

# ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR DE USINA E ENGENHO NO ESTADO DA PARAÍBA

Renata Ellen Clemente da Silva<sup>1</sup>  
Ana Flávia Santos Coelho<sup>2</sup>  
Adna Cristina Barbosa de Sousa<sup>3</sup>

## RESUMO

Leveduras são microrganismos eucarióticos encontrados em diversas fontes da natureza, sendo utilizadas desde a antiguidade na fabricação de pães e bebidas alcoólicas por meio da fermentação alcoólica, processo que consiste na conversão de açúcares fermentescíveis em etanol, gás carbônico e outros compostos secundários. Substratos como a cana de açúcar, com composição rica em fontes energéticas, baixo pH e constante visitação de insetos são considerados um bom hábitat para estes microrganismos, que têm grande importância industrial e econômica. O presente trabalho teve como objetivo estudar a biodiversidade de leveduras associadas a caldo de cana-de-açúcar, a partir do isolamento e identificação de microrganismos presentes em amostras de caldo de cana, e avaliar as linhagens isoladas quanto ao seu potencial fermentativo. Para isso, as amostras foram inoculadas em placas de Petri e oito colônias que apresentaram aspecto diferente das demais foram isoladas, tendo sido identificadas quatro leveduras dos gêneros *Saccharomyces* sp. e *Candida* sp., e uma bactéria do gênero *Bacillus* sp. Com exceção desta última, todos os demais isolados foram submetidos ao estudo da capacidade fermentativa, avaliada em tubos de ensaio contendo caldo YM formulado e caldo de cana em diferentes valores de sólidos solúveis totais (8, 12, 15 e 18 °Brix). Cinco dos sete microrganismos estudados apresentaram boa capacidade de iniciar ou realizar a fermentação alcoólica nos valores de sólidos solúveis totais estudados, principalmente em concentrações de 15 e 18 °Brix, tendo o isolado 6 se destacado por expressiva formação de gás na maioria dos tubos de ensaio estudados.

**Palavras-chave:** Levedura, Caldo de cana, Fermentação alcoólica, °Brix.

---

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, renata.ellen03@outlook.com;

<sup>2</sup> Doutora em Engenharia Agrícola, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, anaflaviascoelho@gmail.com;

<sup>3</sup> Doutora em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, adnasousa@cbiotec.ufpb.br.

## INTRODUÇÃO

Leveduras são definidas como microrganismos eucarióticos unicelulares, pertencentes ao reino Fungi, que se reproduzem por meio de brotamento ou fissão binária. São encontradas na natureza em diversas fontes, como solo, água, frutos e vegetais, tendo sido utilizadas desde a antiguidade na fabricação de pães e bebidas alcoólicas, por meio da fermentação. Atualmente, a utilização das leveduras também abrange a síntese de enzimas (OLIVEIRA, 2015a), vitaminas, gorduras e proteínas (HEINZ, 2014), além de biocombustíveis, tendo grande importância industrial e econômica.

Calcula-se que apenas 1% de todas as espécies de leveduras existentes tenha sido descrita até o momento (MOHD AZHAR et al., 2017). Isto, associado ao fato de o Brasil possuir uma ampla biodiversidade, expande a possibilidade de descoberta de novas espécies com potencial biotecnológico (MAUTONE, 2008). Frutos e substratos como a cana de açúcar, com composição rica em fontes energéticas como carboidratos e lipídios, baixo pH, e constante visitação de insetos são considerados um bom hábitat para diversos microrganismos, especialmente leveduras (OLIVEIRA, 2015b), que podem vir a servir como *starter* para a fermentação alcoólica.

