Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica

Nádia Cristina Viana

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

Piracicaba
2017

Nádia Cristina Viana
Tecnóloga em Biocombustíveis

Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

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

Piracicaba
2017

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

Viana, Nádia Cristina

Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica / Nádia Cristina Viana. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

68 p.

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

1. Caracterização 2. Morfologia celular 3. Levedura selvagem 4. *Saccharomyces cerevisiae* I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Paulo e Olga, agradeço pelo carinho, apoio incondicional, pela força e pelos ensinamentos. Por me guiarem e torcerem por mim nesta jornada.

Obrigada por me mostrarem o valor do esforço e do estudo, e por me darem asas para voar em minha própria jornada sem me deixar sem amparo. Obrigada por comemorar minhas vitorias, por secar minhas lágrimas, e por acreditarem em mim. Obrigada por serem meus exemplos. Tem muito do amor de vocês neste trabalho, e por isto, sou eternamente grata!

A vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força para alcançar meus objetivos, pelas bênçãos ao longo do caminho, pelo conforto nos momentos difíceis e pela constante renovação da minha fé.

A Profª Dra. Sandra Helena da Cruz, minha querida orientadora, pela oportunidade dada, por acreditar no meu potencial, pelo grande aprendizado proporcionado neste tempo de convívio. Agradeço pelos conselhos, pelas conversas e por me inspirar nesta jornada.

Ao Dr. Cauré Barbosa Portugal, pelo valioso auxílio e inspiração no desenvolvimento deste trabalho.

A minha querida e melhor amiga Beatris, por me apoiar, torcer por mim, pelas tantas conversas e conselhos, e por sempre enxergar o melhor lado de mim.

As queridas companheiras do LBAB – Anna Flávia, Rafaela, Bianca, Cláudia, Graziela, Amanda e Tânia – pelas conversas, conselhos, pelas risadas e desabafos.

A equipe técnica do LAN – Pedro Lucentini, Rosemary Silva e Sylvino Torrezan – por toda colaboração, amizade e sugestões.

Aos demais professores, funcionários e colegas da Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

To regret one's own experiences is to arrest one's own development.

To deny one's own experiences is to put a lie into the lips of one's own life.

It is no less than a denial of the soul.

Oscar Wilde – De Profundis

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE TABELAS 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVOS 15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
3.1 Processo industrial de fermentação alcoólica utilizado no Brasil 18
3.2 Agentes responsáveis pela fermentação alcoólica 20
3.2.1 Características morfológicas das leveduras 22
3.2.2 Fisiologia e metabolismo em levedura 23
3.3 Leveduras selvagens 24
4 MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1 Micro-organismo e obtenção dos isolados 29
4.2 Reativação dos isolados 29
4.3 Meios de cultura 30
4.4 Análise molecular dos isolados 31
4.4.1 Comparação molecular entre isolados 31
4.4.2 Identificação específica dos isolados por sequenciamento 32
4.5 Estudos morfológicos 32
4.5.1 Plaqueamento utilizando meios diferenciais 32
4.5.2 Microscopia dos isolados 33
4.6 Teste de resistência a temperatura 33
4.7 Teste de capacidade fermentativa 33
4.8 Avaliação de crescimento de leveduras em microplaca 34
4.9 Análise estatística 34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
5.1 Cultivo das amostras de levedura em meio YPD 35
5.2 Análise molecular dos isolados 35
5.2.1 Identificação específica dos isolados por sequenciamento 36
5.3 Estudos morfo-fisiológicos dos isolados 37
5.3.1 Cultivo das amostras em meio WLN 38

5.3.2 Cultivo das amostras em meio BiGGY 40
5.3.3 Cultivo das amostras em meio Nagai 41
5.3.4 Microscopia dos isolados 42
5.4 Teste de resistência a temperatura 44
5.5 Estudos de capacidade fermentativa utilizando tubos múltiplos 45
5.6 Avaliação de crescimento de leveduras em microplaca 46
5.7 Análise de clusters 52
6 CONCLUSÕES 55
REFERÊNCIAS 57
ANEXOS 63

