



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica**

**ROMAIRA GUEDES RODRIGUES**

**DIVERSIDADE MICROBIANA CULTIVÁVEL EM PROCESSO INDUSTRIAL DE  
PRODUÇÃO DE ETANOL**

**Brasília - DF**

**2017**

**ROMAIRA GUEDES RODRIGUES**

**DIVERSIDADE MICROBIANA CULTIVÁVEL EM PROCESSO INDUSTRIAL DE  
PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador: prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida.

**Brasília - DF**

**2017**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Romaira Guedes Rodrigues**, matrícula nº **15/0102721**, intitulada "*Diversidade microbiana cultivável em processo industrial de produção de Etanol*", apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 24 de abril de 2017.

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida  
Presidente de Banca (Embrapa Agroenergia)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Betania Ferraz Quirino  
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Viviane Castelo Branco Reis  
Membro Titular (IB/UnB)

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira  
Membro Suplente (Embrapa Agroenergia)

Em 24 de abril de 2017.

***Dedico***

*Ao Marcelo Manguiera, meu companheiro de vida, melhor amigo e maior  
incentivador na realização dos meus sonhos*

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar pela proteção e por conceder saúde e coragem.

Ao meu esposo Marcelo Mangueira pelo amor e apoio incondicional, pela paciência durante as minhas crises de estresses no decorrer do curso, por ter me dado encorajamento diário para não desistir diante das dificuldades que enfrentamos ao longo da caminhada. Força meu Gigante!

Aos meus pais Mauro e Doraci pela criação, por terem me dado uma base familiar com valores que me norteiam por onde ando.

À minha família pelo amor, respeito e parceria de vida, mesmo de longe estão sempre tentando participar de cada etapa da minha vida.

À Universidade de Brasília-UNB pela oportunidade no Programa de Pós-Graduação, mesmo enfrentando sérios problemas no contexto político e econômico, assim como as demais instituições públicas do nosso País, ainda assim, consegue dar excelentes e necessários retornos à sociedade.

À Embrapa Agroenergia pela excelência na presteza de sua atividade fim, por receber os alunos e oferecer o que há de melhor para o desenvolvimento profissional de cada um.

Ao meu orientador Dr. João Ricardo por ter respondido o e-mail inicial, ter me dado espaço e oportunidade, por ter confiado em mim para a realização desse trabalho.

À Flávia de Paula por acompanhar o desenvolvimento do trabalho desde o início, pelas dúvidas tiradas, pelas dicas, por sempre se fazer presente para a troca de ideias, sobre o trabalho em desenvolvimento e sobre a vida, gratidão pela forma como age em disseminar o seu conhecimento e aprendizado.

À Nathália Vilela uma irmãzinha que a bancada me presenteou, pela forma leve e justa de conduzir a vida, pelo profissionalismo impecável, pelas vibrações positivas e momentos de descontrações, nos momentos mais complicados sempre se fez presente, da Agroenergia para a vida.

À Débora Trichez pela amizade e calma, generosidade, pelo apoio dado, dúvidas tiradas no decorrer da realização desse trabalho e por todas as vibrações positivas.

À Bárbara Paes pela irmandade, mesmo tendo que fazer dez coisas ao mesmo tempo, sempre tira um tempinho para a troca de experiências, pelas conversas descontraídas sobre a vida, pelas dúvidas tiradas pelo apoio e por todas as vibrações positivas.

Ao Henrique Veras pela irmandade e disponibilidade em ler os meus escritos, por dividir sua história de vida e servir como fonte de inspiração, pelos cafezinhos oferecidos na sala dos alunos e pelas boas energias emanadas e momentos de descontração.

À Jéssica Bergmann pela amizade e carinho, pelas dúvidas tiradas no decorrer do trabalho, pela paz e profissionalismo transmitidos, que vindo dela são indissociáveis.

À Eliane Simplício pela amizade construída no decorrer do programa, pela companhia pelo apoio e torcida pelas palavras no momento de silêncio e incertezas e pelas boas risadas no momento de descontração.

À Carol Bitencourt e Talita Gabriela, pela amizade e todas os bons pensamentos, pelos momentos de descontrações, pela torcida.

À Valquíria Lacerda pela amizade e boas vibrações.

À Luana Serra pelo carinho, amizade e torcida.

Aos demais amigos de bancada, pela troca de ideia a respeito dos experimentos, pelos momentos de descontração, são excelentes profissionais.

A todos os professores do Programa Tecnologias Química e Biológica em especial ao Prof. Fabrício Machado por escutar e sempre tentar achar uma melhor forma de conduzir as questões referentes ao programa.

Aos analistas do LGB-Embrapa Agroenergia, em especial a Betúlia Souto pela atenção dispensada, palavras edificantes, torcida e disponibilidade em contribuir por tirar as dúvidas no dia-a-dia do laboratório.

À pesquisadora Léia Fávaro pela atenção dispensada e conversas informais a respeito de biologia molecular.

Aos Professores Betania Quirino, Viviane Castelo e Félix Siqueira por aceitar o convite para participar da composição da banca de defesa, pela disponibilidade de tempo e paciência para avaliar esse trabalho e contribuir na minha formação profissional.

À Cesarina Alcântara pela amizade e convites para o café da tarde após o término de expediente, quando o pensamento estava na banda que não amplificou.

À Lúcia França e família pelo amor e carinho, vibrações positivas, por dividir, acolher sempre que necessário.

Obrigada a todas as pessoas que direta e indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

*Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.*

*Charles Darwin*

## RESUMO

**Referência:** RODRIGUES, Romaira Guedes. **Diversidade microbiana cultivável em processo industrial de produção de Etanol** Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

O aumento da produção de fontes de energias alternativas oriundas de biomassas renováveis em especial biocombustíveis, como o etanol, em substituição gradual do petróleo é visto como um importante contribuinte para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz. O Brasil é o produtor de etanol mais competitivo do mundo, com um mercado doméstico bem desenvolvido, cada vez mais estimulado pelo crescimento das vendas de carros “flex-fuel”. A produção de etanol é realizada por processo fermentativo, graças à ação biológica das leveduras, que convertem os açúcares presentes no mosto, em etanol, gás carbônico e compostos secundários. Entretanto, este processo está sujeito à contaminação por leveduras selvagens, caracterizadas por estarem presentes no processo fermentativo sem terem sido selecionadas para a condução da produção de álcool, competindo pelo substrato e causando problemas ao processo. O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade de micro-organismos contaminantes em duas etapas do processo de produção do etanol. Amostras de mosto e vinho foram coletadas de duas usinas de produção de etanol no estado de Goiás. Foi realizada contagem microbiana ao longo da safra. As colônias selecionadas foram isoladas e armazenadas em glicerol a -80°C. Foi realizada caracterização fisiológica, não só para a identificação de morfotipos que se destacaram para a produção de etanol como também para a síntese de compostos orgânicos como ácido acético e succínico. Foi realizada a extração de DNA das amostras isoladas em meio YPD e amplificação por PCR das regiões D1-D2 que codifica o gene 28 S para levedura para identificação taxonômica. As sequências geradas foram analisadas utilizando –se banco de dados específico para o gene em questão. As espécies de leveduras que indicaram os maiores hits e destacaram-se nas amostras de mosto e vinho das usinas foram *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* e *Saccharomyces cerevisiae*. O conhecimento a respeito dos micro-organismos contaminantes permite a possibilidade de fortalecimento no programa de monitoramento da dinâmica de linhagens de leveduras no processo produtivo das indústrias, pois condições adequadas de assepsia, de armazenamento de melaço, limpeza das dornas e canalizações, e dificuldades para esterilizar grandes volumes de mosto são práticas que contribuem na diminuição do nível de micro-organismos contaminantes.

Palavras-chave: Etanol, contaminantes, taxonomia, levedura, *Saccharomyces*.



## ABSTRACT

**Reference:** RODRIGUES, Romaira Guedes. Growing microbial diversity in industrial ethanol production process. Dissertation (Masters). Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Increase in production of alternative energy sources deriving from renewable biomass, in particular biofuels like ethanol, in gradual substitution to petrol is perceived as an important contributor for the development of a sustainable and effective industrial society. Brazil is the most competitive ethanol producer of the world, with a well developed domestic market, increasingly stimulated by the growth in sales of flex-fuel cars. Ethanol production is carried out by fermentation process, thanks to the biological action of yeasts, which convert the sugars present in the sugar cane juice into ethanol, carbon dioxide and secondary compounds. However, this process is at risk of contamination by wild strains, characterized by being present in the fermentative process even though they were not selected for the alcohol production, and thus competing for substrate and causing problems to the process. The objective of this work was to study the diversity of contaminating microorganisms in two stages of ethanol production process. Samples of sugar cane juice and wine were collected from two ethanol production plants in the state of Goiás. Microbial counting was carried out throughout the harvest. The selected colonies were isolated and stored in glycerol at -80 ° C. Physiological characterization was performed, not only for the identification of morphotype that stood out for ethanol production, but also for the synthesis of organic compounds such as acetic and succinic acid. DNA extraction from samples isolated in YPD medium and amplification through PCR of the D1-D2 regions, which codes for yeast 28S gene were performed for taxonomic Identification. The generated sequences were analyzed using a specific database for the gene in question. The yeast species that had the highest hits and stood out both at sugar cane juice and wine from the distillery were *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Knowledge about contaminating microorganisms allows the possibility of strengthening the monitoring program of the dynamics of yeast strains in the production process of the industries, since adequate conditions of asepsis, storage of molasses, cleaning pipes and difficulties for sterilizing large volumes of sugar cane juice are habits that contribute to the reduction of contaminating microorganisms levels.

Keywords: Ethanol, contaminants, taxonomy, yeast ,*Saccharomyces*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Matérias-primas exploradas para a produção de etanol.....	19
<b>Figura 2:</b> Produção de cana-de-açúcar por região.....	20
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo do processo de produção do etanol.....	21
<b>Figura 4:</b> Formação de produtos da fermentação alcoólica.....	25
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da região do RNA ribossômico utilizada para a identificação de leveduras.....	30
<b>Figura 6:</b> Contagem microbiológica nas amostras de mosto da Usina Itumbiara.....	40
<b>Figura 7:</b> Contagem microbiológica das amostras de vinho da Usina Itumbiara.....	41
<b>Figura 8:</b> Contagem microbiológica das amostras de mosto da Usina Tropical.....	41
<b>Figura 9:</b> Contagem microbiológica das amostras de vinho da Usina Tropical .....	42
<b>Figura 10:</b> Número de morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical.....	43
<b>Figura 11:</b> Consumo de glicose (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical.....	48
<b>Figura 12:</b> Produção de ácido acético, ácido lático e etanol (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical.....	48
<b>Figura 13:</b> Produção de ácido succínico e glicerol (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical.....	49
<b>Figura 14:</b> Consumo de glicose (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical .....	50
<b>Figura 15:</b> Produção de ácido lático e etanol (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical.....	50
<b>Figura 16:</b> Produção de ácido acético, glicerol e ácido succínico (g/L) pelos morfotipo isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical .....	51
<b>Figura 17:</b> Consumo de glicose (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical. ....	52
<b>Figura 18:</b> Produção de ácido lático e etanol (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio M9 com glicose 20g/L após 48h de fermentação. ....	52
<b>Figura 19:</b> Produção de ácido acético, glicerol e ácido succínico (g/L) pelos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho .....	53
<b>Figura 20:</b> Perfil de amplificação da região D1/D2 do rDNA de morfotipos selecionados de leveduras de amostras de mosto e vinho das usinas ITB e TRP.....	55
<b>Figura 21:</b> Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região D1-D2 de leveduras.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Padrões analisados com as respectivas concentrações e tempo de retenção.....	37
<b>TABELA 2</b> – Temperatura e pH das amostras recebidas das usinas de produção de etanol.....	39
<b>TABELA 3</b> – Amostras que não apresentaram unidade formadora de colônia-cfu, após o plaqueamento em diferentes meios de cultura.....	42
<b>TABELA 4</b> – Número de isolados de amostras de mosto e vinho em diferentes meios de culturas das Usinas Itumbiara.....	44
<b>TABELA 5</b> – Isolados selecionadas da usina Itumbiara para a caracterização fisiológica.....	45
<b>TABELA 6</b> – Linhagens selecionadas da Usina Tropical para a caracterização fisiológica.....	47
<b>TABELA 7</b> – Isolados selecionados para a identificação taxonômica das amostras de mosto e vinho isolados em meio YPD, das coletas 1 e 16 das Usinas ITB e TRP.....	54
<b>TABELA 8</b> – Isolados escolhidos na identificação taxonômica de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosine triphosphate

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

CFU – Colony Forming Unit

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

EUA-Estados Unidos da América

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ITB – Usina Itumbiara

ITS-Região espaçadora transcrita

MRS – De Man Rogosa Sharp

MTBE – Methyl tert-butyl ether

M9 – Meio de cultura mínimo

PCR – Polymerase Chain Reaction

RNA – Ácido ribonucleico

TRP – Usina Tropical

TSB – Tryptic Soy Broth

UNICA – União da Indústria da Cana-de-açúcar

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

WLN – Wallerstein Laboratories Nutrient Ágar

YPD – Yeast extract – Peptone – Dextrose

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>144</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
2.1. A produção de etanol no Brasil .....	17
2.2. Cana- de- açúcar: a matéria-prima brasileira para a produção de etanol. ....	19
2.3. Produção de etanol a partir de cana-de-açúcar .....	21
2.4. Fermentação etanólica .....	23
2.4.1. A levedura.....	23
2.4.2. A conversão dos açúcares .....	24
2.4.3. Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....	25
2.4.4. Micro-organismos contaminantes do processo de produção de etanol .....	27
2.5. Identificação de micro-organismos contaminantes na produção de etanol .....	29
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo Geral .....	31
3.2. Objetivos específicos .....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. Soluções e meios de cultura .....	32
4.1.1 Meio TSB (Caldo soja Trypticaseína).....	32
4.1.2 Meio YPD (YEPD Broth).....	32
4.1.3 Meio MRS (De Man Rogosa Sharp) .....	32
4.1.4. M9 - Meio de cultura mínimo.....	33
4.1.5. Solução Salina 0,85% .....	33
4.1.5. Antibiótico Cloranfenicol.....	33
4.1.6. Antimicótico Cicloheximida.....	34
4.1.7. Fase móvel e Acetonitrila 10% para análise em HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência).....	34

4.2. Coleta de amostras .....	34
4.3. Processamento das amostras .....	35
4.3.1. Isolamento e contagem de micro-organismos.....	35
4.4. Caracterização dos micro-organismos quanto a síntese de metabólitos por HPLC .....	36
4.4.1. Ensaio fermentativo em pequena escala .....	36
4.4.2. Metabólitos de interesse .....	36
4.5. Identificação das linhagens contaminantes .....	37
4.5.1. Extração de DNA dos micro-organismos .....	37
4.5.2. Amplificação por PCR da região D1/D2 .....	37
4.5.3. Sequenciamento e análise dos dados .....	38
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1. Isolamento e contagem de micro-organismos.....	39
6.2. caracterização fisiológica dos isolados.....	44
6.2.2. Resultado da caracterização fisiológica para os compostos produzidos: Etanol, Glicerol, Ácido Lático e Ácido Acético dos isolados cultivados em meio de cultura M9+Glicose 20g/L. ....	53
6.2.3. Resultado da caracterização fisiológica para os compostos produzidos: Etanol, Glicerol e Ácido Lático dos isolados cultivados em meio de cultura M9+Glicose 20g/L. ....	53
6.3. Identificação taxonômica de isolados .....	53
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
Anexo.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

Os derivados de petróleo expressam a maior parcela da base energética mundial. São fontes não renováveis de energia, constituem reservas limitadas e localizadas, predominantemente, em regiões historicamente envolvidos em conflitos políticos territoriais, fatores que resultam em irregularidades de preço, fornecimento e distribuição. Além disso são fontes energéticas responsáveis por elevada liberação de gases causadores do efeito estufa na atmosfera. Em decorrência dessas adversidades, desenvolve-se um mercado cada vez maior de combustíveis derivados de biomassa, para uso em motores de combustão interna, capazes de substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis de origem fóssil (Suhaimi et al., 2012).

O Brasil é o produtor de etanol mais competitivo do mundo, com um mercado doméstico bem desenvolvido, cada vez mais estimulado pelo crescimento das vendas de carros “flex-fuel”, que podem usar qualquer mistura de gasolina e etanol (Ibeto et al., 2011). A produção de etanol tem sido apoiada pelo desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar, clima favorável, solos férteis e tecnologias agrícolas (Leite et al., 2009). O PIB do setor sucroenergético gerou mais de 113 bilhões em 2015, ocupando assim um lugar de destaque na economia brasileira (UNICA, 2016).

Estudos realizados pelo Ministério de Minas e Energia mostram que a demanda pelo etanol no Brasil para o ano de 2020 é de 73,3 bilhões de litros (Brasil, 2011). O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar no Brasil é altamente competitivo quando comparado com os processos de produção de outras culturas como exemplo, o milho e beterraba açucareira, pois apresenta a maior porcentagem de redução de emissões de gases de efeito estufa, o maior balanço energético e rendimentos por hectare e menores custos de produção (Garoma et al., 2012).

O processo de produção de etanol ocorre pela via fermentativa. Na fermentação alcoólica as leveduras convertem açúcares a álcool e CO<sub>2</sub>. Em escala industrial a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido a mais utilizada. A principal característica que distingue o processo produtivo brasileiro de outros bioprocessos em todo o mundo é a reciclagem de células da levedura. Essa característica faz com que as células de leveduras sejam constantemente submetidas a condições estressantes, como altas temperaturas, altas concentrações de etanol, pH baixo, compostos inibitórios de melaço, metabólitos produzidos por micro-organismos adversos ao

processo, excesso de sais, deficiência mineral e outros (Basso et al., 2008). Tais adversidades comprometem o desempenho do processo fermentativo, pois o mesmo está sujeito a contaminação por bactérias, leveduras selvagens- por espécies de *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces*- devido às dificuldades na esterilização dos grandes volumes de caldo de cana de açúcar, melaço e água (Lima, Marcondes, et al., 2002).

Nesse contexto, uma levedura selvagem é definida como qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela selecionada para a condução da produção de álcool, que atuam prejudicando a fermentação, causando problemas operacionais e aumentando o tempo de fermentação (Gallo, et al., 2010). Portanto, tais leveduras podem competir pelo substrato com linhagens de leveduras selecionadas para a condução do processo fermentativo, causando sérias dificuldades operacionais, desestabilizando o processo e comprometendo o rendimento da fermentação. As espécies de leveduras selvagens são as mais difíceis de controlar porque o seu metabolismo é muito semelhante ao das cepas de leveduras industriais, mas possuem características inadequadas, tais como floculação celular, produção excessiva de espuma, baixo rendimento de fermentação e fermentação incompleta do açúcar (Basso et al. 2008).