Conforme dados do IBGE (2020), no ano de 2019 a produção de cana de açúcar no Brasil, maior produtor mundial dessa gramínea (CONAB, 2019), foi de quase 753 milhões de toneladas, sendo mais de 5 milhões na Paraíba. No Brasil, a utilização da cana-de-açúcar é voltada principalmente para a produção de etanol, açúcar e bebidas alcoólicas como a cachaça ou aguardente. Essas bebidas são produzidas por meio da fermentação alcoólica, processo que consiste na transformação dos açúcares fermentescíveis presentes no mosto em etanol, gás carbônico e outros compostos secundários. A principal espécie de levedura utilizada nestes processos fermentativos é a *Saccharomyces cerevisiae*, por ser capaz de tolerar altas concentrações de etanol (12 a 15%) e açúcar no mosto. A qualidade da bebida fermento-destillada está diretamente ligada à população microbiana presente durante o processo fermentativo e na maturação, sendo estas determinantes para o rendimento de etanol e compostos secundários (PATARO; ROSA, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da biodiversidade de leveduras associadas ao substrato caldo de cana-de-açúcar, a partir do isolamento e identificação de microrganismos presentes em amostras de caldo de cana, e avaliação do potencial fermentativo dos microrganismos isolados. Para isso, amostras foram coletadas e inoculadas

em placas de Petri contendo dois tipos de Ágar. Oito microrganismos foram isolados, tendo sido quatro deles identificados como leveduras dos gêneros *Saccharomyces* sp. e *Candida* sp., e uma bactéria do gênero *Bacillus* sp. Com exceção desta última, todos os demais isolados foram submetidos ao teste fermentativo, utilizando tubos de ensaio contendo caldo YM formulado e caldo de cana em diferentes valores de sólidos solúveis totais (8, 12, 15 e 18 °Brix). Cinco microrganismos isolados apresentaram boa capacidade de iniciar ou realizar a fermentação alcoólica nos valores de sólidos solúveis totais (°Brix) estudados, principalmente em concentrações de 15 e 18 °Brix, tendo o isolado 6 se destacado por expressiva formação de gás na maioria dos tubos de ensaio estudados.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta das amostras e preparo do material**

As amostras de caldo de cana-de-açúcar foram coletadas em usina sucroalcooleira (no recebimento da cana-de-açúcar a ser utilizada no processo) e engenho (na alimentação da dorna de fermentação) do Estado da Paraíba, utilizando garrafas pet previamente higienizadas. As vidrarias, meio de cultura e mosto utilizados na análise foram esterilizados em autoclave (121°C, 1 kgf/cm<sup>2</sup> - 15 min), visando eliminar contaminação por microrganismos ausentes à amostra, e toda a análise foi feita utilizando o bico de Bunsen.

### **Análise e isolamento dos microrganismos**

Para avaliar o meio de cultura que apresentasse melhores condições para o desenvolvimento dos microrganismos, a análise foi iniciada utilizando Ágar Nutriente e Ágar Batata Dextrose. Após o preparo de três diluições da amostra ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) utilizando água peptonada esterilizada 0,1%, foi feita a semeadura por espalhamento em superfície (0,1mL) de todas as amostras coletadas, sendo inicialmente a da usina feita nos dois tipos de Ágar, e a do engenho, posteriormente, somente em Ágar Batata Dextrose. As placas de Petri foram incubadas em estufa à  $25 \pm 2$  °C durante 48-72h, e após crescimento as colônias foram selecionadas e purificadas em Ágar Batata Dextrose, utilizando a técnica de esgotamento. Aquelas que apresentaram crescimento foram armazenadas em tubos de ensaio contendo Ágar Batata Dextrose inclinado, ambos incubados à  $25 \pm 2$  °C durante 48h.