RESUMO

Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é susceptível à presença de contaminantes e controlar este problema é um desafio para a indústria produtora de etanol, sejam os contaminantes bacterianos ou leveduras selvagens. As leveduras selvagens ocorrem naturalmente no ambiente e nos substratos utilizados na fermentação e são mais difíceis de controlar do que contaminações por bactérias; podem causar excesso de produção de espuma, levando a perda do teor alcoólico e perda de eficiência fermentativa. Características morfológicas particulares de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* podem exacerbar estes traços indesejáveis para a fermentação. Métodos de isolamento e identificação de leveduras selvagens podem consistir de testes de resistência à temperatura, avaliação por microscopia e a utilização de meios diferenciais sintéticos, que podem ser utilizados no isolamento de leveduras selvagens dos mais diversos substratos e identificação de características morfofisiológicas. O emprego de técnicas moleculares como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e DNA-*fingerprinting* também são empregadas, sendo capazes de detectar contaminações em pequenas quantidades, além de permitir a diferenciação a nível intra-específico. Foram avaliados 14 isolados de levedura proveniente de ambiente industrial, utilizando as leveduras CAT-1 e PE-2 como linhagens de referência, sendo avaliadas as características morfofisiológicas através de plaqueamento em meio diferenciais como WLN, BiGGY e Nagai, em conjunto com a análise microscópica das células. Os isolados foram também avaliados através de um teste de resistência de temperatura, testes de capacidade fermentativa e crescimento em microplacas em diversos meios. Por fim, foi extraído o DNA das amostras e este foi avaliado através de reação de PCR e sequenciamento a nível intra-específico. Os resultados mostraram grande variação de padrões morfológicos, presença de células deficientes respiratórias *petite* e crescimento consistente em temperaturas elevadas, característica esta geralmente presente em leveduras selvagens. Quanto à capacidade fermentativa, 12 dos 14 isolados apresentaram esta característica nos meios utilizados. No crescimento em microplaca, os isolados apresentaram comportamentos distintos em diferentes meios, quando comparados com as linhagens referência. Por fim, a análise molecular das amostras apresentou diferentes padrões de banda entre si e em comparação com as linhagens referência, e o sequenciamento a nível intra-específico mostrou que todos os isolados pertencem a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: Caracterização; Morfologia celular; Levedura selvagem; *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Morphological and molecular characterization of yeast isolates provenient of alcoholic fermentation