Embora muito conhecimento tenha sido adquirido em aspectos científicos e tecnológicos sobre o processo de produção de etanol no Brasil, há muito o que conhecer a respeito dos micro-organismos contaminantes, pois estes, desenvolvem diferentes estratégias de sobrevivência e competição para manterem-se em dornas de fermentação de etanol comprometendo o rendimento do processo fermentativo.

Tais conhecimentos estão diretamente relacionados e são importantes para as abordagens que envolvem o processo de seleção de novas linhagens de leveduras. Pois, a partir de metodologias como a cariotipagem do DNA nuclear e análise do DNA mitocondrial entre outras, está sendo possível o monitoramento e melhor compreensão da dinâmica das linhagens de leveduras, revelando assim, linhagens mais produtivas, o que tem permitido a criação de bancos de perfis genéticos de *S. cerevisiae* selecionadas para a utilização durante a safra em curso ou como “starter” em safras seguintes na cadeia produtiva de destilarias brasileiras (Amorim et al., 2015).



Neste contexto, a proposta deste trabalho consiste no isolamento e quantificação a nível populacional dos micro-organismos contaminantes do processo de produção de etanol em usinas sucroalcooleiras. Seguindo-se da caracterização fisiológica e a identificação taxonômica de linhagens de leveduras isoladas de processos produtivos industriais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A produção de etanol no Brasil

O contexto dos estudos acerca da obtenção de biocombustíveis no Brasil começou a partir de testes pioneiros realizados entre os anos de 1905 e 1925, com a produção de álcool combustível. Em 1931, o governo brasileiro estabeleceu um decreto que obriga a mistura de 5% de álcool na gasolina importada pelo país, e sete anos depois, o decreto nº 737 estende a obrigatoriedade da mistura de 5% de álcool também à gasolina produzida internamente no país. Na década de 60, a descoberta de extensas reservas petrolíferas no Oriente Médio diminui um possível interesse mundial por biocombustíveis. Porém com a primeira crise mundial do petróleo, em 1973, a procura por novas fontes de energia ressurgiu e o governo brasileiro passou a buscar formas alternativas para reduzir a dependência do país ao combustível fóssil e amenizar os efeitos do choque na economia brasileira (Brasil, 2007).

Nesse contexto, em 1973, o preço do petróleo havia saltado de US\$2,91 para US\$12,45 por barril, um aumento de 428%, incentivando o governo brasileiro a tomar uma decisão (Barros et al, 2007).

Em 1975, o Brasil lançou o Programa Nacional do Álcool – Proálcool, o maior programa comercial de uso de biomassa para fins energéticos do mundo, visando ao desenvolvimento das técnicas e aperfeiçoamento dos insumos para a produção de álcool etílico. Na primeira etapa, de 1975 a 1979, os esforços concentraram-se na produção de álcool etílico anidro para ser acrescentado à gasolina. Com o segundo choque do petróleo em 1979, o programa foi ampliado, visando nessa fase a produção de álcool como combustível substituto à gasolina, sendo priorizada a produção de álcool hidratado.

A partir de 1982, o governo investiu no sentido de aumentar as vendas de veículos a álcool. Desse modo foram criados estímulos aos compradores, com maior prazo de financiamento e taxas mais amenas de juros, porém, apesar do sucesso técnico do Proálcool, houve muitas críticas à sua implantação. Tais críticas baseavam-se no fato de que as áreas de cultivo de cana-de-açúcar aumentaram consideravelmente, enquanto que as áreas de cultivo de alimentos se mantiveram inalteradas. Além disso, a sazonalidade, na época, foi também um grande contribuinte negativo a continuidade do projeto. Acredita-se que o pleno sucesso do Proálcool teria

sido alcançado se fosse compatível com uma política energética nacional isenta de influências externas que tinham no petróleo a melhor matéria-prima para produção de combustível; uma política agrária, uma política agrícola e em contrapartida um preço elevado do barril de petróleo (Santin, 2006). Na década de 90 o programa continuava em letargia, decorrente da queda e estabilização do preço do petróleo e alta do preço do açúcar no mercado internacional, e também da retirada dos financiamentos e subsídios por parte do governo que enfrentava sérios problemas fiscais e financeiros (Fracaro, 2005).

Em 2003, o programa Proálcool ressurgiu com força, amparado pelo lançamento dos veículos “flex-fuel”, a alta do preço do petróleo e do aumento da demanda externa oriunda da conscientização ambiental, especialmente do Protocolo de Kyoto, acordo internacional que preconiza a redução das emissões de gases do efeito estufa emitidos pelos países industrializados visando um modelo de desenvolvimento limpo aos países em desenvolvimento (Godoy et al, 2005). Haja vista que o uso de petróleo representa 37% do consumo da energia mundial (Kundiyan et al, 2006).

O impacto ambiental do consumo acentuado de combustíveis fósseis tornou-se uma grande preocupação para a sociedade moderna, sendo estes responsáveis por uma parcela significativa da emissão dos principais gases que contribuem para o aquecimento global (IPCC, 2007). Desse modo, a substituição gradual do petróleo por fontes de energia alternativas oriundas de biomassas renováveis em especial para os biocombustíveis, como o etanol, é vista como um importante contribuinte para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz (Ragauskas et al., 2006).

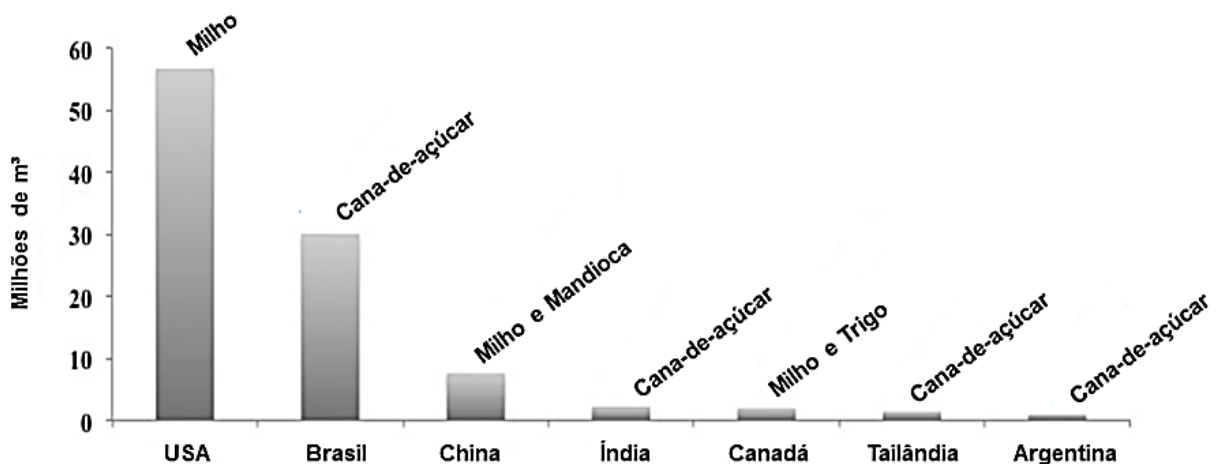
Biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir da biomassa (matéria orgânica), isto é, de fontes renováveis – produtos vegetais ou compostos de origem animal como o biodiesel. As fontes mais conhecidas no mundo são a cana-de-açúcar, milho, soja, semente de girassol, madeira e celulose. A partir destas fontes é possível produzir biocombustíveis, como álcool, etanol e biodiesel (Brasil, 2007).

O etanol ou álcool etílico é um composto orgânico oxigenado, cuja fórmula química é  $C_2H_5OH$ . A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar representa uma importante tecnologia em larga escala capaz de produzir combustível eficiente e viável economicamente, fornecendo substitutos viáveis à gasolina (Amorim et al 2011). O

uso de etanol reduz os níveis de monóxido de carbono e as emissões de dióxido de carbono em relação aos combustíveis fósseis e foi classificado pela Agência Ambiental dos EUA como um biocombustível avançado, uma vez que reduz as emissões de gases de efeito estufa até 61% quando comparado com a gasolina. (Bergman et al., 2017).

## 2.2. Cana-de-açúcar: a matéria-prima para a produção de etanol.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de etanol sendo uma primeira fonte de energia renovável e responde por 18% da matriz energética nacional (Empresa de Pesquisa Energética-EPE, 2015). Apesar da maior produção de etanol a partir de amido derivado do milho nos EUA, o etanol produzido a partir da cana apresenta maior energia líquida e balanço de gases (Cerqueira et al., 2009). A cana-de-açúcar apresenta uma produtividade de biomassa muito alta de 80 a 120 ton/ha/ano, com uma produção industrial de etanol de 8.000 litros/ha, comparado a 3.000 litros/ha de milho. Assim, a cultura da cana-de-açúcar atraiu o interesse global como matéria-prima em diferentes países (Bergmann et al., 2017) (Figura 1).

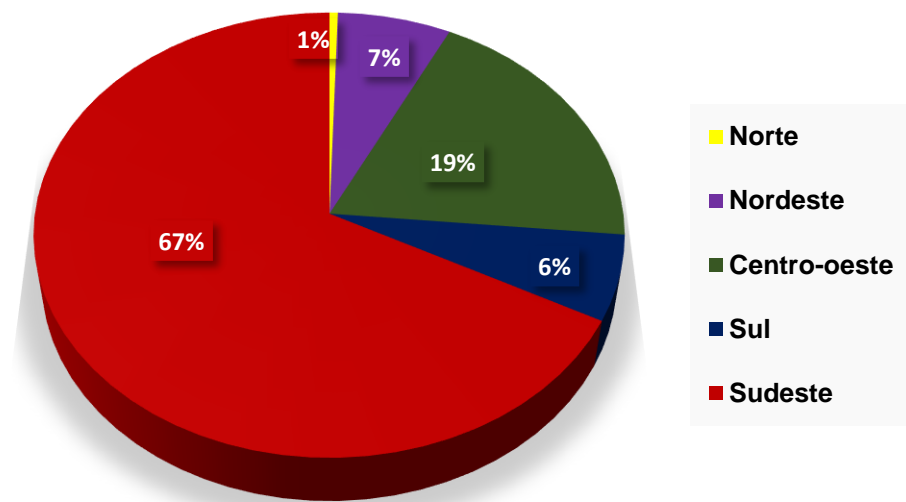


**Figura 2.** Matérias-primas exploradas para a produção de etanol (Bergmann et al., 2017).

A cana-de-açúcar é uma gramínea, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família *Poaceae* das angiospermas, é mais cultivada nas regiões tropicais e

subtropicais do globo terrestre devido às condições de solo e clima. Sua exploração apresenta também uma contribuição socioeconômica para o país, que se mantém em destaque na exploração dessa *commodity*, em consequência da propriedade que essa planta apresenta de sintetizar e armazenar significativa quantidade de sacarose em seus tecidos de reserva. Enquanto as plantas em geral convertem menos de 1% da luz solar em energia química, a cana-de-açúcar é capaz de converter cerca de 2% da radiação incidente em açúcares (Nogueira; Venturini-Filho, 2005).

A área a ser colhida com cana-de-açúcar e destinada à atividade sucroalcooleira para a safra 2016/2017 está estimada em 9,1 milhões de hectares, e a produção de 694,5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar o que significa um aumento de 4,4% na quantidade de cana a ser moída em relação à safra anterior, com uma estimativa de produção de 39,8 milhões de toneladas de açúcar e 27,9 bilhões de litros de etanol. O aumento da produção de cana-de-açúcar resultou da expansão das áreas cultivadas para regiões sul e médio-oeste, entretanto a região Sudeste responde por 67% da produção nacional (CONAB, 2016) (Figura 2).



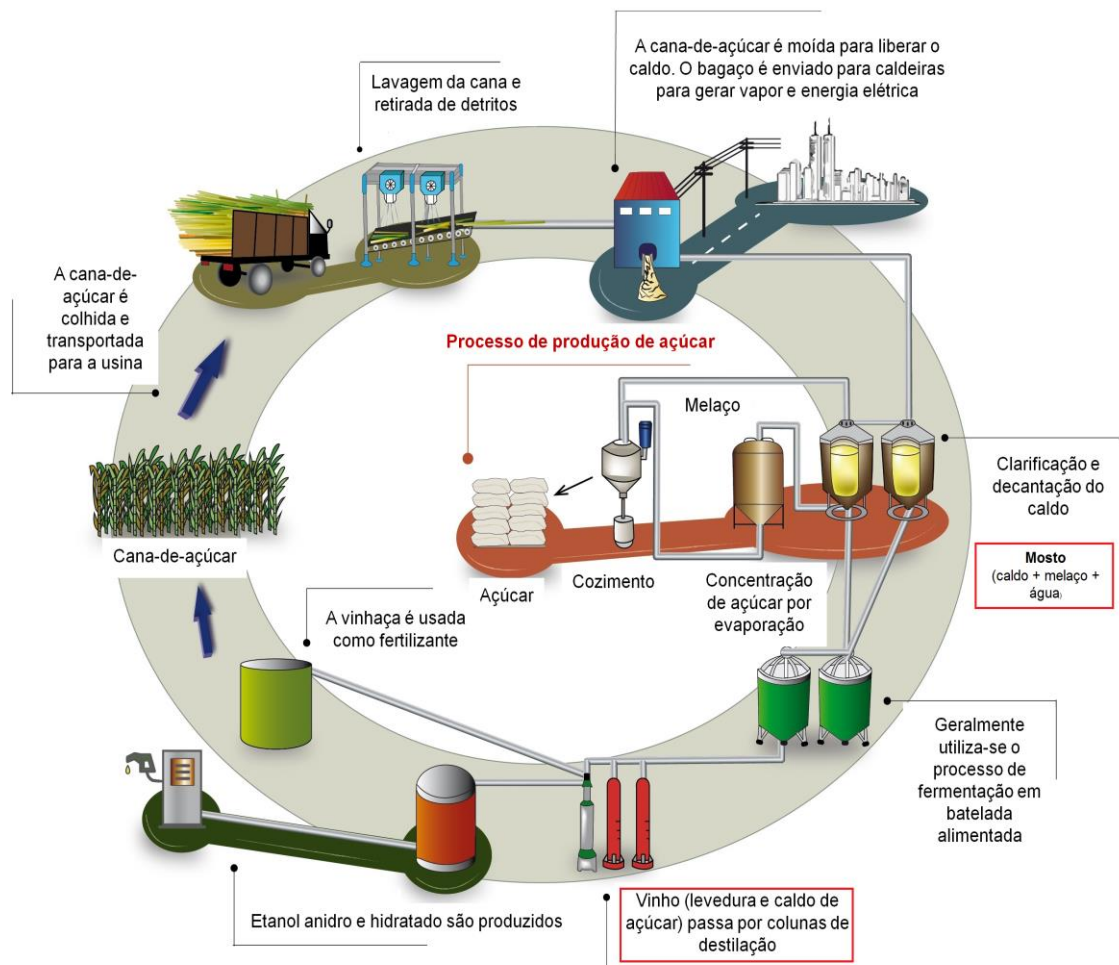
**Figura 2.** Produção de cana-de-açúcar por região. Adaptado de (CONAB, 2016).

A cana-de-açúcar é uma planta semi-perene que requer rotação de diferentes tipos de culturas para manter a estabilidade do solo que é normalmente empregada a cada cinco ou oito anos. Entre ciclos, as leguminosas são plantadas com a finalidade de reciclagem de nutrientes e adição de nitrogênio por fixação biológica no solo. A cana-

de-açúcar é geralmente colhida a cada dois anos a partir do mesmo canavial. A maior parte da colheita é feita mecanicamente hoje em dia devido a investimentos do setor e legislação que proíbe a queima de palha (CGEE, 2008).

### 2.3. Produção de etanol a partir de cana-de-açúcar

A partir da colheita até a produção de etanol, a cana-de-açúcar passa por diferentes processos, químicos e físicos, que permitem a sua degradação, extração do caldo e fermentação por microrganismos (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema representativo do processo de produção de etanol (Bergmann et al., 2017). Destaque para o mosto e vinho (vermelho).

Inicialmente, após a colheita da safra, a cana é transportada o mais rápido possível para a usina, a fim de evitar degradação da matéria orgânica (BNDES; CGEE, 2008). Ao chegar na indústria, esta é quantificada, e aleatoriamente separada para

determinação da qualidade por meio de ensaios laboratoriais. Antes de seguir para o sistema de preparo e extração, a cana passa por um processo de limpeza, para remoção de impurezas (Machado et al, 2013). A extração do caldo se realiza sob pressão de rolos, montados em conjuntos, denominado, ternos de moenda, então, o caldo, que contém a sacarose, é separado da fibra (bagaço). Parte do bagaço é direcionado à alimentação caldeiras para ser empregado como combustível, já que ao ser queimado, seu calor promove a produção de vapor nas caldeiras, movimentando as turbinas dos geradores de energia. A energia produzida é aproveitada nos geradores para operar as máquinas utilizadas na usina e o excedente é vendido para as empresas distribuidoras de energia elétrica (JBIC, 2006).

Após a extração, o caldo passa por tratamento para a retirada de impurezas é peneirado e segue para a etapa de clarificação, a qual, utiliza compostos químicos como sulfato (gás sulfúrico) e calagem, o pH é corrigido para 6,8 a 7,2, durante esta etapa o caldo é aquecido a temperatura entre 102°-105°C, com a finalidade de redução de micro-organismos contaminantes. A temperatura limite de 105°C é adotada, pois quando ultrapassada, existe a possibilidade das ceras presentes no caldo emulsificarem-se tornando difícil sua separação. O processo de clarificação gera um lodo que é utilizado como fertilizante nas lavouras de cana-de-açúcar. O restante das impurezas é removido na etapa de decantação, para a obtenção de um caldo mais limpo, com menos resíduos nas colunas de destilação. O tempo em que caldo permanece no decantador varia de 15 min a 4 horas, e é em função do tipo de equipamento e da carga de impurezas a remover (Chieppe, 2012) e (CGEE, 2008)

O caldo decantado pode ser enviado para o processamento de açúcar as altas temperaturas, usadas para concentrar o caldo por evaporação e para cristalizar a sacarose. Após a produção de açúcar, a solução de açúcar residual é denominada melaço (ou mel), que contém altas quantidades de glicose (5 a 20%) e sacarose (45 a 60%). Em destilarias de cana-de-açúcar anexas, o melaço pode ser misturado ao caldo de cana dando origem ao mosto, suspensão açucarada que alimenta a dorna de fermentação (CGEE, 2008).

Para a produção do etanol concentração de açúcar no mosto é em função da produção de etanol pretendida e da concentração do inóculo. Usualmente o mosto apresenta concentração de 18 a 22% de açúcares. Nas fases preliminares de preparo de inóculo são utilizadas concentrações mais baixas de açúcar, que favorecem o

crescimento da levedura e reduzem o efeito da inibição pelo substrato (Machado, 2013, ROZA, 2008 e BNDES; CGEE, 2008).