### **Identificação dos microrganismos isolados**

A identificação dos gêneros dos microrganismos isolados foi realizada no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia da UFPB, utilizando uma metodologia de cultura em lamínulas para observação microscópica da estrutura de cada isolado. Para isso, cada colônia isolada e armazenada em ágar inclinado foi inoculada em placa de Petri contendo Ágar Batata Dextrose, em três pontos distintos, marcados no exterior da placa com caneta. A alça de níquel cromo foi flambada em bico de Bunsen e contaminada com a colônia, que foi depositada na placa sucessivamente nos três pontos marcados. Lamínulas foram imersas em álcool 70%, secas em papel absorvente, e então depositadas com o auxílio de uma pinça sobre cada ponto marcado, onde os microrganismos foram depositados anteriormente. As lamínulas não foram flambadas após imersão em álcool por serem frágeis e quebrarem facilmente, conforme verificado em teste feito previamente.

As placas contendo as lamínulas foram incubadas à  $25 \pm 2$  °C durante aproximadamente 120h, quando verificou-se crescimento de microrganismos na maioria delas. Para a leitura no microscópio, uma gota de corante foi depositada no centro de uma lâmina, sobre a qual foi posta uma lamínula retirada da placa, com o crescimento de microrganismos voltado para cima.

### **Avaliação da capacidade fermentativa**

Para a avaliação do potencial fermentativo foram preparadas placas purificadas, utilizando a técnica de esgotamento, de cada um dos microrganismos isolados, armazenados em ágar inclinado. Estas placas foram incubadas à  $25 \pm 2$  °C durante 48h.

Foram utilizados como mosto caldo YM esterilizado (3 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 5 g/L peptona, 10 g/L dextrose), caldo de cana esterilizado e caldo de cana in natura, sendo cada linhagem inoculada no caldo de cana de origem, do qual foi isolada. Além disso, os sólidos solúveis totais (°Brix) de cada uma das duas amostras de caldo de cana foi medido, utilizando um refratômetro de bancada, e as amostras foram diluídas com água destilada a fim de atingir valores determinados de sólidos solúveis totais (8, 12, 15 e 18 °Brix), conforme a equação seguinte:

$$D = [(Bc \cdot Vc)/Bd] - Vc$$

Em que D é o volume de água a ser adicionado ao caldo de cana, Bc o °Brix inicial medido do caldo, Bd o °Brix final desejado, e Vc o volume utilizado da amostra.

Após o ajuste, uma parte de cada amostra de caldo de cana foi preparada para inoculação imediata (*in natura*) e outra parte foi submetida a esterilização em autoclave (121°C, 1kgf/cm<sup>2</sup> - 15 min), para posterior inoculação.

Para cada microrganismo isolado, a alça de Níquel Cromo foi contaminada com duas colônias da placa purificada e inserida no tubo de ensaio contendo o mosto e tubo de Durham. Também foram preparados dois tubos controle para positivo e negativo de cada mosto em cada valor de °Brix estudado, sendo um deles sem inóculo e outro inoculado com duas colônias de *Saccharomyces cerevisiae*. A incubação foi feita a 30 ± 2 °C durante 24h, quando foi verificado se houve indício de atividade fermentativa nos tubos de ensaio, evidenciada pela formação de bolhas ascendentes no tubo e/ou no interior do tubo de Durhan.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise e isolamento dos microrganismos

Todas as placas de Petri inoculadas com ambas as amostras de caldo de cana apresentaram crescimento microbiano, das quais foram selecionadas 11 colônias que apresentaram aspecto diferente das demais para serem isoladas. As colônias 1 a 10 foram selecionadas das placas mistas inoculadas com a amostra de caldo de cana proveniente da usina (sendo de 1 a 5 provenientes de Ágar Nutriente, e de 6 a 10 provenientes de Ágar Batata Dextrose), enquanto a colônia 1b foi selecionada da amostra oriunda do engenho, inoculada em Ágar Batata Dextrose. Como as análises das duas amostras não foram feitas de forma simultânea, apenas na primeira utilizou-se o Ágar Nutriente, quando se verificou melhor resultado utilizando o Ágar Batata Dextrose.

Todos os 11 microrganismos foram semeados pela técnica do esgotamento em Ágar Batata Dextrose, sendo que as placas inoculadas com os microrganismos 1, 2, 3, 4 e 9 não apresentaram crescimento. O isolamento destes foi então refeito, porém novamente os microrganismos 1, 2 e 4 não apresentaram crescimento em Ágar Batata Dextrose.