Alcoholic fermentation is susceptible to the presence of contaminants and controlling this problem is a challenge for the ethanol industry, whether it's bacterial contaminants or wild yeasts. Wild yeast naturally occur in the environment and on substrates used in fermentation and are more difficult to control than contamination by bacteria. They may cause excessive foaming, leading to loss of the alcoholic yield and decrease of fermentative efficiency. Particular morphological traits of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts may exacerbate these undesirable traits for fermentation. Methods of isolation and identification of wild yeast may consist of temperature resistance tests, evaluation by microscopy and also the use of synthetic differential media, which can be used to isolate wild yeasts from the most diverse substrates and to identify their morphophysiological characteristics. The use of molecular techniques such as PCR (Polymerase Chain Reaction) and DNA-fingerprinting are also employed, being able to detect contaminations in small quantities, besides allowing intra-specific differentiation. A total of 14 yeast isolates from an industrial environment were evaluated, using yeasts CAT-1 and PE-2 as reference strains. Morphophysiological characteristics were evaluated by plating in differential media such as WLN, BiGGY and Nagai, alongside with microscopic analysis of the yeast cells. The isolates were also evaluated according a temperature resistance test, fermentation capacity tests and a microplate growth assay in several media. Finally, the DNA was extracted from the samples and was evaluated through PCR reaction and sequencing at intra-specific level. The results showed a great variation of morphological patterns, presence of petite respiratory deficient cells and consistent growth at high temperatures, a characteristic that is generally present in wild yeasts. Regarding the fermentative capacity, 12 of the 14 isolates showed this trait in the media used. In the microplate growth assay, the isolates presented different behaviors in different media when compared with the reference strains. Finally, the molecular analysis of the samples presented different band patterns among themselves and in comparison with the reference lines, and the intra-specific sequencing showed that all the isolates belong to the species *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Characterization; Cell morphology; Wild yeast; *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema utilizado para o ensaio de cultivo das amostras em microplaca contendo os meios YPD (roxo), YPSac (azul), MCC (vermelho) e MMel (verde) 34
Figura 2 - Produto da reação de PCR dos isolados e linhagens referência, utilizando marcador de peso molecular (1 kb) 36
Figura 3- Aparência de uma colônia de isolados e linhagens referência selecionada após cultivo em meio WLN a 30ºC após 48 horas 39
Figura 4 - Aparência dos isolados e linhagens referência cultivados em meio BiGGY a 30°C após 48hs 41
Figura 5 – Microfotografia da imagem de células provenientes dos isolados em preparo a fresco após cultivo em YPD a 30°C por 24h. Observação emMicroscópio óptico Zeiss, Axioscope 43
Figura 6 - Crescimento das linhagens referência CAT-1 (superior) e PE-2 (inferior) em meio YPSac2 (vermelho);MMel5 (verde); meio YPD (preto); meio MCC5 (azul), a 30°C por 24 h. 47
Figura 7 - Crescimento dos isolados e linhagens referência no meio YPD a 30°C .. 48
Figura 8 - Crescimento dos isolados e linhagens referência em meio YPSac2, a 30°C 49
Figura 9 - Crescimento dos isolados e linhagens referência em meio MCC5, a 30°C 50
Figura 10 - Crescimento dos isolados e linhagens referência em meio MMel5 a 30°C 51
Figura 11 - Análise de clusters obtida a partir dos dados previamente analisados. R1 = linhagem referência CAT-1, R2 = linhagem referência PE-2. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura dos isolados a partir da data de coleta.....29
Tabela 2 – Composição dos meios utilizados neste trabalho.....30
Tabela 3 - Características morfológicas obtidas dos isolados quando cultivados em meio YPD 35
Tabela 4 - Porcentagem de semelhança dos isolados com o genoma da levedura *S. cerevisiae* utilizando a ferramenta de busca BLASTn 37
Tabela 5- Características morfológicas dos isolados e linhagens referência cultivados em meio WLN.....38
Tabela 6- Características morfológicas dos isolados e linhagens referência cultivados em meio BiGGY* 40
Tabela 7- Avaliação qualitativa dos isolados e linhagens referência cultivados em meio Nagai 42
Tabela 8- Crescimento das leveduras em diferentes temperaturas (T) de incubação em meio YPD 44
Tabela 9 - Capacidade fermentativa (CF) dos isolados e linhagens referência em diferentes meios 45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de etanol proveniente da cana-de-açúcar, e o primeiro a implantá-lo como combustível alternativo aos derivados de petróleo. O etanol combustível é utilizado no país desde 1903, impulsionado pelo Primeiro Congresso Nacional em Aplicações Industriais de Álcool. No entanto a consolidação do álcool combustível no Brasil ocorreu com a criação do Programa Pro-Álcool, implementado em 1975, como um esforço para combater a crise do petróleo (BNDES; CGEE, 2008).

Um reflexo destes esforços foi o aumento impactante da produção, que girava em torno de 500 milhões de litros em 1975; 13 bilhões de litros em 1996 e 30 bilhões de litros na safra 2015/2016 (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2016), outro reflexo foi o desenvolvimento tecnológico dos processos industriais de fermentação (ZANIN et al., 2000).