Antes de ser adicionado às dornas, o mosto é resfriado a uma temperatura entre 28 e 32°C, tornando o meio adequado para o processo fermentativo. Posteriormente, este segue para as dornas de fermentação, onde leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são adicionadas e toda a mistura fermenta por um período de 8 a 12 horas, dando origem ao vinho. Esta solução apresenta um teor alcoólico de 7-11% (v/v) e níveis de açúcares residuais abaixo de 0,1% (Costa et al., 2001; Rogers, 2005) e (BNDES e CGEE, 2008).

O vinho é centrifugado para a separação da levedura. O vinho então é enviado para as colunas de destilação, enquanto as células de leveduras concentradas (suspensão viscosa) recebem um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0-2,5) com finalidade de redução da contaminação bacteriana. Após 2 a 3 horas, as células de leveduras retornam aos tanques de fermentação para iniciar um novo ciclo. O vinho passa para a etapa de destilação, onde o bioetanol é recuperado inicialmente na forma hidratada, com aproximadamente 96°GL (porcentagem em volume), correspondentes a cerca de 6% de água em peso, deixando a vinhaça ou vinhoto como resíduo, normalmente numa proporção de 10 a 13 litros por litro de etanol hidratado produzido (Wheals et al.; 1999, Amorim et al.; 2010) e (BNDES; CGEE, 2008).

Como exemplo de uma usina que produz tanto açúcar como álcool (usina de açúcar com destilaria anexa), para cada tonelada de cana processada podem ser produzidos 100 a 150 kg de açúcar e 70 a 90L de etanol, gerando 300 kg de bagaço, 980 L de vinhoto, dentre outros resíduos. O etanol hidratado pode ser estocado como produto final ou pode ser enviado para a coluna de desidratação com adição de ciclohexano para a produção de bioetanol anidro, com aproximadamente 99,7°GL ou 0,4% de água em peso (Nandy et al., 2002) e (BNDES e CGEE, 2008).

## 2.4. Fermentação etanólica

### 2.4.1. A levedura

As leveduras constituem um grupo de organismos eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi. São encontradas no solo, nas superfícies de vegetais, principalmente



em flores e frutos, no trato intestinal de animais, e em líquidos açucarados (Steckelberg, 2001). Possuem a forma esférica, ovoide, globosas ou alongadas. Apresentam de 1 a 8  $\mu\text{m}$  de largura e 3 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento, variando de acordo com idade e ambiente. As leveduras constituem o grupo mais importante de micro-organismos comercialmente explorados e empregados na obtenção de etanol, especialmente em função da capacidade fermentativa.

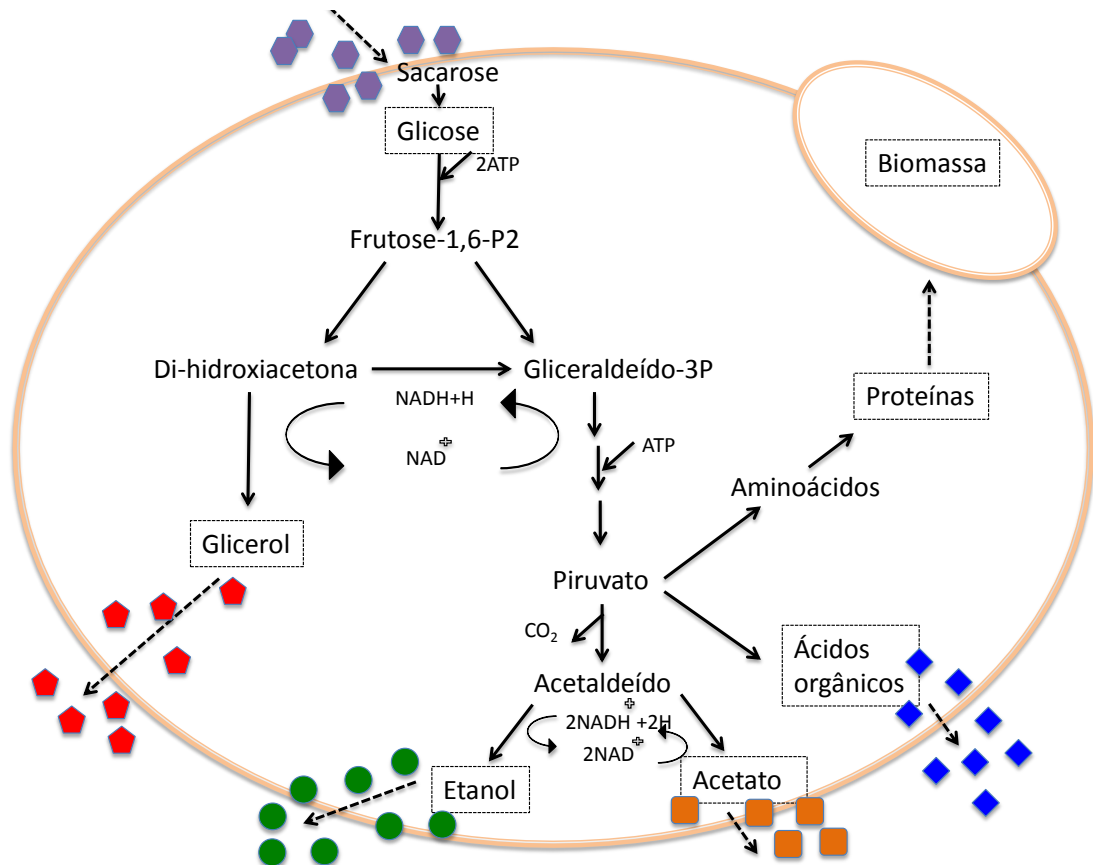
As leveduras pertencem ao domínio Eukaryota, reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família *Saccharomycetaceae* (Alcarde et al., 2007), sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada na produção de etanol (BAI et al, 2008) (Alcarde et al., 2007). Caracteriza-se por ser um micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, apresenta capacidade de desenvolver metabolismo aeróbio oxidativo, ou fermentativo dependendo das condições de aerobiose ou de anaerobiose (Ravaneli, 2010).

#### 2.4.2. A conversão dos açúcares

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico, no qual os micro-organismos como a *Saccharomyces cerevisiae* transformam os açúcares em etanol e  $\text{CO}_2$  como produtos principais, além de glicerol, ácido succínico, ácidos voláteis e ésteres, como metabólitos secundários (Amorim et al.; 2005). Em condições aeróbias e em baixa concentração de glicose, a levedura metaboliza os carboidratos para produção de ATP e biomassa. Neste processo uma molécula de glicose produz cerca de 38 ATPs e 47 g de biomassa. Sob condições anaeróbias, e em elevadas concentrações de açúcares no mosto, a levedura metaboliza a molécula de glicose, até a formação de etanol e  $\text{CO}_2$ , havendo produção de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose e baixa produção de biomassa (Venturini et al., 2013).

A formação do etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ocorre no citoplasma da levedura pela via glicolítica, nesta via, a hexose (glicose) é oxidada a gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxicetona fosfato, o gliceraldeído é convertido a piruvato que é, então, descarboxilado a acetaldeído, e reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase pelo uso de NADH e as duas moléculas de  $\text{NAD}^+$  formadas são utilizadas na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo assim, o equilíbrio redox na célula (Ferrari, 2013) (Figura 4).

Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* sejam desviados para gerar produtos secundários da fermentação como o glicerol, sendo que os restantes 95% resultam em etanol (Walker, 1998).



**Figura 4.** Formação de produtos da fermentação alcoólica.

#### 2.4.3. Fatores que afetam a fermentação alcoólica

O processo de produção de etanol combustível fornece um ambiente que está longe da condição fisiológica ideal para levedura de *Saccharomyces cerevisiae*. Vários fatores de estresse se alternam durante o processo fermentativo comprometendo as condições para produção do etanol, tais como : altas concentrações de açúcar e etanol, temperaturas elevadas, variações de pH e presença de compostos tóxicos (Oliva-Neto et al., 2015).

A concentração de açúcar do mosto deve ser adequada à concentração do inóculo (leveduras), para que não haja falta de células para consumir o substrato oferecido. Elevando muito a concentração de açúcares no meio pode comprometer a

viabilidade das células favorecendo o desenvolvimento de contaminantes com formação de subprodutos e resultar em fermentações lentas e incompletas, e como consequência, menores rendimentos alcoólicos (Angelis et al, 1992).

Concentração de etanol pode ser intensificado pela alta temperatura e acidez do meio causado pela variação de pH e todos esses fatores estressantes são impostos simultânea ou sequencialmente para as leveduras (Dorta, 2006). A entrada dos íons nas células, alteram a formação e manutenção da força motriz com subsequente diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana, o etanol pode inibir o crescimento e causar inativação enzimática, levando a uma diminuição da viabilidade celular (Basso et al., 2011). A tolerância ao etanol é um fenótipo complexo, sendo que mais de 250 genes parecem estar envolvidos com essa característica (Lima et al., 2001).

Temperatura elevadas: as leveduras são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35° C. Entretanto, a temperatura nas destilarias pode alcançar 38° C, faixa na qual o crescimento e desenvolvimento são ideais. É nesta faixa que a enzima invertase presente na levedura, atua na reação de hidrólise da sacarose liberando glicose e frutose, atingindo estabilidade (Shankar et al., 2014). Processos produtivos realizados em altas temperaturas, podem provocar desordens na membrana, desnaturação de proteínas, aumento no armazenamento de trealose, inibição da glicólise, resultando em mutação ou até mesmo na morte da levedura (Lima et al, 2001).

Variação de pH: um fator importante para a produção de etanol é o pH do mosto, que geralmente se encontra na faixa de 4,5 a 5,5, pois este influencia no crescimento da levedura selecionada para conduzir o processo fermentativo. Porém, o tratamento com ácido sulfúrico na levedura é uma etapa importante do processo. Este tratamento é realizado com o objetivo de reduzir a contaminação bacteriana, e é feito com pH na faixa de 2,0, podendo assim comprometer a viabilidade celular da levedura (Oliva-Neto, 2013).

Presença de compostos tóxicos: O efeito antagonista dos ácidos orgânicos assim e da síntese de subprodutos em excesso no metabolismo da levedura *S. cerevisiae* são problemas que comprometem a fermentação alcoólica, e estão relacionados à presença de micro-organismos contaminantes. (Amorim et al.,2011).

Os ácidos: acético, succínico e ácido láctico, apresentam propriedades inibitórias interferindo nas funções de manutenção química das células de levedura.

O ácido láctico se destaca devido à contaminação por bactérias lácticas que são muito frequentes nesse tipo de processo industrial, este é um composto orgânico de fórmula estrutural  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-COOH}$ . Apresenta alto valor comercial devido a sua ampla aplicabilidade na indústria química, pois é empregado na produção de plástico biodegradável. Sua produção pode ser realizada por síntese química ou bioconversão por fermentação (Oliva-NETO,2013).

O ácido acético é o principal ácido orgânico volátil cuja a fórmula estrutural é  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ , é produzido durante a fermentação alcoólica, sendo que o mesmo é produzido tanto pela levedura como por bactérias contaminantes, podendo ocorrer em concentrações suficientes para causar efeitos tóxicos à levedura *Saccharomyces*. Tais efeitos se traduzem por redução do crescimento da levedura e inibição da fermentação (Whiting et al., 1994). O ácido succínico é um ácido orgânico dicarboxílico que participa do metabolismo energético celular, sua produção é realizada também por bactérias e leveduras, sua ação sinérgica com o etanol tem atividade antibacteriana.

O glicerol é um dos principais subprodutos obtidos durante a fermentação industrial do etanol. Aproximadamente 4 a 8% de substrato são convertidos neste composto, o que corresponde de 0,08 a 0,15g por g de etanol e está envolvido no metabolismo da levedura *S. cerevisiae* de diferentes formas. Ele pode ser utilizado como única fonte de carbono sob condições aeróbias e pode tratar-se, por outro lado, de um subproduto quando a glicose ou outros açúcares facilmente fermentescíveis são convertidos a etanol (Nevoigt et al., 1997) e (Gombert e van Maris, 2015)

Desta forma, uma redução na quantidade de glicerol produzida durante a fermentação pode afetar positivamente o rendimento de etanol. Estratégias como a seleção de estirpes que produzam baixa quantidade de glicerol podem aumentar a produção de etanol (Basso et al., 2015).

#### 2.4.4. Micro-organismos contaminantes do processo de produção de etanol

Os processos fermentativos de produção de etanol podem apresentar, altos níveis de contaminação por micro-organismos, sejam eles bactérias, leveduras ou fungos (Oliva-Neto et al, 1994). Em alguns casos a contaminação pode chegar a  $10^8$

células/mL, produzindo perdas de 10.000 a 30.000 litros de etanol por dia em destilarias que produzem milhões de litros (Amorim et al, 2011). Os principais gêneros de bactérias contaminantes no processo produtivo são *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, estes últimos, sendo menos comum devido a menor resistência ao teor alcoólico do vinho (Oliva-Neto et al, 2013).

Espécies de *Saccharomyces* selvagens são as leveduras contaminantes mais abundantes no processo de fermentação, competindo com as linhagens industriais. No entanto, outras espécies de leveduras contaminantes não-*Saccharomyces* se destacam, por causarem sérios problemas para as fermentações, pertencem aos gêneros *Dekkera*, *Candida* e *Schizosaccharomyces* (Amorim et al., 2004). Uma estratégia pode envolver o desenvolvimento de um fungicida que elimine a levedura contaminante do processo fermentativo, em que preserve as células de leveduras *S. cerevisiae*, o uso de Polihexametilbiguanida (PHMB) revelou em estudos de laboratório a inibição da proliferação de leveduras contaminantes em destilarias da região Nordeste (Morais et al,2008).

Liberal et al. (2007) ao estudar os micro-organismos contaminantes na cadeia produtiva de etanol, isolaram em meio WLN 0,1% de bromocresol verde, colônias de leveduras de amostras de mosto e vinho de usinas de produção de álcool da região Nordeste do Brasil e identificaram a partir de sequenciamento da região D1-D2, do gene 28S do rDNA, concluíram que as principais leveduras contaminantes, classificadas como não-*Saccharomyces*, foram do gênero *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* e *Candida*. Segundo os autores *Dekkera* é um gênero comum de leveduras contaminantes, causando uma redução significativa do rendimento de fermentação em destilarias que não aqueça o caldo de cana-de-açúcar e trabalha com concentrações de etanol muito baixas no vinho.

Em estudo realizado com o objetivo de identificar a diversidade de leveduras selvagens em processo de fermentação para a produção de vinho na região Sul do Brasil, a partir da amplificação da região D1/D2 do 28S rDNA, sequenciamento e análises de bioinformática foi identificado as seguintes espécies de leveduras: *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila*, *Candida pyralidae*, *Toruslaspora delbrueckii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranifaciens* e *Saccharomyces cerevisiae* (Guimarães, 2016).

## 2.5. Identificação de micro-organismos contaminantes na produção de etanol

Os estudos de diversidade de micro-organismos contaminantes em processos produtivos de etanol tem sido realizado a partir de métodos moleculares, como a Metagenômica, esta técnica tem sendo gradativamente utilizada, pois independe do isolamento e cultivo dos micro-organismos para o estudo do perfil de comunidades microbianas, esta técnica compreende a análise do genoma coletivo da microbiota total encontrada em um determinado habitat, proporcionando informações sobre a capacidade metabólica e funcional da comunidade microbiana (Jurkowski & Handelsman, 2007). A identificação de tais micro-organismos também pode ser realizada a partir de técnica dependente de cultivo, com plaqueamento e isolamento em meios diferenciais. Os meios de culturas mais recomendados são PCA (Plate Count Agar) no qual cresce um largo espectro de bactérias e MRS (Man, Rogosa e Sharpe), ideal para bactérias lácticas e para o plaqueamento e isolamento de leveduras totais o meio WLN (WL Nutrient Medium) e YPD – Yeast extract peptone – dextrose, são os mais indicados (Vieira e Fernandes, 2012) e (Antonini et al., 2004).

Neste contexto, a partir do cultivo, isolamento e extração de DNA do micro-organismo com o uso de protocolos específicos para esta finalidade, a reação em cadeia de polimerase-PCR, é uma ferramenta importante na etapa de identificação e caracterização de organismos, envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A tecnologia de PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicados no estudo de DNA inteiro ou fragmentado, tal como o rDNA.

As sequências do DNA que codificam RNA ribossômico apresentam regiões altamente conservadas e outras variáveis permitindo análise de diferentes níveis taxonômicos. Essas sequências apresentam-se como um agrupamento gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Esses genes são separados por regiões denominadas sequências internas transcritas, ITS1 e ITS2 e são processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. A região 18S é mais conservada sendo utilizada para comparação de organismos distantemente relacionados. A região 28S é mais variável apropriada para comparação de gênero e espécies (Fungaro et al, 2000).

Para a identificação de leveduras, a região D1D2, presente no gene que codifica o RNA ribossomal 28S, já era utilizada antes do reconhecimento da região

ITS como melhor opção para a identificação de fungos em geral (Figura 5) (Schoch et al., 2012).

A utilização de técnicas dependentes de cultivo para o estudo dos contaminantes do processo de produção de etanol tem o poder de demonstrar que tipos de contaminantes estão presentes em cada etapa do processo. O conhecimento da comunidade microbiana contaminante pode proporcionar a possibilidade de um melhor controle do processo de produção.



**Figura 5.** Representação esquemática das regiões do RNA ribossômico utilizadas para a identificação de leveduras. São demonstrados a região espaçadora transcrita interna (ITS) dos domínios D1-D2 da região do gene 28S e os locais de anelamento dos pares de *primers* NL1/NL4. Adaptado de (Costa,2014)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Caracterizar linhagens de micro-organismos isolados a partir das etapas de mosto e vinho do processo de produção de etanol utilizando técnica dependente de cultivo.

#### 3.2. Objetivos específicos

- ✓ Realizar contagem populacional de micro-organismos;
- ✓ Isolar micro-organismos das etapas de mosto e vinho do processo de produção de etanol;
- ✓ Quantificar os metabólitos produzidos em micro-organismos isolados de processos industriais de produção de etanol;
- ✓ Identificar leveduras por técnicas moleculares;
- ✓ Analisar filogeneticamente as sequências obtidas;
- ✓ Comparar os resultados do sequenciamento avaliando a diversidade microbiana existente nas duas unidades estudadas.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Soluções e meios de cultura

#### 4.1.1. Meio TSB (Caldo soja Trypticaseína)

Peptona de caseína	17 g/L
Peptona de soja	3 g/L
Glicose	2,5 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L
Fosfato dipotássico	2,5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Ágar	15 g/L

pH ajustado para 7,3.

(Vieira e Fernandes, 2012)

#### 4.1.2. Meio YPD (YEPD Broth)

Peptona	20 g/L
Extrato de levedura	10 g/L
Glicose	20 g/L
Ágar	15 g/L

pH ajustado para 6,5.

(Vieira e Fernandes, 2012)

#### 4.1.3. Meio MRS (De Man Rogosa Sharp)

Peptona animal	10 g/L
Extrato de carne	8 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Glicose	20 g/L
Tween 80	1mL

$K_2HPO_4$	2 g/L
$CH_3COONa$	5 g/L
$C_6H_{14}O_7N_2$	2 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/L
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g/L
Ágar	15 g/L

pH ajustado para 5,4.