De acordo com o *Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media*, o Ágar Nutriente é destinado ao cultivo de bactérias, enquanto o Ágar Batata Dextrose é utilizado no cultivo de bolores e leveduras (ZIMBRO et al., 2009). Sendo assim, acredita-se que estes microrganismos que não apresentaram crescimento em Ágar Batata Dextrose mesmo após uma nova tentativa de isolamento pudessem ser bactérias, já que todos eles foram provenientes de placa mista utilizando Ágar Nutriente.

Dessa forma, os oito microrganismos efetivamente isolados foram: 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 1b, sendo este último proveniente da amostra do engenho. Somente 3 e 5 foram oriundos de placa mista utilizando Ágar Nutriente, tendo sido todos os demais isolados de placas mistas utilizando Ágar Batata Dextrose.

### Identificação dos microrganismos isolados

Os microrganismos isolados foram morfológicamente descritos no Quadro 1 de acordo com a observação de suas características macroscópicas na placa purificada, considerando parâmetros como textura, cor, superfície, borda e elevação conforme Viana (2017).

Quadro 3: Descrição morfológica macroscópica dos microrganismos isolados.

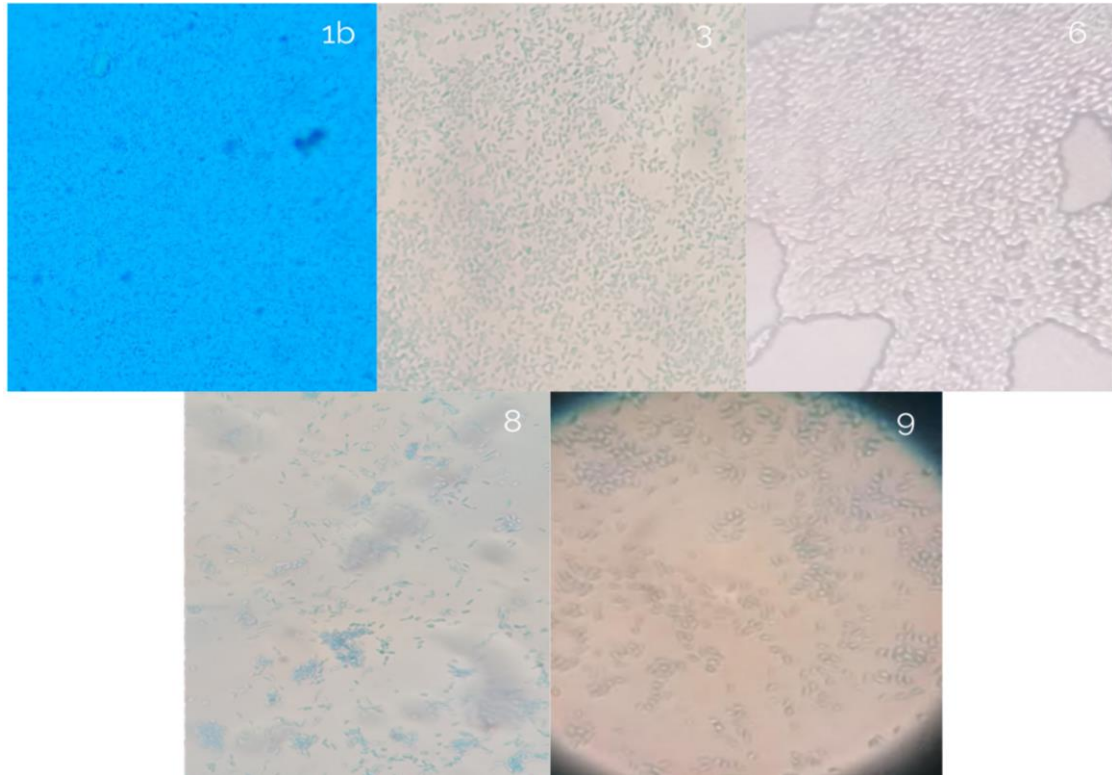
	1b	3	5	6
<b>Textura</b>	Brilhante	Brilhante	Brilhante	Brilhante
<b>Cor</b>	Amarelada	Branca	Amarelada	Esbranquiçada
<b>Superfície</b>	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
<b>Borda</b>	Arredondada	Redonda bem definida	Arredondada	Arredondada
<b>Elevação</b>	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
<b>Aparência</b>	Leitosa	Leitosa	Leitosa, com bordas mais transparentes	Cremosa
<b>Tamanho</b>	Média	Pequena	Média	Pequena
	7	8	9	10
<b>Textura</b>	Brilhante	Opaca	Brilhante	Brilhante
<b>Cor</b>	Laranja	Branca	Amarela	Branca
<b>Superfície</b>	Lisa	Levemente rugosa	Lisa	Lisa
<b>Borda</b>	Arredondada	Redonda bem definida	Redonda bem definida	Redonda bem definida
<b>Elevação</b>	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
<b>Aparência</b>	Leitosa	Cremosa, semelhante a um papel	Leitosa	Cremosa
<b>Tamanho</b>	Média	Pequena	Pequena	Pequena

