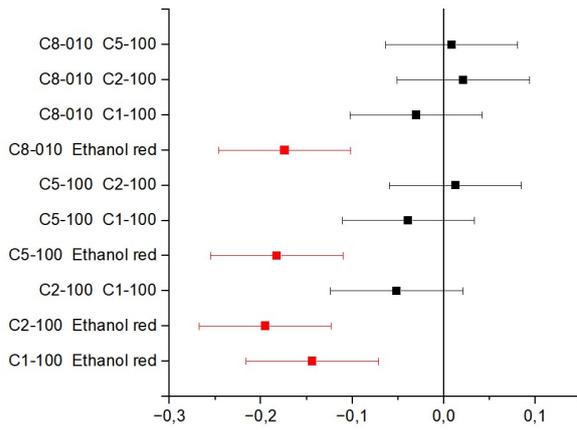
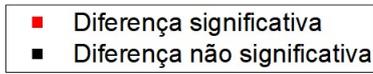


F.1.

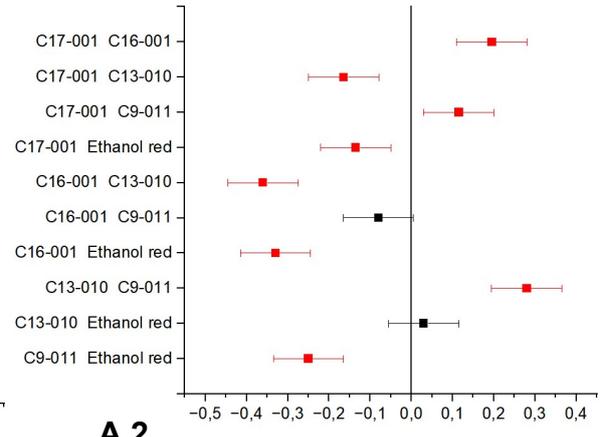


F.2.

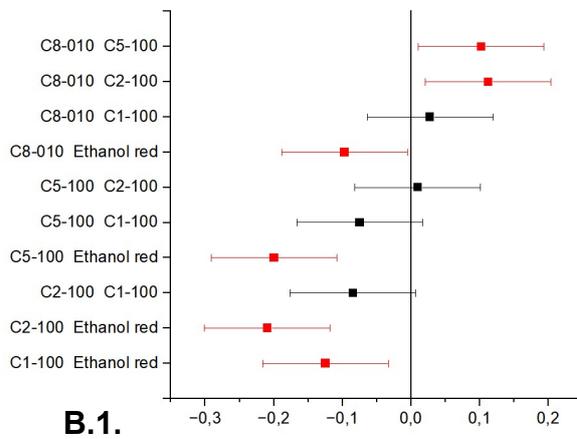
Comparação das médias de $\mu_{\text{máx}}$ dos microrganismos isolados da amostra de caldo de cana e da Ethanol redTM sob estresse etanólico de 0-10% v-v⁻¹ (de A à F).



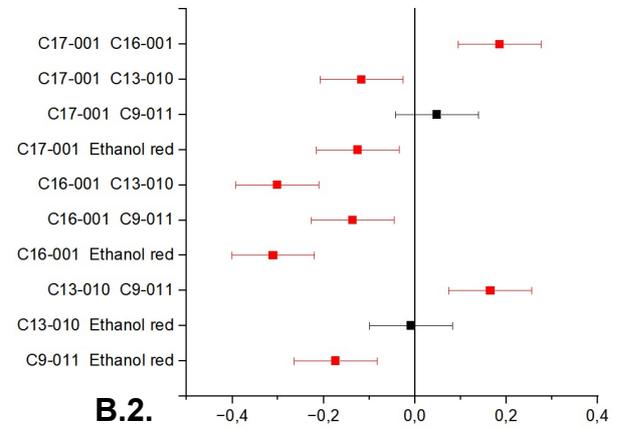
A.1.



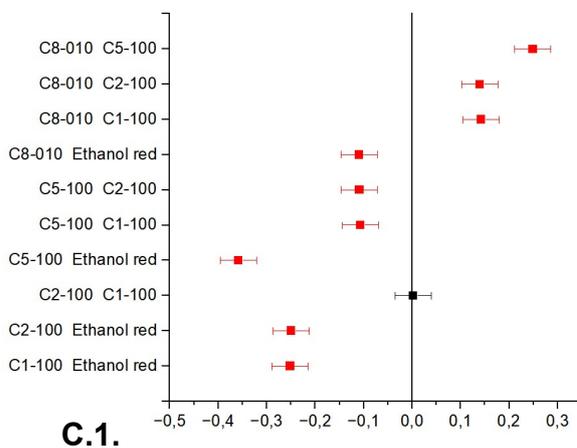
A.2.



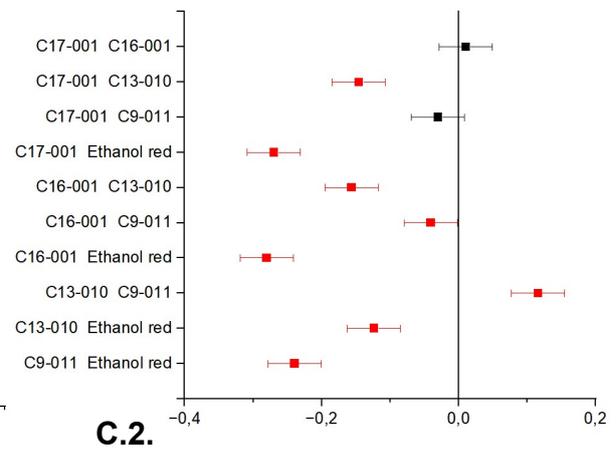
B.1.