(Vieira e Fernandes, 2012)

#### 4.1.4. M9 - Meio de cultura mínimo

$H_2HPO_4$	17 g/L
$KH_2PO_4$	5 g/L
$(NHA_4)_2SO_4$	2,5 g/L
$(NHA_4) Cl$	1 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20%	1mL
Citrato de Sódio	1 g/L
Solução de elementos traços	2mL
Extrato de levedura	4 g/L
Glicose	20 g/L

(Vieira e Fernandes, 2012)

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos.

#### 4.1.5. Solução salina 0,85%

Cloreto de sódio (NaCl)	85 g
Água destilada	1000 ml

#### 4.1.6. Antibiótico Clorafenicol

O clorafenicol foi ressuspenso em etanol 70% na concentração de 50 mg/mL e esterilizado em filtro de porosidade 0,22 µm. As soluções estoques foram mantidas em freezer -20°C e protegidas da luz. Este antibiótico foi adicionado ao meio de cultura para semeadura de células.

#### 4.1.7. Antimicótico Cicloheximida

A cicloheximida foi ressuspenso em água destilada na concentração de 10 mg/mL e esterilizada em filtro de porosidade 0,22 µm. As soluções estoques foram mantidas em freezer -20°C e protegidas da luz. Este antimicótico foi adicionado ao meio de cultura para semeadura de células.

#### 4.1.8. Fase móvel e Acetonitrila 10% para análise em HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência)

Fase móvel

Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,005M

Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,544 mL

Ajustar volume para 2 L com água Milli-Q

Acetonitrila 10%: 1L

Acetonitrila 100 mL

Água Milli-Q 900 mL

#### 4.2. Coleta de amostras

Para a análise da microbiota cultivável, os micro-organismos foram isolados de amostras oriundas de duas unidades industriais de produção de etanol, Usina Itumbiara (Latitude 18.516.716; Longitude 49.361.170) e Usina Tropical (Latitude 17.686.489; Longitude 50.114.384), ambas localizadas no estado de Goiás. Foram

realizadas 16 coletas, durante a Safra 2015, quinzenalmente, nos meses de abril a dezembro. Foram coletados 250 ml de mosto (melaço, caldo e água) em etapa anterior à fermentação e 250 ml de vinho (mosto e creme de levedura) em etapa após a fermentação. No momento da coleta foram aferidos valores de temperatura e pH.

#### 4.3. Processamento das amostras

##### 4.3.1. Isolamento e contagem de micro-organismos

Para o isolamento e seleção de micro-organismos contaminantes foram utilizados três meios de cultura sólidos pré-selecionados: TSB com ciclohexamida 1 mg/L, para isolamento de bactérias, Man Rogosa e Sharpe (MRS) com ciclohexamida 1mg/L, para isolar bactérias lácticas, e YPD com clorafenicol 20 mg/L, para o cultivo de leveduras. Foi retirado 0,1 mL de cada amostra e misturado a 0,9 mL de solução salina de cloreto de sódio 0,85% e diluídas em série até  $10^7$ . Para cada tipo de meio de cultura foram utilizadas diferentes diluições para o plaqueamento: diluições de  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  para a seleção em meios TSB e MRS e diluições de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  para a seleção em meio YPD. De cada amostra, foi plaqueado 100µL nos três tipos de meios de cultura, em triplicata. As placas com meio de cultura TSB foram incubadas a 37 °C, as placas com meio MRS foram incubadas a 37°C e acondicionadas em jarras de anaerobiose e as placas com meio de cultura YPD foram incubadas a 28 °C. Todas as placas foram incubadas por 72 horas com verificação de crescimento diariamente. Após o período de crescimento das células, foi utilizado o contador de colônias automático Scan 1200 (Interscience), para realizar a contagem de micro-organismos. O resultado obtido foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

A partir de características morfológicas como cor, tamanho, forma e arranjo das células, foram selecionadas de três a oito colônias de cada tipo de amostra e em cada meio de cultura, com aparentes diferentes morfotipos. As colônias escolhidas foram cultivadas para a obtenção de cultura pura com a utilização da técnica de esgotamento. Após seleção e isolamento, as colônias foram crescidas em meio líquido, os mesmos meios utilizados no cultivo inicial, mas sem o uso de antibiótico e antifúngico e incubado sob agitação por 12 horas. Cada isolado foi identificado considerando o nome da usina de origem, tipo de amostra, mosto ou vinho, o número

do isolado, o meio em que foi cultivado e o número da coleta. Por exemplo: ITB-M-I1-TSB-1C - colônia 1 isolada (I1) a partir de amostras da usina Itumbiara (ITB), da fração mosto (M), selecionada após crescimento em meio TSB e proveniente da primeira coleta (1C). Após as linhagens selecionadas receberem identificação, foram armazenadas em freezer -80°C com glicerol 25%.

#### 4.4. Caracterização dos micro-organismos quanto a síntese de metabólitos por HPLC

##### 4.4.1. Ensaio fermentativo em pequena escala

Os micro-organismos isolados em meio YPD, TSB e MRS de amostras de mosto e vinho da primeira e última coleta das Usinas Itumbiara e Tropical (5 e 6) foram analisados quanto a sua capacidade de consumo do substrato e síntese de metabólitos. Para isso, os micro-organismos foram recuperados do estoque no freezer -80 °C e cultivados em meios de cultura sólidos, os mesmos meios utilizados no plaqueamento inicial. Após 48h de crescimento, as colônias foram transferidas para microplacas de 96 poços de 1,1 mL com 500 µL de meio líquido YPD para as linhagens de leveduras e meio M9 + glicose 20 g/L para as linhagens de bactérias, originalmente isoladas em meios TSB e MRS. As microplacas foram incubadas por um período de 48h em temperatura de 28 °C para as linhagens de leveduras e 37°C para as linhagens de bactérias, caracterizando assim o pré-inóculo. As linhagens microbianas foram transferidas para placas Deep well com 900 µL do mesmo meio de cultura utilizando-se um carimbo microbiológico e foram incubadas por 48h em estufas à 28 °C ou 37 °C. Após o crescimento, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4.000 x g. O sobrenadante foi coletado para análise dos compostos consumidos e formados. Todas as amostras analisadas encontravam-se numa faixa de pH entre 4,5 e 5,5. O crescimento celular foi determinado através da leitura em placas de 96 poços (ELISA) por OD600 em espectrofotômetro Spectramax 3 (Molecular Devices).

##### 4.4.2. Metabólitos de interesse

As amostras obtidas no ensaio fermentativo foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o objetivo de detectar o consumo de substrato

(glicose) e formação de metabólitos: glicerol, etanol e os ácidos orgânicos acético, láctico e succínico. Foi preparado uma solução padrão contendo concentrações determinadas destes metabólitos. Para determinação do tempo de retenção de cada ácido orgânico analisado, foram injetados padrões puros na concentração de 5 g/L. Os seis compostos utilizados na solução padrão, a concentração e o tempo de retenção de cada um deles estão descritas abaixo ((Tabela1).

**Tabela 1.** Padrões analisados com as respectivas concentrações e tempo de retenção.

Padrão	Concentração	Tempo de Retenção
Glicose	20 g/L	9,7 min
Ácido succínico	5 g/L	11,7 min
Ácido láctico	5 g/L	12,6 min
Glicerol	5 g/L	13.4 min
Ácido acético	5 g/L	15,1 min
Etanol	10 g/L	22,0 min

#### 4.5. Identificação das linhagens contaminantes

##### 4.5.1. Extração de DNA dos micro-organismos

Para a extração de DNA, as colônias de micro-organismos foram reativadas do estoque em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e cultivadas em meio de cultura sólido YPD. Após 48h de crescimento, as células foram inoculadas em tubos falcons contendo 5 ml de meio de cultura líquido YPD e incubadas por 24h, em temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ , sob agitação. 1 ml das culturas foram transferidos para tubos eppendorfs e centrifugados por 5 minutos a  $4.000 \times g$ . Para a extração de DNA utilizou-se as instruções do fabricante do Kit comercial Genra-Qiagen.

##### 4.5.2. Amplificação por PCR da região D1/D2

A amplificação do DNA das regiões D1/D2 do gene 28S do DNA ribossomal de leveduras foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os

*primers* NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'). A reação foi realizada em um termociclador com as seguintes condições: 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 1 minutos, 72 °C por 1 minutos e o último ciclo de 72 °C por 7 minutos. Para cada reação de 50 µL foram utilizados aproximadamente 50 ng de DNA total, 0,20 µM de cada primer, 0,20 mM de dNTP, 2U da enzima Taq Polimerase e 1X de tampão da enzima e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Para confirmar a amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% em tampão SB (Brody & Kern, 2004) 1X. Para análise do tamanho dos fragmentos foi utilizado o GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Em seguida, as reações foram purificadas seguindo o protocolo do Kit QIAGEN- PCR *Purification Kit*. Para a quantificação do DNA utilizou-se um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.5.3. Sequenciamento e análise dos dados

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 5 a 20 ng de DNA, 3,2 pmol de primer NL1 (*forward*) e primer NL4 (*reverse*) e 0,2 µM de água ultrapura, tendo um volume final de 7 µL. Em seguida as amostras foram enviadas para a empresa Eurofins Ltda, a qual, procedeu ao sequenciamento pelo método Sanger.

Na análise dos dados, foi utilizado o programa Serial Cloner 2.6.1. Por meio deste, foi montada a sequência consenso de cada amostra da leitura *forward* e *reverse* e analisadas no Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do GenBank do National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Para a construção da árvore filogenética as sequências foram analisadas utilizando os programas Bioedit para o alinhamento das sequências, foram utilizadas cinco sequências que não foram selecionadas na etapa de identificação taxonômica para o estudo com o melhor hit. O programa MEGA6 foi utilizado para a criação da árvore, com o método estatístico Neighbor- Joining, realizado, com teste de bootstrap contendo 1000 repetições (CADETE,2009).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento e contagem de micro-organismos

Com o objetivo de acompanhar a dinâmica populacional de microrganismos em usinas produtoras de etanol, amostras de mosto e vinho de duas usinas foram coletadas quinzenalmente na safra de 2015. A temperatura das amostras de mosto e vinho coletadas nas Usinas de Itumbiara (ITB) e Tropical (TRP) em Goiás foi praticamente constante ao longo do ano. Já o pH apresentou variação, sendo ligeiramente mais alto na TRP (Tabela 2). Posteriormente, as amostras foram processadas em laboratório e semeadas em meio de cultura YPD, TSB e MRS para isolamento de leveduras, bactérias e bactérias do ácido lático, respectivamente.

**Tabela 2.** Temperatura e pH das amostras recebidas das usinas de produção de etanol.

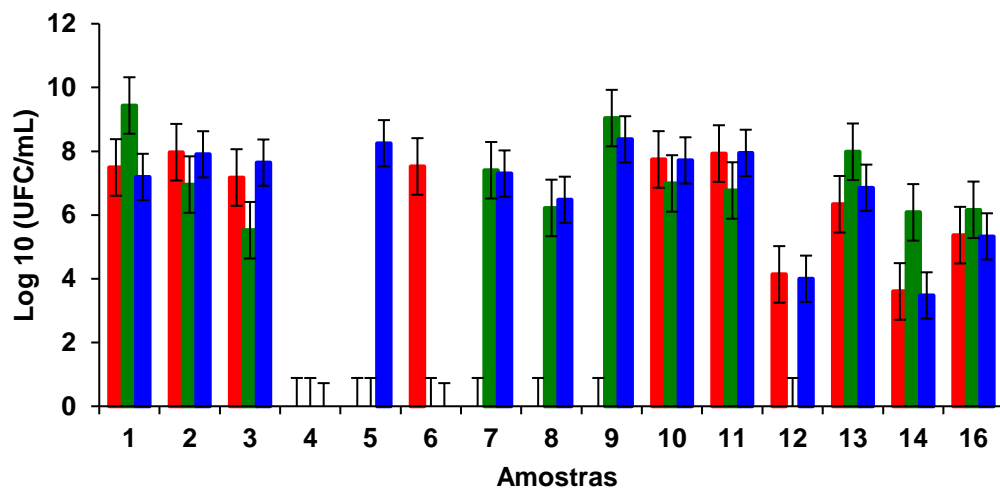
Usina	Amostra	Coleta	Temperatura T*A	pH
Itumbiara	Mosto	1-15	31	4,8
	Vinho	1-15	31	4,5
Tropical	Mosto	1-16	30	5,5
	Vinho	1-16	33	5,0

\*T.A: Temperatura ambiente

Após crescimento dos microrganismos em placas de Petri, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (ufc) e o isolamento de diferentes morfotipos em cada placa nos meios YPD, TSB e MRS. De forma geral, o número de (ufc) foi de 10 a 100 vezes maior nas amostras de vinho que na de mosto em ambas as usinas Figuras 6, 7, 8, e 10. Na cadeia produtiva do etanol, a amostra de mosto é o caldo açucarado, obtido após a moagem da cana, diluído com água e melão, que alimenta a dorna de fermentação e o vinho é o caldo que passou pelo processo de fermentação, e seguirá para a etapa de destilação para a produção do etanol.

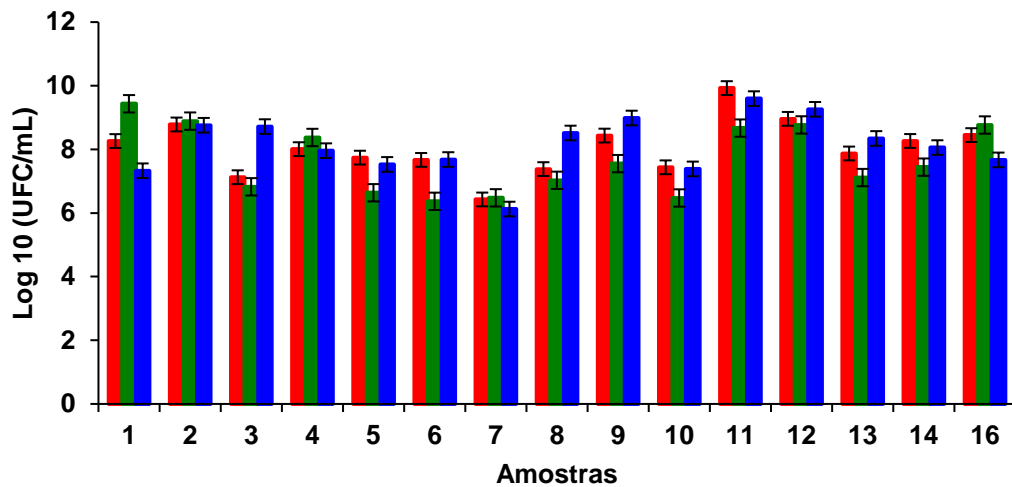


Na usina ITB foram coletadas 15 amostras de abril a novembro. Para as amostras de mosto plaqueadas nos diferentes meios, não houve crescimento microbiano somente na quarta amostra coletada Figura 6. A densidade microbiana variou até 3 ordens de magnitude dependendo da amostra analisada, sendo especialmente baixa para as amostras 12 e 14 Figura 6. Para as amostras plaqueadas em YPD, não houve formação de cfu nas amostras 7,8 e 9, o maior valor de ufc foi de  $10^8$  células /mL nas amostras 10 e 11. Para o meio MRS, o maior ufc foi  $10^9$  ufc /mL na amostra 1, enquanto nas amostras 4,5 e 12 não foi observado crescimento de células. No meio TSB a amostra 5 foi a que apresentou maior ufc com aproximadamente  $10^9$  ufc/mL. Para este meio, também não se observou crescimento microbiano nas amostras 4 e 6 Figura 6.



**Figura 6.** Contagem microbiológica nas amostras de mosto das 15 coletas da Usina Itumbiara. YPD (em vermelho), TSB (azul) e MRS (verde).

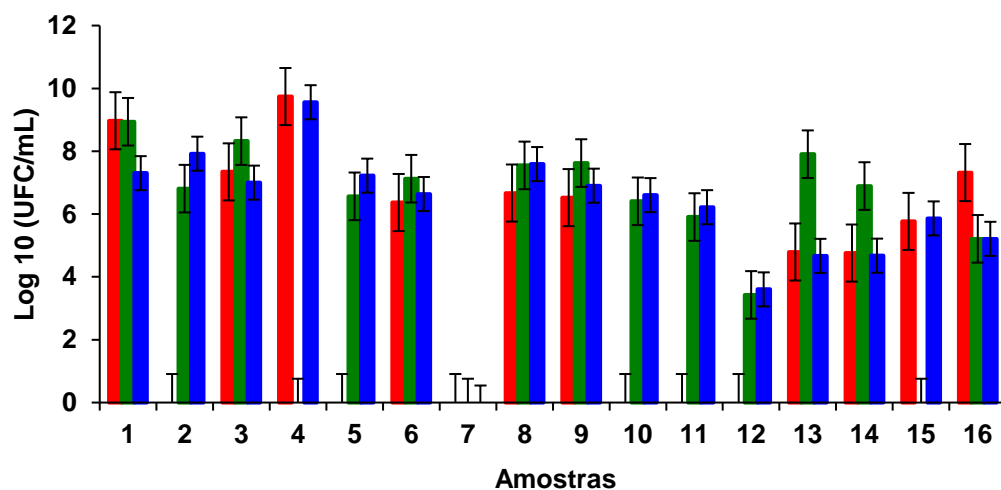
Para as amostras de vinho coletadas na Usina ITB houve menor variação na contagem de ufc. De fato, houve a formação de ufc em todas as 15 amostras nos três meios de cultivo analisados Figura 7. Além disso, houve menor variação de ufc também para as contagens realizadas nos diferentes meios de cultura, a qual foi de  $10^7$  a  $10^{10}$  células /mL Figura 7.



**Figura 7.** Contagem microbiológica das amostras de vinho das 15 coletas da Usina Itumbiara. YPD (em vermelho), TSB (azul) e MRS (verde).