Fonte: Autoria própria.

Dentre os oito microrganismos isolados, foi possível identificar o gênero de 5 deles (3, 6, 8, 9 e 1b), tendo sido observada uma bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* sp. (isolado 3). Acredita-se que sua presença tenha ocorrido por ter sido isolada de placa mista utilizando Ágar Nutriente, que conforme citado anteriormente, é favorável ao cultivo de bactérias. O microrganismo 5 apresentou crescimento exacerbado, enquanto o 7 e o 10 não cresceram o suficiente para terem seus gêneros identificados. Os isolados 1b e 8 foram identificados como

leveduras do gênero *Candida* sp., e 6 e 9 como *Saccharomyces* sp., e suas micrografias estão ilustradas na figura 1.

Figura 1: Micrografia dos microrganismos isolados e identificados.



Fonte: Autoria própria.

Dados da literatura corroboram com os resultados encontrados, no que diz respeito a diferença na quantidade de leveduras isoladas de amostras coletadas em diferentes pontos da produção, de diferentes locais, bem como as espécies isoladas, destacando-se *Saccharomyces* sp. e *Candida* sp.. Cabrini e Gallo (1999) identificaram leveduras presentes na produção de álcool durante um semestre em uma usina no estado de São Paulo, em amostras de caldo primário, mosto e leite de leveduras. Foram identificadas 72 leveduras, sendo 30 do caldo primário, 14 do mosto e 28 do leite de leveduras, pertencentes a 15 espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis* e *Pichia*. Martins; De Lima; Martins (2015) estudaram leveduras de caldo de cana da dorna de uma indústria de fermentação alcoólica no estado do Ceará, tendo isolado 69 cepas que foram morfológicamente caracterizadas e testadas quanto ao seu metabolismo, sendo identificadas como *Saccharomyces* spp (40,6%), *Candida* spp (36,2%), *Pichia* spp (21,7%) e *Hansenula* spp (1,4%).

## Avaliação da capacidade fermentativa

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) medido para a amostra de caldo de cana coletada no engenho foi de 14,4 °Brix, inferior ao valor medido para a amostra da usina, igual a 20,4 °Brix. Sendo assim, não foi possível alcançar por diluição os valores de 15 e 18 °Brix para o caldo de cana do engenho. Acredita-se que essa diferença nos valores de sólidos solúveis totais inicial tenha se dado devido ao ponto de coleta de cada amostra ter sido diferente nos dois locais, além das diferentes origens da cana-de-açúcar.