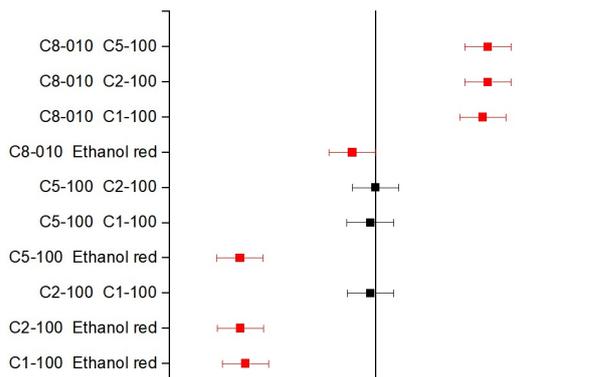
B.2.



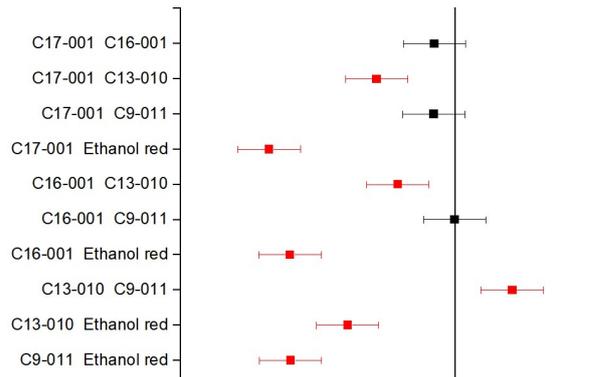
C.1.



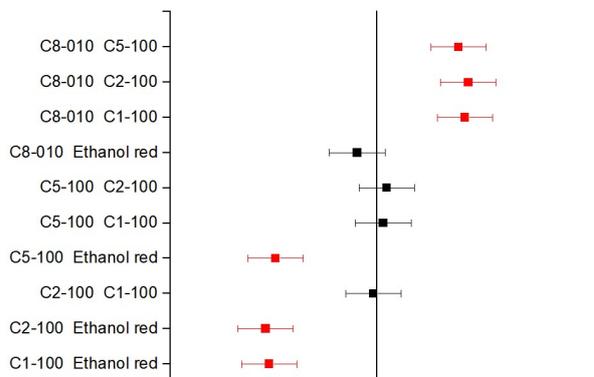
C.2.



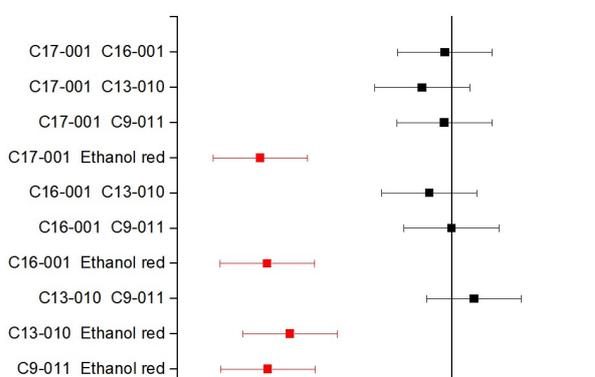
D.1.



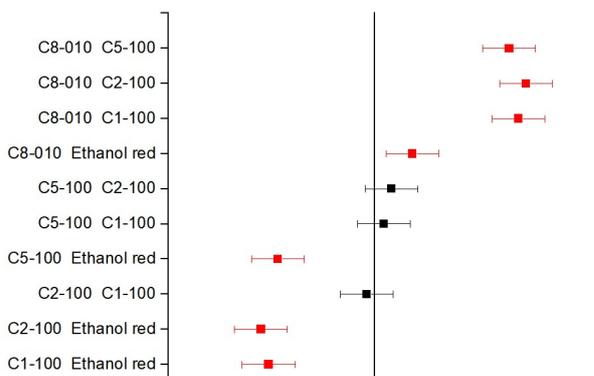
D.2.



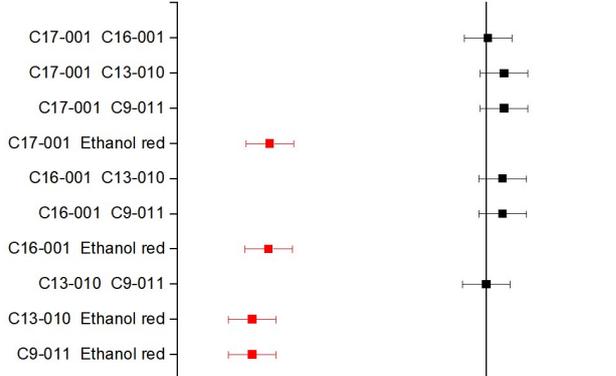
E.1.



E.2.



F.1.



F.2.