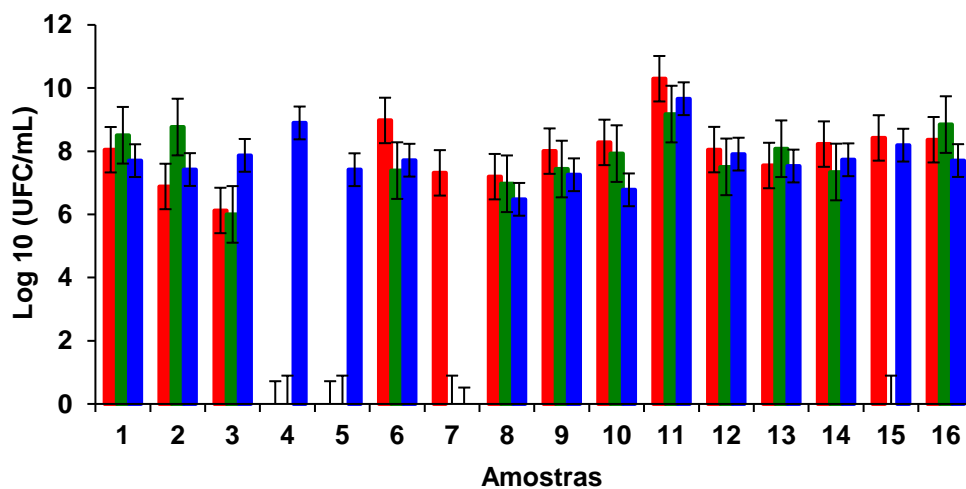
A contagem de micro-organismos da Usina Tropical durante a safra foi realizada em 16 amostras. Assim, como nas amostras de mosto da Usina ITB, houve grande variação de (ufc) nas amostras de mosto da Usina TRP Figura 8. Quando se plaqueou as amostras 2, 5, 10, 11 e 12 em meio YPD não houve formação de cfu, e o maior valor de crescimento foi de  $10^{10}$  células /mL observado na amostra 5. Para o meio MRS, o maior número de células foi observado na amostra 1 com o valor de  $10^9$  ufc/mL, e nas amostras 4 e 15 não foi observado crescimento de células.

No meio TSB, a amostra com o maior valor de (ufc) foi a 5 com aproximadamente  $10^9$ , e não foi observado crescimento microbiano na amostra 7.



**Figura 8.** Contagem microbiológica das amostras de mosto das 16 coletas da Usina Tropical YPD (em vermelho), TSB (azul) e MRS (verde).

Para as amostras de vinho plaqueadas em meio YPD, não houve crescimento de células microbianas nas amostras 4 e 5, enquanto o maior valor de (ufc) foi de  $10^{10}$  células /mL observado na amostra 11. Para o meio MRS, não foi observado crescimento de células nas amostras 4 e 5, e o maior valor de (ufc) foi observado na amostra 2 com o valor de  $10^9$ . No meio TSB, não foi observado crescimento de células de micro-organismos na amostra 7, e a amostra com maior (ufc) foi a 11 com aproximadamente  $10^9$  Figura 9.



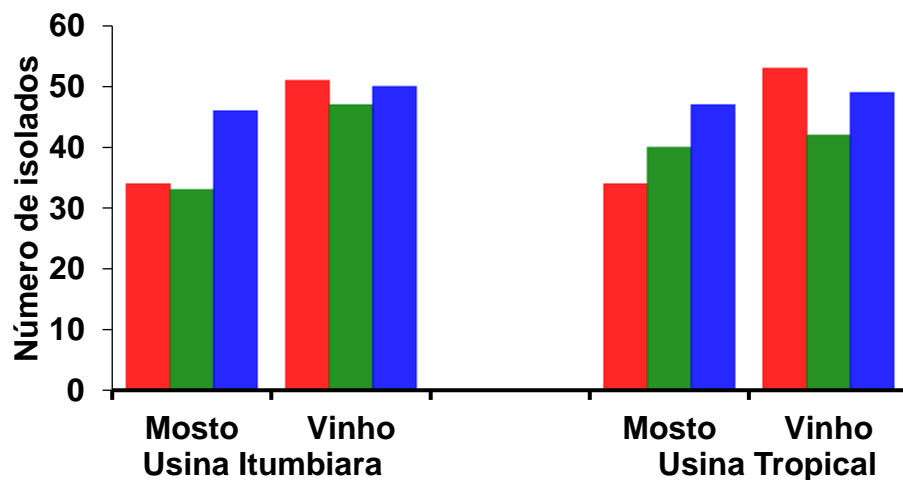
**Figura 9.** Contagem microbiológica das amostras de vinho das 16 coletas da Usina Tropical na YPD (em vermelho), TSB (azul) e MRS (verde).

Um resumo das amostras em que não foi possível detecção de unidades formadoras de colônias é apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Amostras que não apresentaram unidade formadora de colônia-ufc, após o plaqueamento em diferentes meios de cultura.

Usina	Amostra	YPD	TSB	MRS
Itumbiara	Mosto	4, 7,8 e 9	4 e 6	4, 5 e 12
	Vinho	-	-	-
Tropical	Mosto	2, 5, 10, 11 e 12	7	4, 7e 15
	Vinho	4 e 5	7	4, 5 ,7 e15

Os morfotipos foram identificados visualmente e cultivados por repicagem. Quando possível, foram selecionados de 3 a 8 morfotipos, colônias de células com características diferentes, as quais foram armazenados em -80C. Desta forma, ao final da Safra – 2015 o total de micro-organismos isolados de amostras de mosto e vinho dos processos de produção de etanol foi de 516. Desse total, 261 foram isolados da Usina Itumbiara e 255 foram isolados da Usina Tropical. O número de morfotipo de cada unidade industrial nos três meios de cultura foi semelhante, porém observou-se um pequeno aumento no número de isolados nas amostras de vinho em relação às amostras de mosto Figura 10. O número de isolados em cada amostra é apresentado na Tabela 4.



**Figura 10:** Número de morfotipos de amostras de mosto e vinho em diferentes meios de culturas das Usinas Itumbiara e Tropical. YPD (em vermelho), TSB (azul) e MRS (verde).

**Tabela 4:** Número de morfotipos isolados obtidos de amostras de mosto e vinho e plaqueado nos meios YPD, TSB e MRS.

Amostra	Usina Itumbiara						Usina Tropical					
	Mosto			Vinho			Mosto			Vinho		
	YP D	TS B	MR5	YP D	TS B	MR5	YPD	TS B	MR 5	YP D	TS B	MR5
1	5	8	3	3	5	3	5	4	3	3	4	3
2	3	4	3	3	4	3	-	3	3	3	3	3
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	-	-	-	3	3	3	3	3	-	3	3	-
5	-	3	-	4	3	3	-	3	3	3	3	-
6	3	-	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3
7	-	3	3	4	4	3	-	-	-	3	-	-
8	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	-	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3
10	3	3	3	3	3	3	-	3	3	4	3	3
11	3	3	-	4	3	3	-	3	3	3	3	3
12	3	3	3	3	3	3	-	3	3	4	3	3
13	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3
14	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
15	-	-	-	-	-	-	3	3	-	3	3	3
16	5	4	3	5	3	5	5	3	4	3	3	3
TOTAL	34	46	33	51	53	47	34	46	40	50	46	39

## 5.2. Caracterização fisiológica dos isolados

Os morfotipos das amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara e Tropical nos meios YPD, TSB e MRS das coletas 1 e 16 foram selecionados para a caracterização fisiológica, em virtude do grande número de morfotipos isolados durante a safra, houve a necessidade de redução do número de isolados para esta etapa, assim com a caracterização dos morfotipos da primeira e da última coleta, houve a possibilidade de detecção de que as espécies da primeira coleta poderiam também serem detectadas na última coleta. Para tanto, foram realizados ensaios fermentativos em pequena escala e posterior caracterização dos metabólitos produzidos com um total de 73 isolados. Da Usina ITB foram selecionados 42 isolados, sendo 21 da primeira coleta e 21 da última Tabela 5. Da Usina TRP foram selecionados 31 isolados, sendo 18 da primeira coleta e 13 da última Tabela 6. Foi possível observar que a maioria dos morfotipos foram obtidos por isolamento em meio

TSB e com amostras de mosto. Por outro lado, o menor número de morfotipos são provenientes de isolamento em meio MRS com amostras de vinho.

**Tabela 5.** Morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho da usina Itumbiara para a caracterização fisiológica. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

Coleta	Amostra	Meio de isolamento	Isolado		
1 <sup>a</sup> Data 16.04.15	Mosto	TSB	ITB-M-I1-TSB-1C		
			ITB-M-I2-TSB-1C		
			ITB-M-I3-TSB-1C		
			ITB-M-I4-TSB-1C		
			ITB-M-I5-TSB-1C		
			ITB-M-I6-TSB-1C		
			ITB-M-I7-TSB-1C		
			ITB-M-I8-TSB-1C		
	Vinho	TSB	TSB	ITB-V-I1-TSB-1C	
				ITB-V-I2-TSB-1C	
				ITB-V-I3-TSB-1C	
				ITB-V-I4-TSB-1C	
		MRS	MRS	MRS	ITB-V-I3-YPD-1C
					ITB-V-I1-MRS-1C
					ITB-V-I2-MRS-1C
ITB-V-I3-MRS-1C					

**Tabela 5.** Continuação.

16 <sup>a</sup>  Data 17.11.15	Mosto	TSB	ITB-M-I1-TSB-16C
			ITB-M-I2-TSB-16C
			ITB-M-I3-TSB-16C
		YPD	ITB-M-I1-YPD-16C
			ITB-M-I2-YPD-16C
			ITB-M-I3-YPD-16C
	Vinho	MRS	ITB-M-I4-YPD-16C
			ITB-M-I1-MRS-16C
			ITB-M-I2-MRS-16C
		YPD	ITB-M-I3-MRS-16C
			ITB-V-I2-TSB-16C
			ITB-V-I3-TSB-16C
16 <sup>a</sup>  Data 17.11.15	Vinho	YPD	ITB-V-I1-YPD-16C
			ITB-V-I2-YPD-16C
			ITB-V-I3-YPD-16C
		MRS	ITB-V-I4-YPD-16C
			ITB-V-I1-MRS-16C
			ITB-V-I2-MRS-16C
	MRS	ITB-V-I3-MRS-16C	
		ITB-V-I4-MRS-16C	
		ITB-V-I5-MRS-16C	

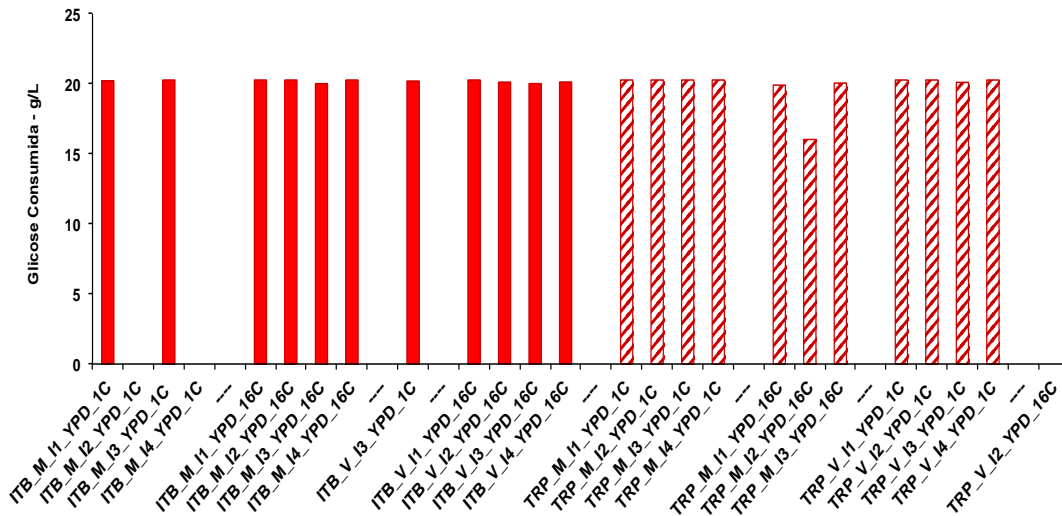
**Tabela 6.** Morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho da usina Tropical, selecionados para a caracterização fisiológica. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

Coleta	Amostra	Meio de isolamento	Isolado
1 <sup>a</sup> Data 16.04.15	Mosto	TSB	TRP-M-I2-TSB-1C
			TRP-M-I3-TSB-1C
			TRP-M-I4-TSB-1C
		YPD	TRP-M-I1-YPD-1C
			TRP-M-I2-YPD-1C
			TRP-M-I3-YPD-1C
	Vinho	MRS	TRP-M-I4-YPD-1C
			TRP-M-I1-MRS-1C
			TRP-M-I2-MRS-1C
		TSB	TRP-V-I1-TSB-1C
			TRP-V-I2-TSB-1C
			TRP-V-I3-TSB-1C
YPD	TRP-V-I4-TSB-1C		
	TRP-V-I1-YPD-1C		
	TRP-V-I2-YPD-1C		
16 <sup>a</sup> Data 17.11.15	Mosto	MRS	TRP-V-I3-YPD-1C
			TRP-V-I4-YPD-1C
			TRP-V-I1-MRS-1C
	Vinho	TSB	TRP-V-I2-MRS-1C
			TRP-V-I1-TSB-16C
			TRP-V-I2-TSB-16C
Mosto	YPD	TRP-V-I3-TSB-16C	
		TRP-M-I1-YPD-16C	
		TRP-M-I2-YPD-16C	
Vinho	MRS	TRP-M-I3-YPD-16C	
		TRP-M-I1-MRS-16C	
		TRP-M-I2-MRS-16C	
Mosto	TSB	TRP-M-I3-MRS-16C	
		TRP-V-I1-TSB-16C	
		TRP-V-I2-TSB-16C	
Vinho	YPD	TRP-V-I3-TSB-16C	
		TRP-V-I2-YPD-16C	
		TRP-V-I1-MRS-16C	
Mosto	MRS	TRP-V-I2-MRS-16C	
		TRP-V-I1-MRS-16C	

A análise fisiológica foi iniciada com os 25 isolados em meio YPD sendo 13 isolados da Usina ITB e 12 isolados da Usina TRP. Para tanto, estes foram crescidos durante a noite, com agitação constante e posteriormente incubados por 48 h em meio YPD contendo glicose 20 g/L. Após esse período, o consumo do açúcar e a formação de glicerol, ácido lático, ácido acético e ácido succínico foram mensurados. Todos os

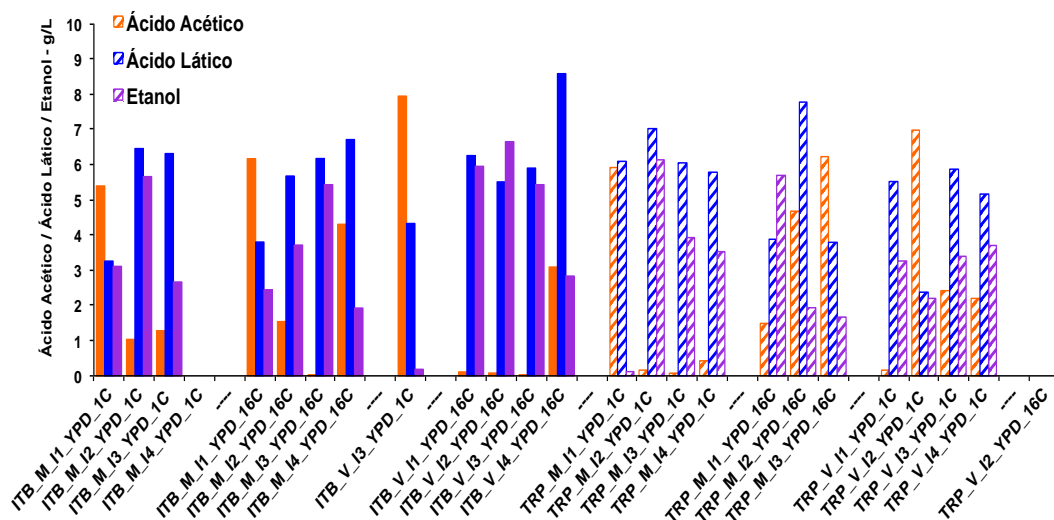


isolados consumiram toda a glicose fornecida, exceto o isolado TRP-M-12-YPD-16C  
 Figura 11.



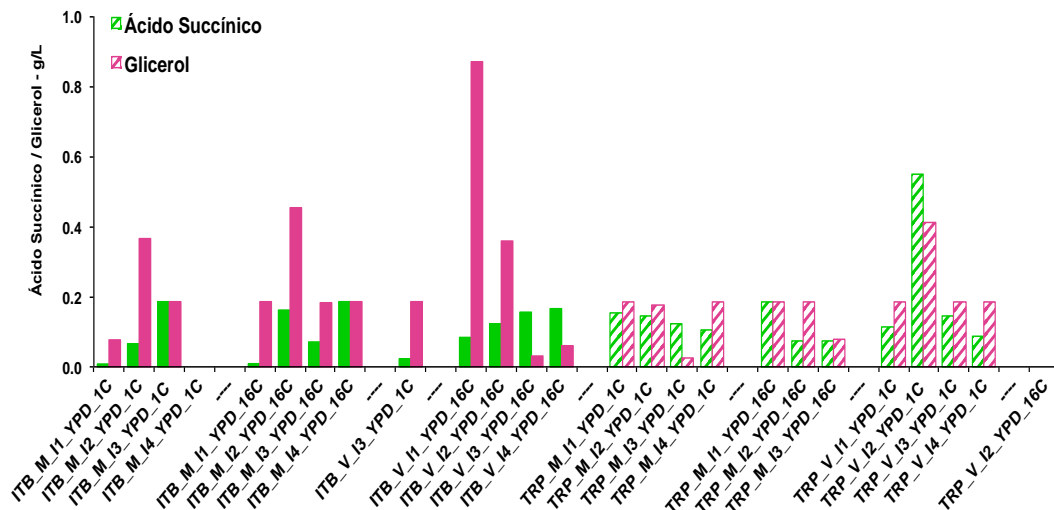
**Figura 11:** Consumo de glicose (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio YPD após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

A produção de etanol, ácido láctico e acético está ilustrada na Figura 12. Para os isolados da Usina ITB, a produção de etanol variou de 0 a 6,6 g/L sendo que o maior valor foi produzido pelo isolado ITB-V-I2-YPD-16C, o isolado ITB-V-I3-YPD-1C, produziu 7,3 g/L de ácido acético, 4,3 g/L de ácido láctico e 0,19 g/L de etanol. A síntese de etanol para a Usina TRP variou de 0,14 a 6,12 g/L, o maior valor foi produzido pelo isolado TRP-M-I2-YPD-1C, o isolado TRP-M-I1-YPD-1C, produziu 6,1 g/L de ácido láctico, e 5,3 g/L de ácido acético, e não produziu etanol.