Diversos fatores podem afetar o rendimento e eficiência da fermentação alcoólica, dentre eles a pressão osmótica. Elevados teores de açúcares no mosto podem provocar um estresse osmótico para a levedura, sendo necessário manter esse valor dentro de uma faixa ótima (LIMA et al., 2001). O teor ideal de sólidos solúveis totais para este objetivo varia entre 14 e 16 °Brix, e valores acima disso podem ocasionar fermentações mais lentas e incompletas (PATARO; ROSA, 2002). Como no engenho o caldo de cana foi coletado na alimentação da dorna de fermentação, acredita-se que já tivesse ocorrido uma diluição prévia para um °Brix de aproximadamente 15, a fim de favorecer a fermentação alcoólica. Já na usina, o caldo foi coletado completamente *in natura*, da cana-de-açúcar moída no momento da coleta, o que pode justificar esse maior teor obtido.

Após o ajuste dos valores de sólidos solúveis totais, os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo como mosto caldo YM e o respectivo caldo de cana, sendo o isolado 1b inoculado no caldo de cana proveniente do engenho, e os demais inoculados no caldo de cana oriundo da usina. Os resultados obtidos após incubação à 30 °C durante 24h estão descritos nos Quadros 2 e 3:

Quadro 2: Resultado do teste fermentativo para a amostra proveniente da usina.

Inóculo	Caldo YM	Caldo de cana-de-açúcar - Origem: Usina							
		In natura				Esterilizado			
		8 °Brix	12 °Brix	15 °Brix	18 °Brix	8 °Brix	12 °Brix	15 °Brix	18 °Brix
5	-	+*	+	+	+	+*	+*	+*	+*
6	-	+	+	+	+	+*	+	+	+
7	-	+*	+	+	+	-	-	-	+*
8	-	-	+	+	+	-	+*	+*	+*
9	-	+*	+	+	+	+*	+*	+*	+*
10	-	+*	+	+	+	+*	+*	+*	+*
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sem inóculo	-	+*	+*	+	+	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria.



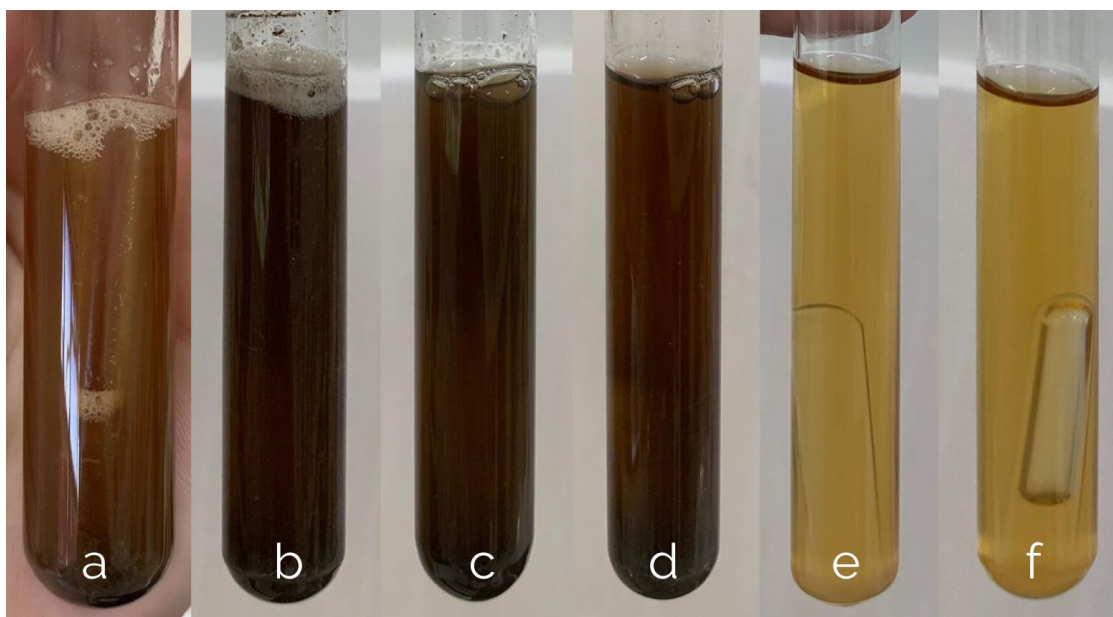
Quadro 3: Resultado do teste fermentativo para a amostra proveniente do engenho.

		Caldo de cana-de-açúcar - Origem: Engenho					
		<i>In natura</i>			Esterilizado		
Inóculo	Caldo YM	8 °Brix	12 °Brix	14,4 °Brix	8 °Brix	12 °Brix	14,4 °Brix
1b	-	-	-	+*	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+
Sem inóculo	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

Foram considerados positivos (+) os tubos que apresentaram expressiva formação de gás, observado pela liberação de bolhas emergentes ou no interior do tubo de Durham. Aqueles que não apresentaram formação de gás foram considerados negativos (-), e os que apresentaram formação de gás em menor quantidade foram descritos como (+\*), ilustrados na figura 2.

Figura 2: Tubo (+) para caldo de cana *in natura* (a), (+) para caldo de cana esterilizado (b), (+\*) com menor formação de gás (c), (-) (d), (-) em caldo YM (e) e (+) em caldo YM (f).



Fonte: Autoria própria.

Somente os tubos controle contendo *S. cerevisiae* apresentaram resultado positivo em caldo YM. Os tubos contendo apenas caldo de cana esterilizado (sem inóculo) apresentaram resultado negativo, conforme esperado, já que a esterilização teve como objetivo eliminar todos os microrganismos existentes na amostra, fazendo com que não fosse possível haver fermentação espontânea.

Os tubos contendo apenas o caldo de cana *in natura* proveniente do engenho também apresentaram resultado negativo, e para essa mesma amostra inoculada com o isolado 1b,

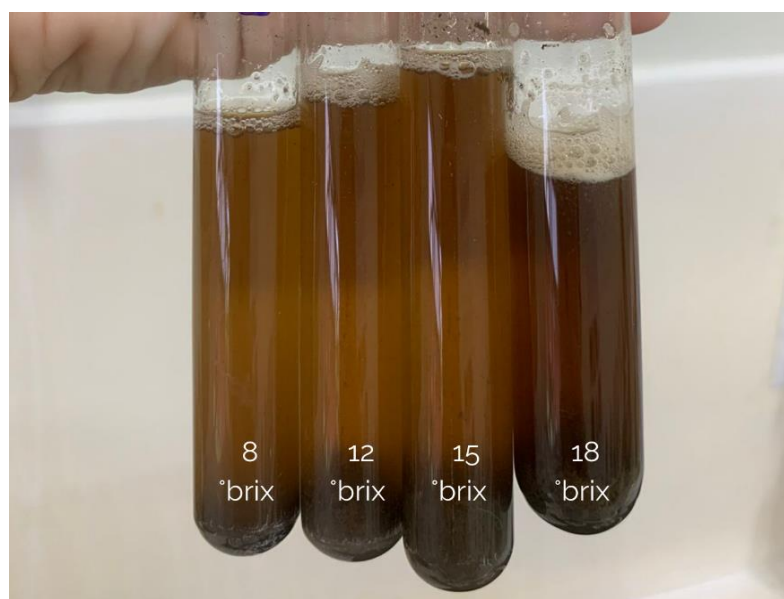
somente houve indício de formação de gás no tubo contendo o caldo *in natura* com 14,4 °Brix, permanecendo negativo todos os que utilizaram como mosto o caldo esterilizado.

Para os demais microrganismos, inoculados na amostra de caldo de cana proveniente da usina, a maioria dos tubos apresentou resultado positivo, com intensa formação de gás principalmente nos tubos de 15 e 18 °Brix.