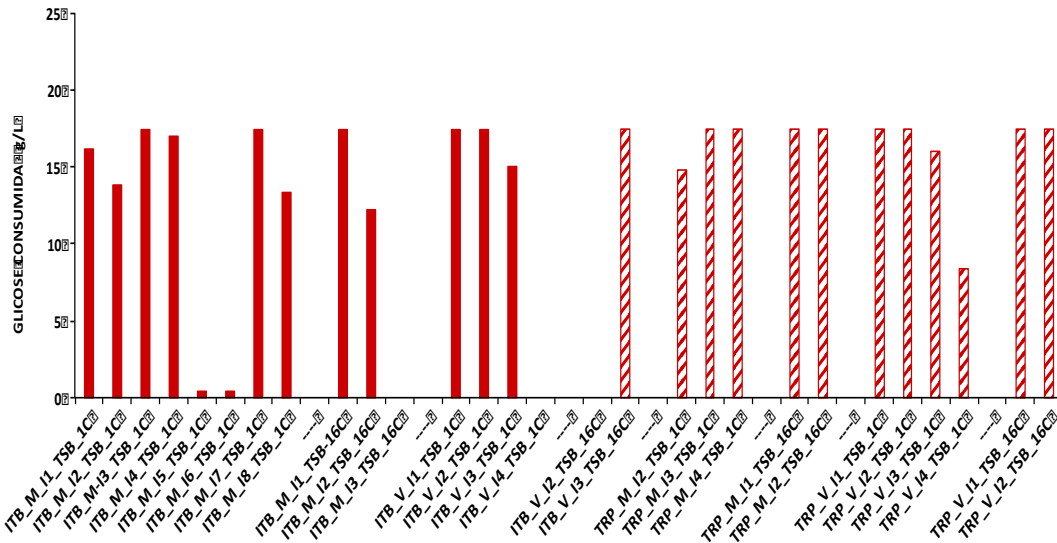
**Figura 12:** Produção de ácido acético, ácido lático e etanol (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio YPD após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

A produção de glicerol e ácido succínico foi mínima para todos os isolados analisados Figura 13. A produção de ácido succínico pelos isolados da Usina TRP variou de 0 a 0,55 g/L, o maior valor produzido foi observado no isolado TRP-V-I2-YPD-1C. O maior valor produzido de glicerol foi 0,87 g/L, observado no isolado ITB-V-I1-YPD-16C.



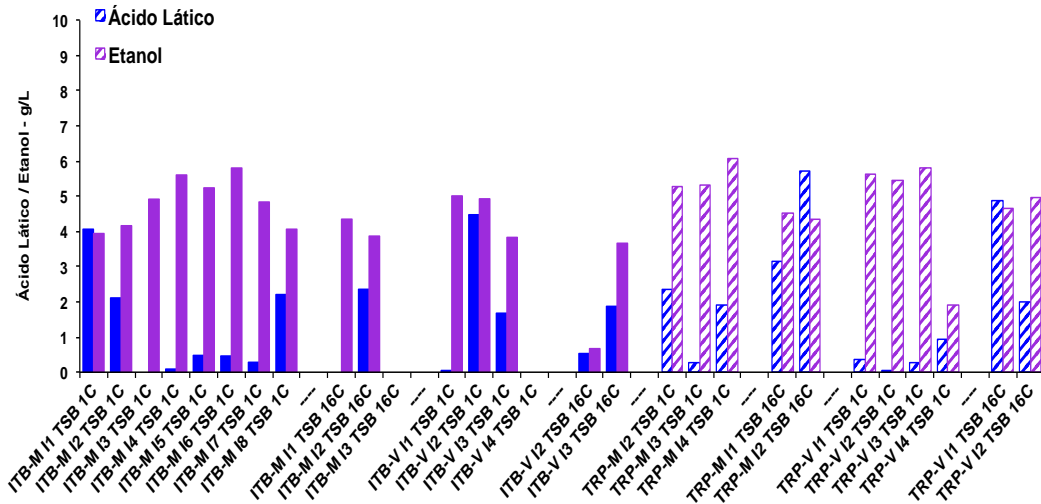
**Figura 13:** Produção de ácido succínico e glicerol (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio YPD após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

A análise fisiológica dos isolados em meio TSB foi iniciada com os 31 isolados, sendo 17 isolados da Usina ITB e 14 isolados da Usina TRP. Para tanto, estes foram crescidos durante a noite e posteriormente incubados por 48 h em meio M9 contendo 20 g/L de glicose. Após esse período, o consumo do açúcar e a formação de clones Glicerol, Ácido Lático, Ácido Acético e Ácido Succínico foram mensurados. Todos os isolados consumiram a glicose fornecida, exceto ITB-M-I3-TSB-16C, ITB-V-I4-TSB-1C, ITB-V-I2-TSB-16C, os isolados ITB-M-I5-TSB-1C, ITB-M-I6-TSB-1C e TRP-V-I4-TSB-1C, consumiram parcialmente Figura 14.

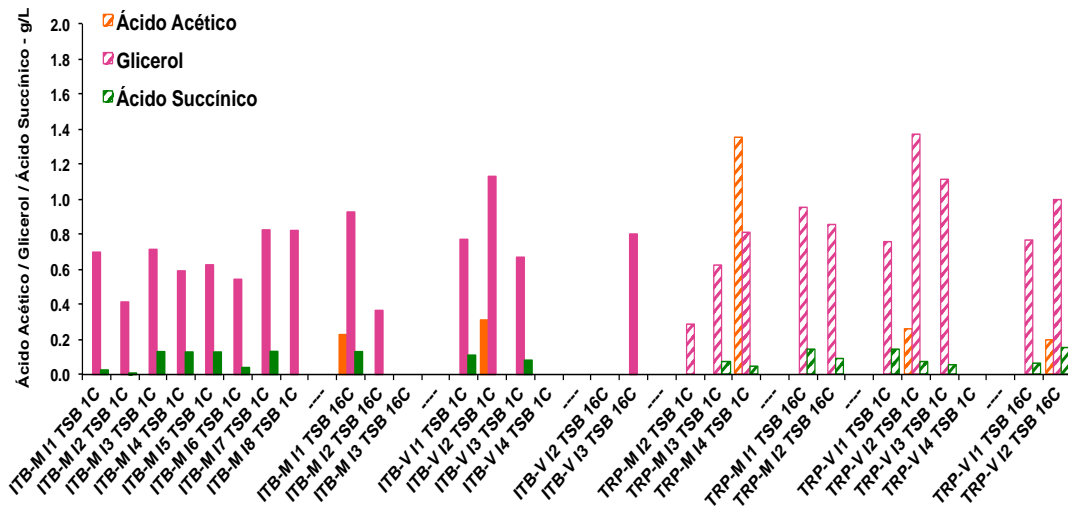


**Figura14:** Consumo de glicose (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio M9 com glicose 20g/L após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

A produção de ácido láctico e etanol está ilustrada na Figura 15 e os valores produzidos de ácido acético, glicerol e ácido succínico estão na Figura 16. O isolado da Usina Itumbiara, ITB-M-14-TSB-1C consumiu o açúcar disponível e produziu 5,6 g/L de etanol e apenas 0,5 g/L de glicerol e para a Usina Tropical o isolado TRP-M-14-TSB-1C, produziu 6,0 g/L de etanol e 1,3 g/L de ácido acético. O maior valor de ácido láctico produzido foi 5,6 g/L pelo isolado TRP-M-12-TSB-16C.

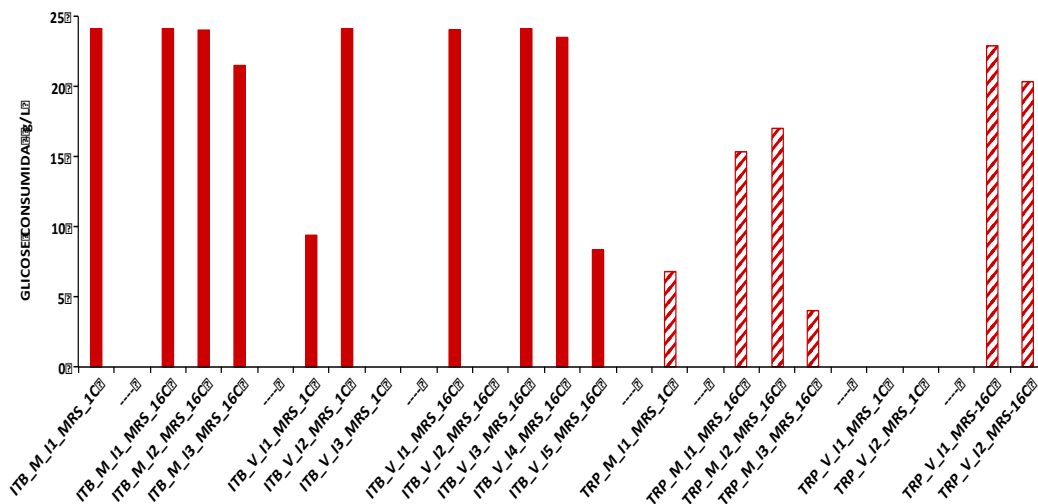


**Figura 15:** Produção de ácido láctico e etanol (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio M9 com glicose 20g/L após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.



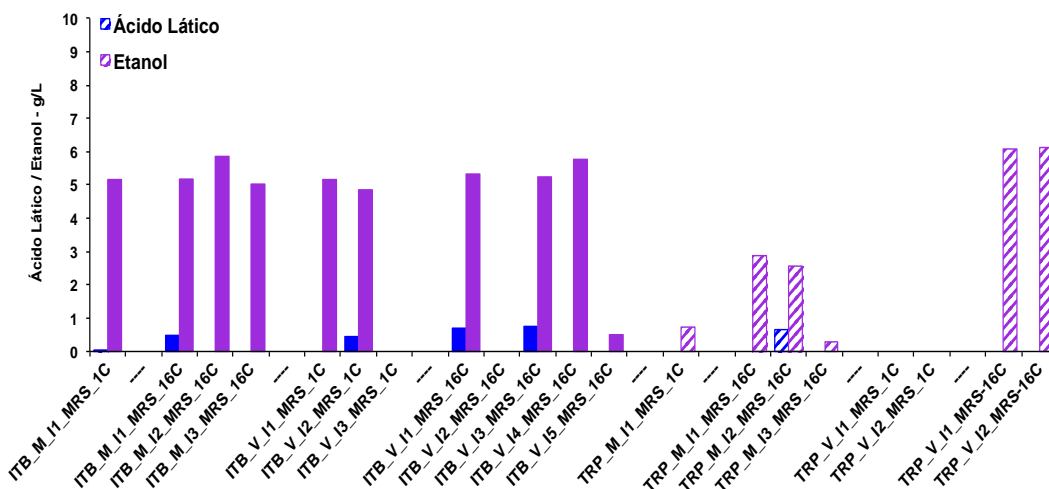
**Figura 16:** Produção de ácido acético, glicerol e ácido succínico (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio M9+com glicose 20g/L após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

A análise fisiológica dos isolados em meio MRS foi iniciada com os 20 isolados, sendo 12 isolados da Usina ITB e 8 isolados da Usina TRP, Tabelas 5 e 6. Para tanto, estes foram crescidos durante a noite e posteriormente incubados por 48 h em meio M9 contendo 20 g/L de glicose. Após esse período, o consumo do açúcar e a formação glicerol, ácido láctico, ácido acético e ácido succínico foram mensurados. Somente 09 isolados consumiram toda a glicose disponível, os isolados ITB-V-I3-MRS-1C, ITB-V-I2-MRS-16C, TRP-V-I2-MRS-1C, TRP-V-I2-MRS-1C e TRP-V-I2-MRS-16C, não consumiram todo o açúcar disponível Figura 17.

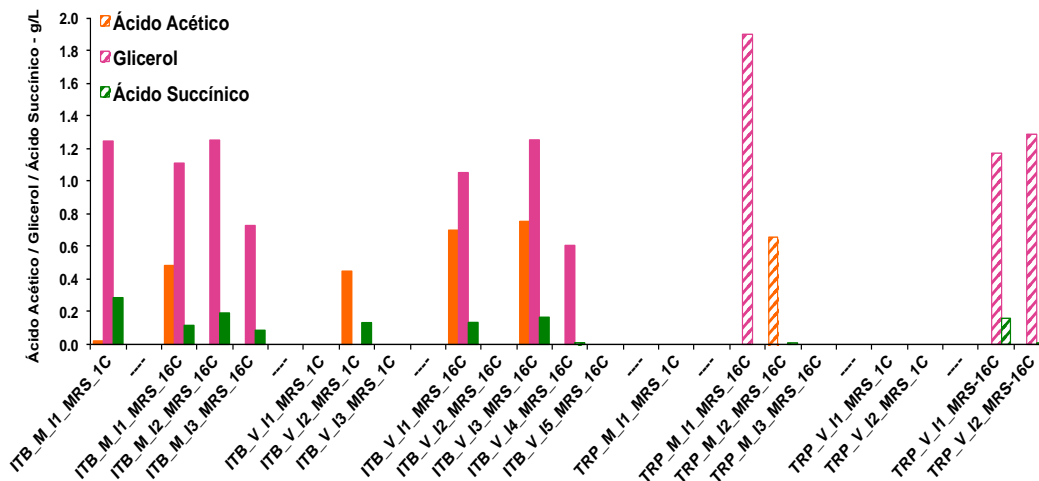


**Figura 17:** Consumo de glicose (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio M9 com glicose 20g/L após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

A produção de ácido láctico e etanol está ilustrada na Figura 18 e os valores produzidos para ácido acético, glicerol e ácido succínico estão ilustrados na Figura 19. Para os isolados da Usina Itumbiara a produção de etanol variou de 0 a 5,8 g/L. O isolado ITB-M-I1-MRS-16C consumiu a glicose disponível e produziu 5,8 g/L de etanol, 1,2 g/L de glicerol e não produziu ácido láctico. A produção de ácido láctico para foi mínima para ambas as usinas.



**Figura 18:** Produção de ácido láctico e etanol (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das Usinas Itumbiara-ITB e Tropical-TRP, coletas 1 e 16 em meio M9 com glicose 20g/L após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.



**Figura 19:** Produção de ácido acético, glicerol e ácido succínico (g/L) pelos isolados de amostras de mosto e vinho das coletas 1 e 16 em meio M9 com 20g/L após 48h de fermentação a 28°C sob agitação constante. A primeira sigla do nome do isolado refere-se à usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

### 5.3. Identificação taxonômica de isolados

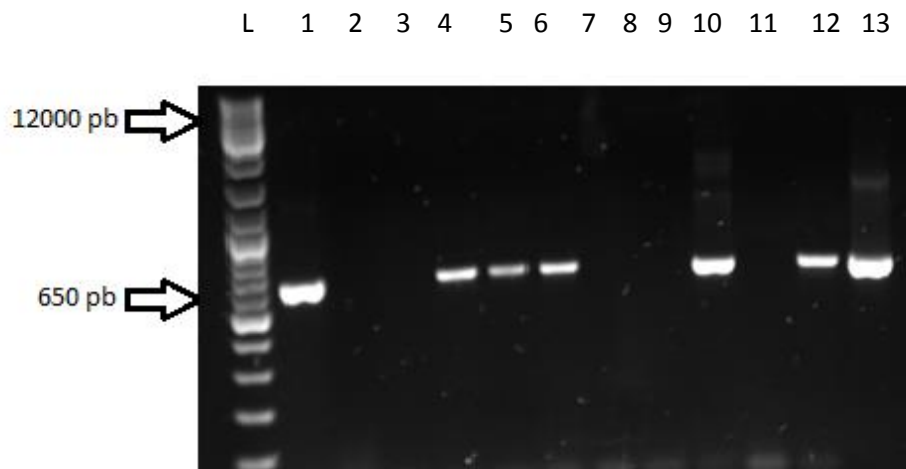
Vinte e cinco micro-organismos isolados em meio YPD de amostras de mosto e vinho da primeira e última coleta das Usinas Itumbiara e Tropical, foram selecionados para a etapa de identificação taxonômica. Estes foram escolhidos baseando-se nos resultados de síntese de metabólitos como a produção de etanol, glicerol e ácidos orgânicos detectados na etapa de caracterização fisiológica, Tabelas7.

**Tabela 7.** Isolados selecionados para a identificação taxonômica das amostras de mosto e vinho isolados em meio YPD, das coletas 1 e 16 das Usinas ITB e TRP. O nome do isolado refere-se a usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

Usina	Coleta	Amostra	Isolado	
ITB	1 <sup>a</sup>	Mosto	ITB-M-I1-YPD-1C	
			ITB-M-I2-YPD-1C	
	ITB-M-I3-YPD-1C			
	ITB-M-I4-YPD-1C			
	16 <sup>a</sup>	Mosto	ITB-M-I1-YPD-16C	
			ITB-M-I2-YPD-16C	
Tropical	1 <sup>a</sup>	Mosto	ITB-M-I3-YPD-16C	
			ITB-M-I4-YPD-16C	
	16 <sup>a</sup>		Vinho	ITB-V-I1-YPD-16C
				ITB-V-I2-YPD-16C
	16 <sup>a</sup>	Vinho	ITB-V-I3-YPD-16C	
			ITB-V-I4-YPD-16C	
1 <sup>a</sup>			Mosto	TRP-M-I1-YPD-1C
				TRP-M-I2-YPD-1C
16 <sup>a</sup>	Mosto	TRP-M-I3-YPD-1C		
		TRP-M-I4-YPD-1C		
16 <sup>a</sup>	Vinho	TRP-V-I1-YPD-1C		
		TRP-V-I2-YPD-1C		
		TRP-V-I3-YPD-1C		
		TRP-V-I4-YPD-1C		
16 <sup>a</sup>	Mosto	TRP-M-I1-YPD-16C		
		TRP-M-I2-YPD-16C		
16 <sup>a</sup>	Vinho	TRP-M-I3-YPD-16C		
		TRP-V-I2-YPD-16C		

Como todos os isolados selecionados para esta etapa foram obtidos em meio YPD contendo antibiótico, antecipou-se que seriam leveduras. Desta forma, procedeu-se a extração de DNA e realizou-se com sucesso para a PCR da região D1-D2 do

gene 28S do DNA ribossomal, a sequência obtida foi de aproximadamente 650 pares de base (Figura 20).