A partir da análise destes resultados, é possível concluir que valores de 15 e 18 °Brix foram mais favoráveis à fermentação alcoólica com os microrganismos estudados, resultando em maior formação de gás quando comparado a valores de 8 e 12 °Brix. Além disso, a utilização do caldo de cana *in natura* também promoveu formação de gás mais expressiva, o que pode ser explicado pela presença de outras espécies de leveduras trabalhando em conjunto com a espécie inoculada no mosto.

De modo geral, com exceção dos isolados 1b e 7 todos os demais apresentaram boa capacidade de iniciar ou realizar a fermentação alcoólica nos valores de sólidos solúveis totais estudados. O isolado 6, identificado como uma levedura do gênero *Saccharomyces* sp. destacou-se por expressiva formação de gás na maioria dos tubos, tanto no caldo de cana *in natura* quanto no esterilizado, incluindo nos menores valores de sólidos solúveis totais (°Brix), conforme ilustrado na figura 3, evidenciando sua capacidade de iniciar a fermentação alcoólica.

Figura 3: Tubos contendo caldo de cana esterilizado inoculados com o isolado 6 nos Brix 8, 12, 15 e 18.



Fonte: Autoria própria.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior parte dos microrganismos isolados foi proveniente da amostra de caldo de cana coletada na usina, enquanto apenas uma colônia foi isolada da amostra coletada no engenho. Essa discrepância na quantidade de isolados pode ter ocorrido devido à origem da amostra, já que na usina o caldo foi coletado no recebimento da cana de açúcar, que foi moída no momento da coleta, enquanto no engenho a coleta foi realizada na alimentação da dorna de fermentação.

A maioria dos microrganismos estudados apresentou boa capacidade de iniciar ou realizar a fermentação alcoólica, demonstrada pela formação de bolhas de gás emergentes no tubo de ensaio ou no interior do tubo de Durham. Também foi possível observar que valores de 15 e 18 °Brix favoreceram a fermentação alcoólica com os microrganismos estudados. O isolado 6, identificado como uma levedura do gênero *Saccharomyces* sp., destacou-se por expressiva formação de gás na maioria dos tubos de ensaio, tanto no caldo de cana *in natura* quanto no esterilizado, incluindo nos menores valores de sólidos solúveis totais (°Brix), evidenciando sua capacidade de iniciar a fermentação alcoólica.

## REFERÊNCIAS

- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação De Leveduras No Processo De Fermentação Alcoólica Em Usina Do Estado De São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, p. 207–216, 1999.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira cana-de-açúcar - safra 2019/2020. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 6, p. 58, 2019.
- HEINZ, O. **Isolamento de leveduras de amora-preta (*Rubus* sp.) visando fermentação alcoólica**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2019**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pb/pesquisa/14/10193?ano=2019&localidade1=0>>. Acesso em: 23 ago. 2021.
- LIMA, U. A. et al. **Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: 3, 2001.
- MARTINS, S. C. S.; DE LIMA, R. F.; MARTINS, C. M. Isolamento e caracterização de leveduras de caldo de cana de uma indústria de fermentação alcoólica no Nordeste Brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 3019–3035, 1 dez. 2015.

MAUTONE, J. N. **DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE FOLHAS DE FIGUEIRAS DO PARQUE DE ITAPUÃ, RS, BRASIL.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

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

OLIVEIRA, C. F. DE. Isolamento, Caracterização, identificação e seleção de uma levedura fermentadora de Abacaxi (Ananas comosus L.). p. 71, 2015a.

OLIVEIRA, M. DE. Ocorrência, Diversidade e Caracterização Enzimática De Leveduras Isoladas De Frutos Do Cerrado. 2015b.

PATARO, C.; ROSA, C. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário - EPAMIG**, p. 37–43, 2002.

VIANA, N. C. Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica. p. 68, 2017.

ZIMBRO, M. J. et al. **Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media.** 2. ed. Sparks, Maryland: 2009, 2009.