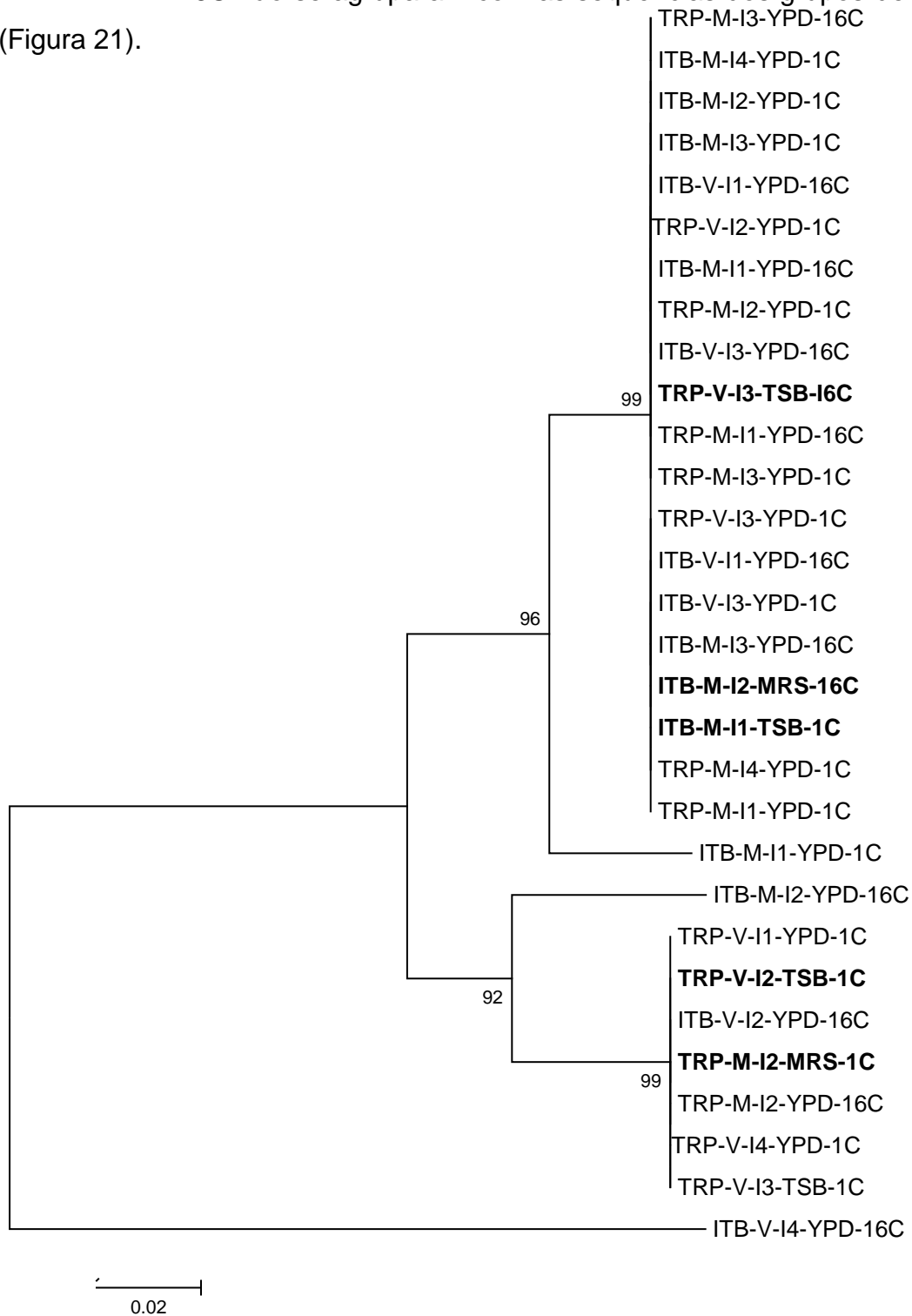
**Figura 20.** Perfil de amplificação da região D1/D2 do rDNA de isolados de leveduras de amostras de mosto e vinho das usinas ITB e TRP. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. No primeiro poço estão marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

Após realização de amplificação da região D1/D2, sequenciamento e posterior análises de dados de bioinformática, as sequências consenso da leitura forward e reverse de cada amostra, foram depositadas no BLAST- Basic Local Alignment Search Tool-NCBI, e a partir de então foram escolhidas as espécies com o “*best hit*”, vale ressaltar que nem todas as espécies escolhidas obtiveram 100% para identidade, impossibilitando assim se fazer conclusões a respeito da proximidade entre espécies. Para os isolados da Usina Itumbiara de amostras de mosto, a predominância das espécies *Saccharomyces cerevisiae* (três isolados), seguida de *Pichia kudriavzevii* (dois isolados), *Candida tropicalis* (um isolado) e *Candida quercitrusa* (um isolado) e para as amostras de vinho, o estudo demonstrou a predominância das espécies *Saccharomyces cerevisiae* (dois isolados) e *Candida tropicalis* (dois isolados) seguida de *Pichia kudriavzevii* (um isolado).

Para a Usina Tropical para as amostras de mosto demonstrou que a espécie predominante foi *Saccharomyces cerevisiae* (cinco isolados), seguida de *Candida tropicalis* (dois isolados). Para as amostras de vinho, o estudo demonstrou a predominância das espécies *Candida tropicalis* (três isolados), seguida de *Candida labiduridarum* (um isolado), *Pichia kudriavzevii* (um isolado) e *Saccharomyces cerevisiae* (um isolado). Os isolados selecionados com o “*best hit*” das usinas, bem como o valor de para Identidade, e o número de acesso ao Gen Bank encontram-se na (Tabela 8). Na árvore filogenética gerada a partir das sequências utilizadas para a



identificação taxonômica de leveduras demonstrou a formação de dois grupos de leveduras, indicando a possibilidade de que os morfotipos isolados de cada grupo pertencem a mesma classificação, sendo que, as sequências ITB-M-I2-YPD-16C e ITB-V-I4-YPD-16C não se agruparam com as sequências dos grupos demonstrados (Figura 21).



**Figura 21.** Árvore filogenética obtida pelo programa MEGA 6 por Neighbor-joining, a partir das sequências da região D1-D2 de leveduras identificadas. As sequências não selecionadas com o melhor

hit no estudo estão em negrito. O nome do isolado refere-se a usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

**Tabela 8.** Resultado da Identificação Taxonômica dos morfotipos isolados de amostras de mosto e vinho das usinas Itumbiara e Tropical. O nome do isolado refere-se a usina, seguida do tipo de amostra, morfotipo isolado, tipo de meio de isolamento e o número da coleta.

Usina	Isolado	Melhor Hit	Identidade (%)	Número de acesso no Gene Bank
Itumbiara	ITB-M-I1-YPD-1C	<i>Pichia kudriavzevii</i> 9005	100	KX237674.1
	ITB-M-I2-YPD-1C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	100	KX891350.1
	ITB-M-I3-YPD-1C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	100	KX891350.1
	ITB-M-I4-YPD-1C	<i>Candida tropicalis</i> 13	91	KX533470.1
	ITB-M-I1-YPD-16C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 68	100	KM589492.1
	ITB-M-I2-YPD-16C	<i>Candida quercitrusa</i>	93	KU708239.1
	ITB-M-I3-YPD-16C	<i>Pichia kudriavzevii</i> 9005	100	KX237674.1
	ITB-V-I3-YPD-1C	<i>Pichia kudriavzevii</i> 9005	100	KX237674.1
	ITB-V-I1-YPD-16C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	100	KX891350
	ITB-V-I2-YPD-16C	<i>Candida tropicalis</i> 3775	97	JQ410338.1
	ITB-V-I3-YPD-16C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GV5	87	KP250857.1
	ITB-V-I4-YPD-16C	<i>Candida tropicalis</i> A20	100	AB719431.1

---

	TRP-M-I1- YPD-1C	<i>Candida tropicalis</i> 2320	99	KY106851.1
	TRP-M-I2- YPD-1C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	99	KX891350.1
	TRP-M-I3- YPD-1C	<i>Candida tropicalis</i> 1277	93	KR632573.1
	TRP-M-I4- YPD-1C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9006	100	KX237671.1
	TRP-M-I1- YPD-16C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2845	100	KY109405.1
	TRP-M-I2- YPD-16C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	100	KX891350.1
Tropical	TRP-M-I3- YPD-16C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	100	KX891350.1
	TRP-V-I1- YPD-1C	<i>Candida tropicalis</i> 2320	99	KY106851.1
	TRP-V-I2- YPD-1C	<i>Candida labiduridarum</i> 10452	92	KY106543.1
	TRP-V-I3- YPD-1C	<i>Pichia kudriavzevii</i> 90095	100	KX237674.1
	TRP-V-I4- YPD-1C	<i>Candida tropicalis</i> 1277	99	KY109364.1
	TRP-V-I3- TSB-1C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11516	100	KX891350.1
	TRP-V-I2- YPD-1C	<i>Candida tropicalis</i> 1277	93	KR632573.1

---

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi o estudo da dinâmica populacional de micro-organismos existentes no processo produtivo de etanol a partir de técnicas dependentes de cultivo. Amostras quinzenais de mosto (caldo açucarado que alimenta a dorna de fermentação) e vinho (caldo fermentado) foram obtidas por um período de 8 meses de duas usinas produtoras de etanol localizadas no estado de Goiás. A partir destas coletas foi possível isolar 516 linhagens microbianas (morfotipos diferentes a cada coleta), sendo 261 isolados da Usina Itumbiara e 255 isolados da Usina Tropical. Este pode ser considerado um número reduzido de isolados, uma vez que várias leveduras do gênero *Saccharomyces* foram obtidas (Tabelas 4 e 8).

Nesse contexto, não existe produto ou processo que possa ser utilizado pelas destilarias para reduzir as contaminações de *leveduras* selvagens no processo de fermentação sem afetar as estirpes de leveduras selecionadas (Amorim et al, 2011). Portanto, não se pode afirmar que as linhagens de *Saccharomyces* reveladas neste estudo, foram as linhagens selecionadas como *starters* da fermentação ou as contaminantes no processo produtivo das usinas em questão. Embora a grande maioria de estudos de micro-organismos contaminantes do processo produtivo de etanol seja realizado usando a técnica dependente de cultivo, o uso desta técnica, limita a possibilidade de conhecimento de grande parte da diversidade de micro-organismos presentes nas diferentes etapas de produção, em virtude da impossibilidade de reproduzir em laboratório as condições em que esses micro-organismos se desenvolvem ao longo da cadeia de produção do etanol (Costa, 2014).

Na contagem de micro-organismos, assim como nas amostras de mosto da Usina ITB, houve grande variação de unidades formadoras de colônias (UFC) nas amostras de mosto da Usina TRP (Figuras 7 e 9). Durante a realização do processo fermentativo, o controle e o monitoramento da microbiota fermentadora são de fundamental importância para a redução dos problemas causados pelas contaminações, além da possibilidade de se obter maiores rendimentos e eficiências (Bandin, 2010). Assim, na cadeia de produção de etanol após a etapa de moagem, o caldo- de- cana antes de ser fermentado passa por tratamento para retirada de impurezas e preparo do caldo com a utilização de cal, correção de pH para 6,8 a 7,2, este então é aquecimento a 105°C, seguido de etapa de decantação, para obtenção do caldo clarificado, este então, pode ser enviado para a fabricação de açúcar ou

etanol. O resíduo do fabrico de açúcar é denominado melaço. O caldo preparado para produção de etanol é novamente aquecido a 115°C para concentração de açúcares a aproximadamente 18 a 20° brix, o mosto é um líquido açucarado que alimenta as dornas de fermentação, sendo composto de caldo clarificado, melaço e água (Chieppe, 2012). A etapa de preparo do caldo e aquecimento pelo qual é submetido pode contribuir na diminuição do número de micro-organismos contaminantes. Pois o período entre o corte-carregamento-transporte e o processo de extração, propiciam condições favoráveis à infecção (Costa, 2006).

Um fator que pode explicar a ausência de microrganismos em alguns cultivos pode estar relacionado ao estoque das amostras após a coleta. As amostras recebidas para o estudo foram coletadas, acondicionadas em gelo e transportadas por mais de 5 horas até o laboratório, ficando assim, suscetíveis a comprometimento em termos de viabilidade celular. Ademais, podendo ocorrer a possibilidade de perda de micro-organismos nestas condições, pois como esta era realizada num contexto industrial, nem sempre pode-se garantir que o funcionário da empresa fez o correto armazenamento da amostra até sua chegada ao laboratório. Dentre as usinas estudadas neste trabalho, a Usina Itumbiara apresentou maior valor em unidades formadoras de colônias (UFC) nas amostras de vinho (Figura 8). Isto pode estar relacionado com a característica do processo produtivo, tendo em vista que, que a amostra de vinho é caracterizado como –o caldo fermentado–, e as fermentações industriais no Brasil são realizadas com alta densidade de células (8-12% p/v) e em curtos períodos (6-12 horas) com dornas de fermentação com capacidade para 0,5 a 3,5 milhões de litros cada, porém, é suscetível à contaminação por leveduras selvagens e bactérias se a assepsia não for executada adequadamente pois, os micro-organismos provenientes da matéria-prima são introduzidos no processo fermentativo e competem pelo substrato com as leveduras selecionadas para conduzir a fermentação na usina de produção de etanol (Amorim et al, 2011).

Embora o tratamento térmico seja um procedimento de rotina que objetiva reduzir a carga microbiana, as dificuldades para esterilizar grandes volumes de caldo e água, problemas como falhas operacionais, re-contaminação do mosto por meio de trocadores de calor ou adição de melaço comprometido microbiologicamente podem ter contribuído para essa ocorrência (Amorim et al, 2015). É importante ressaltar que a reciclagem de células, característica do processo Melle Boinot embora represente uma vantagem para a indústria brasileira, porque a reutilização de biomassa de

células vivas economiza açúcar e aumenta o rendimento do processo, também pode ser considerada uma fonte de contaminação (Amorim, et al, 2011). Após o processo, as leveduras usadas pela usina para conduzir a fermentação, com o objetivo de reduzir o número de micro-organismos contaminantes passam por tratamento com ácido sulfúrico diluído em água na proporção (1:1), correção de pH em torno de 2, a 3,0 por aproximadamente duas horas, podendo chegar até três horas. Porém, quanto maior o tempo em que as células de leveduras permanecerem nesta etapa menor é a viabilidade das mesmas, pois, o uso excessivo do ácido sulfúrico pode ser prejudicial às células de leveduras, podendo levar à um enfraquecimento na membrana celular e ocasionar desequilíbrio na bomba de prótons e comprometer o sistema enzima-substrato, devido à variação de pH, na qual a célula é submetida, em do aumento do pH quando o inóculo é misturado com o mosto na cuba de fermentação (Chieppe, 2012) e (Oliva- Neto et al,2013).

O uso de antibióticos também é uma estratégia para o controle de contaminantes do processo de fermentação alcoólica. A ausência de crescimento microbiano observado em algumas amostras, (Tabela 3) é devido aos tratamentos com antibióticos realizados no processo de reuso das *Saccharomyces*. Essa prática ocorreu com maior frequência na usina ITB (comunicação oral). Porém, as datas de uso destes compostos não foram obtidas para correlação. Portanto, os micro-organismos contaminantes encontrados nas amostras de vinho e mosto (Figuras, 7,8,9 e 10) estão relacionados a diferentes etapas do processo produtivo do etanol.

No trabalho de Liberal et al. (2007) os autores isolaram em meio WLN contendo 0,1% de bromocresol verde, colônias de leveduras de amostras de mosto e vinho de usinas de produção de etanol da região Nordeste do Brasil. Após identificação taxonômica a partir de sequenciamento da região D1-D2 do gene 28S do rDNA, que codifica concluíram que as principais leveduras contaminantes, classificadas como não-*Saccharomyces*, foram do gênero *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* e *Candida*. *Dekkera* segundo os autores é um gênero comum de leveduras contaminantes, causando uma redução significativa do rendimento de fermentação em destilarias que não aqueça o suco de cana-de-açúcar e trabalha com concentrações de etanol muito baixas no vinho. Neste trabalho, não selecionou o “melhor hit” na etapa de identificação taxonômica leveduras do gênero *Dekkera* e *Schizosaccharomyces*, somente, *Candida tropicalis* e *Pichia kudriavzevii* (Tabela 8). Isso pode estar

relacionado com o baixo número de leveduras identificadas (25) ou por diferenças nas condições industriais.

Os estudos sobre diversidade microbiana contaminante (Costa, 2014) ,a partir de técnica dependente de cultivo, em amostras de 6 etapas da cadeia produtiva de etanol, com micro-organismos cultivados em amostras de caldo de cana crua, caldo misto, mosto e vinho, e a partir da amplificação da região D1/D2 do gene 28S do rDNA das leveduras cultivadas, e seguido de sequenciamento e análise de bioinformática, houve a identificação de 30 leveduras, sendo que para as amostras de mosto houve a predominância dos gêneros *Cystobasidiaceae*-não-classificada no estudo e identificação dos gêneros *Ascomycota*, *Wickerhamomyces* e *Saccharomyces*.

Outro ponto a destacar, em estudos sobre linhagens de leveduras selvagens contaminantes no processo produtivo de etanol (Basílio et al,2007) e (Basso et al, 2008) a partir de técnicas moleculares independentes de cultivo com amplificação da região D1-D2 e técnicas de cariotipagem, com amostras retiradas da etapa de fermentação em destilarias do Sudeste do Brasil concluíram que as linhagens de leveduras não *Saccharomyces*, representaram de 5% do total de linhagens identificadas no estudo e relatam que espécies de leveduras como *Candida tropicalis* *Dekkera bruxelensis* e *Pichia galeiformis* , foram encontradas mais frequentemente em destilarias que operam com concentrações finais de etanol (6% v/v) e não operam regularmente com títulos de alta produção de etanol no setor sucroenergético.

Ademais, o rendimento e a diminuição nos custos dos processos industriais fermentativos são controlados e dependem do equilíbrio de vários parâmetros pH, temperatura, alguns inibidores químicos como ácidos orgânicos, pois o efeito antagonista dos ácidos orgânicos afeta sinergicamente a viabilidade da produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Existe uma ampla classe de ácidos que causam danos a *S. cerevisiae*, tais como: ácido acético, butírico, ácido valérico, ácido fórmico, ácido láctico. No entanto, o ácido láctico se destaca devido à contaminação por bactérias lácticas que são muito frequentes nos processos (Oliveira-Neto et al.,2013).

Neste estudo, conforme citado anteriormente, embora o isolamento de micro-organismos tenha ocorrido ao longo de quinze coletas para a Usina Itumbiara e dezesseis coletas para a Usina Tropical, as etapas de caracterização fisiológica e identificação taxonômica, concentraram-se somente com os isolados da primeira e última coleta, de amostras de mosto e vinho, com isolados cultivados em meio YPD

(leveduras), (Tabelas 5 e 6). Os resultados de caracterização fisiológica dos micro-organismos isolados em meio YPD contendo glicose 20g/L, das Usinas Itumbiara e Usina Tropical (Figuras 12,13 e 14) foi possível observar o consumo de todo o substrato oferecido, exceto para o isolado TRP-M-I2-YPD-16C. Na Usina Itumbiara, o isolado ITB-V-I2-YPD-1C, consumiu o substrato e produziu 6,6 g/L de etanol e 0,36 g/L de glicerol, porém o clone da usina Tropical, TRP-V-I2-TSB-1C, consumiu o açúcar disponível e produziu 5,4 g/L de etanol e 1,3 g/L de glicerol (Figuras 15, 16 e 17). A produção de etanol na levedura, ocorre por via glicolítica, a hexose é oxidada a gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxicetona fosfato, o gliceraldeído é convertido a piruvato que é, então, descarboxilado a acetaldeído, e reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase pelo uso de NADH sendo que as duas moléculas de NAD<sup>+</sup> formadas são utilizadas na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo assim, o equilíbrio redox nas células. Assim, nesta via, a dihidroxicetona pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato, e posteriormente a etanol, ou alternadamente, reduzida a glicerol (Figura 5) (Ferrari,2013). No processo fermentativo, em condições normais, o glicerol é liberado para o meio extracelular, porém em condições de estresse osmótico, acumula-se no citoplasma celular devido ao aumento de sua síntese. (Costa, 2006).

Foi possível observar, que alguns isolados consumiram o substrato e produziram etanol, o isolado ITB-V-I3-YPD-1C (Figura 13), por exemplo, consumiu o açúcar disponível e produziu 7,9 g/L de ácido acético com produção de menos de 1g de etanol indicando para um metabolismo de oxidação do piruvato para a via de produção de orgânicos (Figura 5). Embora os micro-organismos tenham sido isolados em meios seletivos para leveduras (YPD), bactérias (TSB), e bactérias do ácido láctico (MRS), (Figura 11), com o uso de antibióticos e antifúngicos, respectivamente, o estudo revelou clones que consumiram o açúcar e não produziram etanol e sim ácidos orgânicos, como exemplo o isolado TRP-M-I1-YPD-I1C (Figura 13) produziu 6,1 g/L de ácido láctico e 5,3 g/L de ácido acético, possivelmente, indicando para um metabolismo característico de bactérias do ácido láctico. Segundo a literatura, o gênero *Lactobacillus* – é o predominante de bactérias encontradas no processo produtivo do etanol-, são divididos em dois grupos, quanto a metabolização dos açúcares, o grupo formado por homofermentativos obrigatórios, em que as hexoses são convertidas quase que exclusivamente em ácido láctico pela via glicolítica, e o grupo formado por heterofermentativo obrigatórios, que em condições de anaerobiose, as hexoses são



convertidas em quantidades equimolares de ácido lático, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (Costa, 2014) e (Oliva-Neto, 2013). Embora este estudo não tenha o objetivo de identificação taxonômica de bactérias, os ensaios de caracterização fisiológica com os micro-organismos isolados de amostras de mosto e vinho das usinas ITB e TRP, indicam a possibilidade do consumo de açúcar para a formação de ácidos orgânicos, metabolizados por bactérias e não para a produção de etanol, sendo necessário identificar as linhagens promissoras para a partir de então, iniciar nova temporada de fermentação.

Na etapa de identificação taxonômica, dos micro-organismos isolados em meio YPD, de amostras de mosto e vinho das usinas ITB e TRP, após a amplificação da região D1-D2, do gene 28S do rDNA de leveduras e análises das sequências a partir de bioinformática, este estudo selecionou 25 isolados com os “melhores “hit”, com predominância de espécies de *Saccharomyces cerevisiae* (11 isolados) , *Candida tropicalis* (08 isolados) *Pichia kudriavzevii* (04 isolados) (Tabela 8), alguns isolados, como o clone da Usina Itumbiara, ITB-V-I4-YPD-16C (Figuras 12,13 e 14), que na etapa de caracterização fisiológica consumiu o açúcar disponível produzindo além de etanol, produziu também ácidos orgânicos , indicou para a espécie *Candida tropicalis*, porém após a seleção com o “melhor hit”, nem todas essas espécies , apresentaram 100% de identificação (Tabela 8). O estudo mostrou que após a seleção de isolados na identificação taxonômica, não houve diferenças quanto à espécie, para os dois tipos de amostras, mosto e vinho, assim como não houve diferenças entre as duas usinas estudadas.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo de caracterização de micro-organismos com amostras de mosto e vinho coletadas de processos industriais de produção de etanol de duas usinas no Estado de Goiás constatou a partir de técnica dependente de cultivo e identificação taxonômica a presença de micro-organismos contaminantes, possibilitando assim:

- ✓ O isolamento de 516 micro-organismos de duas etapas, mosto e vinho do processo produtivo de etanol das Usinas Itumbiara e Usina Tropical, localizadas em Goiás;
- ✓ A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das amostras de mosto apresentou maior variação ao longo das coletas, e as amostras de vinho menor variação das usinas em estudo;
- ✓ Os ensaios de caracterização fisiológica para os isolados selecionados em amostras de mosto e vinho das duas unidades industriais, revelaram que morfotipos que consumiram o açúcar disponível e produziram etanol, ou a mistura de etanol e glicerol, como também etanol e ácidos orgânicos;
- ✓ A identificação taxonômica indicou dentre 25 isolados identificados a predominância das espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Pichia kudriavzevii*.

Contudo, as pesquisas que versam a respeito de diversidade e caracterização de micro-organismos contaminantes na produção do etanol são importantes e, podem contribuir com novos estudos que busquem respostas sobre os efeitos dos fatores de estresses em que a levedura *S. cerevisiae* é submetida no processo fermentativo.

Como também em abordagens a respeito de seleção de novas linhagens de leveduras para a produção de etanol, com intuito de fortalecimento, controle e otimização do processo, na busca por melhores rendimentos e baixo custo na cadeia produtiva do Setor Sucroalcooleiro.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. & LEÃO, R. M. **Fermentação Alcoólica: Ciência E Tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2015. 448.
- AMORIM, H. V. & LOPES, M. L. Ethanol Production in a Petroleum Dependent World: The Brazilian Experience. **Sugar Journal, New Orleans**, v. 67, n. 12, p. 11-14, 2005.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; DE CASTRO. BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific Challenges of Bioethanol Production in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANTONINI, S. R. & PARAZZI, C. Isolamento De Levedura Selvagem Floculante E Efeitos Da Contaminação Em Processo De Fermentação Etanólica Contínua. **CONGRESSO NACIONAL DA STAB**, v. 6, p. 23-29, 1996.
- BARROS, R. **Energia Para Um Novo Mundo**. Rio de Janeiro-Monte Castelo Idéias, 2007. 160.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, T. O.; GOMES, F. S.; LOPES, M. L.; DE AMORIM, H. V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo- and Heterofermentative Lactobacilli Differently Affect Sugarcane-Based Fuel Ethanol Fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 169-177, 2015.
- BASÍLIO, A.C.M, ARAÚJO PRL, MORAIS J.O.F; SILVA, E.A, SIMOES,D.A. Detection and identification of wild yest contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *J Microbiol Biotechnol*, 2008.
- MELO,H.F-**Respostas ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. Tese de Doutorado, Universidade Federalde Pernambuco, 2006.
- BERGMANN, J. C.; TRICHEZ, D.; SALLET, L. P.; DE PAULA, F. & DE ALMEIDA, J. R. M. **Technological Advancements in 1G Etanol Production and Recorvery of by-Products Based on the Biorefinery Concept** Brasília-DF: Submetido em 2017.
- BNDES. **CGEE. Bioetanol De Cana-De-Açúcar: Energia Para O Desenvolvimento Sustentável**. BNDES: 2008. 316 p.

BRASIL. Livro Do Ministério De Minas E Energia E Petrobrás. Biocombustíveis 50 Perguntas E Respostas Sobre Este Novo Mercado Ministério De Minas E Energia-Petrobrás. 2007.

BRASIL. Ministério Das Minas E Energia. Viii-Oferta De Biocombustíveis. In: Plano Decenal De Expansão De Energia 2020. **Brasília, EPE**, p. 241-255, 2011a.

CARVALHO, D; TORRES,G.A. Marcadores moleculares. Lavras UFLA/FAEPE 2002. 35p.

CERQUEIRA, S. C. H. **Tratamento térmico do caldo- de - cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos de *Lactobacillus* na produção de etanole e ficiência do fermento por etanol.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p. 177, **2009**.

CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento Da Safra Brasileira - Cana-De-Açúcar. p. 33, 2016.

COSTA, O. Y. A Assis. **Diversidade microbiana na produção de etanol utilizando técnicas tradicionais e biologia molecular.** Dissertação de Mestrado- Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, 2014.

COSTA, V.M.**Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido láctico.** Dissertação de mestrado, ESALQ-USP, 2006.

CHIEPPE, J.J.B;-**Tecnologia e fabricação do álcool.**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Góias, Inhumas-Goiás,2012.

DORTA, C. O. **Sinergismo Entre Sulfito, Ácido Láctico, Ph E Etanol Na Fermentação Alcoólica De *Saccharomyces Cerevisiae*.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, p. 135, **2006**.

FERRARI, F.C.S.; **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**-Dissetação Mestrado- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-São Paulo,2013

FRACARO, J. **Análise Histórica Do Proálcool E Atuais Perspectivas Do Setor Alcooleiro No Brasil.** Monografia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 67, **2005**.

FUGARO, M.H.P. PCR na Micologia. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. N14. P.12-18, 2000.

GALLO, C. R. & CANHOS, V. P. Contaminantes Bacterianos Na Fermentação Alcoólica – Revisão. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 1, p. 35-40, 1991.

GAROMA, T.; BEN-KHALED, M. & BEYENE, A. Comparative Resource Analyses for Ethanol Produced from Corn and Sugarcane in Different Climatic Zones. **International Journal of Energy Research**, v. 36, p. 1065-1076, 2012.

GODOY, S. G. M. **O Protocolo De Kyoto E O Mecanismo De Desenvolvimento Limpo: Uma Avaliação De Suas Possibilidades E Limites**. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, p. 151, 2005.

GUIMARÃES, M. **Diversidade E Afiliação Filogenética De Leveduras Associadas À Plantas De Sorgo Sacarino [Sorghum Bicolor (L.) Moench] Cultivadas No Cerrado**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, p. 65, 2016.

IPCC. *Climate Change 2001: The Physical Science Basis*. **Cambridge University Press. Cambridge**, 2007.

JBIC. *Estudos Prospectivos Para Fomento Dos Biocombustíveis No Brasil*. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília**, 2006.

LIBERAL, A. T. D. S. M.; BASÍLIO, A. C.; RESENDE, A. D. M.; BRASILEIRO, B. T. V.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F., SIMÕES, D. A. & DE MORAIS JR, M. A. Identification of *Dekkera Bruxellensis* as a Major Contaminant Yeast in Continuous Fuel Ethanol Fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 538-547, 2007.

LIMA, L. R. & MARCONDES, A. A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira**. Curitiba: Ed. UFPR, 2002. 248.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção De Etanol. In: LIMA, U. A. (Ed.). São Paulo: Editora Blucher, v.3, 2001.

MORAES, M. A. J.; MENEZES, J. A. S.; ELSZTEIN, C. Polyhexamethyl biguamide can eliminate contaminant yeast from fuel-ethanol fermentation process. *Journal of Applied Microbiology*, 2008.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, v.21, p. 231-241, 1997.

NOGUEIRA, A. M. P. & VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente De Cana**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, p. 71, **2005**.

OLIVA-NETO, P. & YOKOYA, F. Evaluation of Bacterial Contamination in Fed-Batch Alcoholic Fermentation Process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVA-NETO, P.;C.DORTA; CARVALHO,A.F.A; LIMA;V.M.G;SILVA D.F.**The Brazilian technology of guel ethanol fermentation-yeast inhibition factores and new perpectives to improve the technology**. Formatex-Materials and processes for energy: communicating current research and tecnological developments.2013.

RAVANELI, G. C. **Qualidade Da Matéria-Prima, Microbiota Fermentativa E Produção De Etanol Sob Ataque De *Mahanarva Fimbriolata* Em Cana-De-Açúcar**. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”, Jaboticabal-SP, p. 90, **2010**.

ROZA, D. O Caminho Da Cana: O Processo De Transformação Da Cana-De-Açúcar Ensina Importantes Lições Sobre O Aproveitamento Total De Recursos. **Weg em Revista**, v. 7,n. 53, p. 1-20, 2008.

SANTIN, T. **A Evolução Da Produção Da Cana-De-Açúcar E Do Álcool Combustível Na Região Sudeste Do Brasil De 1975 À 2005**. Monografia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, p. 79, **2006**.

STECKELBERG, C. **Caracterização De Leveduras De Processos De Fermentação Alcoólica Utilizando Atributos De Composição Celular E Características Cinéticas**. Tese de Doutorado, Universidade estadual de Campinas, Campinas-SP, p. 86, **2001**.

STUPIELLO, J. P. Cana De Açúcar: Como Matéria-Prima. In: PARANHOS, S. (Ed.). **Cana-De-Açúcar: Cultivo E Utilização**. . Campinas: Fundação Cargil, v.2, 1987. p.761-804.

SUHAIMI, S. N.; PHANG, L. Y.; MAEDA, T.; ABD-AZIZ, S., WAKISAKA, M.; SHIRAI, Y. & HASSAN, M. A. Bioconversion of Glycerol for Bioethanol Production Using

Isolated *Escherichia Coli* Ss1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2 p. 506-516, 2012.

UNICA. União Da Indústria De Cana-De-Açúcar. Usina Virtual. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/usina-virtual> >, Acesso em: fevereiro de 2017.

VENTURA, M. & ZINK, R. Rapid Identification, Differentiation, and Proposed New Taxonomic Classification of *Bifidobacterium Lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6429-6434, 2002.

WALKER, G. Yest Nutrition. In: (Ed.). **Yeas Physiology and Biotechnology**. Chichester: John Wiley and Sons Lda, 1998. cap. 3.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. & AMORIM, H. V. Fuel Etanol after 25 Years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, 1999.









## Isolado-ITB-M-I2-YPD-16C

CWTATtaccatcgaggaaagaaaccaacagggattgccttagtaACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTT  
 GAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGgTAACCTTTGGAGTTGGCCCTTCTA  
 TGTTCCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGGTGTCARTTCGTAAAGT  
 GCTTYAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAAT  
 ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGGAA  
 AAAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGCTTGAGATCAGATGGTATTTTGCAAGCCTATCCTTCGTGGA  
 GAGGTTTATTACAGCTTACCGGGCAGCATCGGTTATGGTAATAATGCATTGAATGTGCTCTTGAGTG  
 TTATGCCTTTGTTGATCGATCTAGACCGAGGACTGCGTCTTgactaggatgctggcgaatgatcttccgcccgtctga  
 cSMGGA

## Isolado-ITB-M-I1-YPD-16C

KYYTTagaggaaaaaaccaaccgggattgccttagtaACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCT  
 GGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTT  
 CTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGT  
 GCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAA  
 ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAG  
 AGTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTC  
 TGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAA  
 TCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGA  
 GGACTGCGACGTAAGTCAAGGAtgctggcgaatgatcttccgcccgtctga

## Isolado-TRP-M-I2-YPD-16C

WWggaaaaaaccaaccgggattgccttagtaACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGT  
 ACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTTCTT  
 GGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCC  
 TTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATA  
 TTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGT  
 GAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGC  
 TCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCC  
 ATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGA  
 CTGCGACGTAAGTCaaggatgctggcgaatgatcttccgcccgtctga

## Isolado-ITB-V-I1-YPD-16C

KSccaaccgggattgccttagtaacgGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG  
 CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGGAC  
 GTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCCTTCGAAGAGTC  
 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  
 CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTAAAAAGTACG  
 TGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGT  
 AGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTA  
 GCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAA  
 Gtcaaggatgctggcgaatgatcttccgcccgtctga

## Isolado-TRP-M-I3-YPD-16C

MKgaaccaaccgggattgccttagtaACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTC  
 GGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTTCTTGAACA  
 GGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCCTTCGAA  
 GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCG  
 AGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  
 GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTG  
 TGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGA  
 ATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGA  
 CGTAAgtaaggatgctggcgaatgatcttccgcccgtctga

## Isolado-ITB-V-I4-YPD-16C

taatccatgggcgccgccccggggggggggtgactacagtgggcgggcccctgtagcgggccctccctcaggtggttttctgacccccctac  
 aaagtaacgccccgggtaaaacgaagTtaaccgcagtcctcagctagctggcagtatccacaaggctataaacactcaccgaagccgtg  
 ccacattctggttttctaccgccaactgatgctggccgataaaactgaaggccacccccgaaaaagtaacaaaggaaataccaagtctgat  
 ctagccctccccttcaacaattcacgtacttttcaactctcttcaaaagtctttcatctttccatcactgtactgttctgctatcggtctctgccaatattag  
 ctttagatggaatttaccacccactaagctgcattcccaacaactccactcttaaggaactttacataggactggatcatcccatcccacgggat  
 tctcaccctctgtgacattctgtccaagaaacatacaagaggcacacccccagatccttctcaaaattacaactcggactctgaaaagcatat  
 atttagctttgcctcactcgcgctctaggcgatcccggcttttccaaatgcaa

## Isolado-TRP-V-I2-YPD-1C

ttKtGaaagaaaccaacagggattgcCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGG  
 CTCTTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTG  
 GAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCTC  
 TCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATAT  
 TGGCGAGAGACCGGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTG  
 AAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCT  
 TCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGA  
 ATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGC  
 GTTTATACCTAGGAtggtgcataatgatctaagccCaacaa

## Isolado-TRP-V-I2-YPD-16C

ttttttttttSKAcacagggatcgcccttagtagcgGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTT  
 CAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACA  
 GAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCCCTTMAAG  
 AGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGA  
 GAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG  
 TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTgAGATCAACTTGGTATTTYGTWTGTTACTTYTTTCGGGG  
 GTGGCCTCTACGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAAATgCGTTGGAATGTGGCA  
 CGGCTTCGTTGTGTGTTATAGCCTTYGTSaGATACTGCCSCCTAGAGAGGATGCGGTWaCaatcccccta  
 accaa

## Isolado-TRP-M-I2-YPD-1C

atthaatgattaaactaaaaaatattttcccccttgattacgggaggaaaagaaccCgGSRKKRARSSSGCAAAAAGMTCAA  
 ATTTGAAATMTGGTACYTTYGGaTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTYGT  
 TATGTTCTTGAACAGGAMGTCATAGAGGGTGAGAATCCCSTGTGGSGAGGAGTGCGGTCTTTGTAA  
 AGTGCCTTSAAGAGTCAGTTGTTTGGGAATGCACTCTWAGTGGGTGGAATCCATCTAAAGCTAAATAT  
 TGGAAGACCATCAACAATACGTGGGAAAGATAAAAAACTTTGAAAAGAAGTAAAAATACTGAATTTTGA  
 AAGGGAGGGCTTTGATTGGTGTGTTTGTGCCCTYTGTCTYTTGKGGGTRGGGGAATCTCCTTTCTGGGCCCT  
 CGTTTTGGTGGATAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCGGTAAGTTATGTGGAGCCTGGGACTGAGATGCC  
 TACaaac

## Isolado-TRP-M-I1-YPD-1C

ttWGKKAaagaaaccaacagggattgccttagTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGG  
 CTCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTG  
 GAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCTT  
 TCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATAT  
 TGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTG  
 AAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCT  
 TCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGA  
 ATGTGGCACGGCTTCGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGC  
 GGTTatacctaggatgtggcataatgatctaAgTcRCCYM

## Isolado-ITB-M-I4-YPD

GaaaaaaccaacaggggaTTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCT  
 CTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGA  
 ACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCTTTC  
 GAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTG  
 GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAA  
 AAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCTTC  
 GGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGAAT  
 GTGGCACGGCTTCGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGG  
 TTTATACCTAGgatgtggcataatgatctaagtcgcccMt

## Isolado-ITB-V-I3-YPD-1C

RSGARRaaccaaccgggattgccttagtaacggcgagtgaaagCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTC  
 GGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACA  
 GGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGAGGAGTGCAGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAA  
 GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCG  
 AGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  
 GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTG  
 TGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGA  
 ATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCCA  
 CGTAAgtcaaggatgctggcataatggttatatgcccgtcttaaaaccgca

## Isolado-TRP-V-I4-YPD-1C

gaaaagaaaccaacagggattgccttagtagcgGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTT  
 CAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACA  
 GAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCTTTCGAA  
 GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCG  
 AGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  
 GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCTTCGG  
 GGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGAATGTG  
 GCACGGCTTCGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGTTT  
 ATacctaggatgtggcataatgatctaagtcgcccgt