O processo de fermentação é utilizado desde a antiguidade, com registros da fabricação de pão e bebidas fermentadas pelos egípcios, porém apenas recentemente este processo foi atribuído à levedura, e não a agentes desconhecidos da natureza. Este fungo unicelular, amplamente adaptável e presente em diversos biomas, têm a capacidade de sobreviver aeróbica quanto anaerobicamente. A partir dos estudos de Pasteur, em demonstrar a natureza microbiológica da fermentação, foi descrita a fermentação alcoólica como um processo anaeróbio, culminando na transformação química de açúcar em etanol e gás carbônico pela da levedura. Embora este processo seja de extrema relevância econômica para a sociedade, quer seja na produção de etanol, bebidas fermentadas, alimentos ou outros processos biotecnológicos; ainda assim, é um campo de estudo que ainda permite avanços (LIMA; BASSO; AMORIM 2001).

O processo industrial brasileiro de fermentação alcoólica utiliza, principalmente, o tipo Melle-Boinot, no qual as células de levedura (creme de levedura) utilizadas na fermentação são separadas do vinho (mosto fermentado) por centrifugação. O vinho é enviado para os processos de destilação e as células submetidas a tratamento ácido e enviadas para um novo ciclo fermentativo (AMORIM et al., 2011).

Vários fatores afetam o rendimento do processo fermentativo, inclusive a contaminação microbiana, por bactérias ou leveduras selvagens, que podem ser *Saccharomyces* ou não (AMORIM et al., 2011; LUCENA et al., 2010). As linhagens de leveduras selvagens do tipo *Saccharomyces* e industriais apresentam um metabolismo muito semelhante, o que dificulta controlar a contaminação (AMORIM et al., 2011). Uma solução para este problema é compreender o comportamento dessas leveduras selvagens. O monitoramento da permanência de leveduras selecionadas e o controle de linhagens selvagens são de fundamental importância para garantir não só a eficiência da fermentação,

mas também a economia dos insumos utilizados para controlar os efeitos negativos da contaminação (AMORIM, 2005).

Leveduras selvagens são consideradas nativas do ambiente, e podem causar excesso de produção de espuma, levando a perda do teor alcoólico e perda de eficiência fermentativa. Esta perda é proporcional ao nível de contaminação presente, e modificações na morfologia de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* podem acentuar estes traços indesejáveis para a fermentação (LORENZ et al., 2000).

O isolamento e identificação de leveduras selvagens são realizados utilizando os meios: WL (Wallerstein Laboratory), LYS (Lysine medium), UBA (Universal Beer Agar) e LWYM (Lin Wild Yeast Medium), entre outros. O emprego de técnicas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction) e DNA-*fingerprinting* também são empregadas, sendo capazes de detectar contaminações em pequenas quantidades, além de permitir a diferenciação a nível intraespecífico (LANSING, 2004).

Neste sentido, o estudo tem como objetivo caracterizar isolados de levedura provenientes de ambiente industrial, de modo a observar a presença de características desejáveis para a utilização em culturas starter. Partindo do pressuposto que estes isolados são derivados de um conjunto de fatores como a pressão osmótica, concentração de etanol, tratamento ácido e reciclo, além da presença de contaminantes quer sejam bacterianos ou leveduras.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral é estudar o perfil de isolados de levedura coletados em uma unidade produtora de etanol, utilizando as linhagens comerciais CAT-1 e PE-2 como referência, buscando identificar características desejáveis presentes nestes isolados a fim de utilizá-los como cultura *starter*.

Para este estudo foram analisados:

O perfil molecular dos isolados. As características morfológicas dos isolados cultivados em meios diferenciais. A análise microscópica das células; a resistência dos isolados à temperatura; capacidade fermentativa, e a avaliação do crescimento em microplacas utilizando diferentes meios de cultivo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A obtenção do álcool combustível no Brasil por via fermentativa é a forma mais viável para o Brasil, devido às tecnologias aprimoradas no decorrer do século XX, e, principalmente, pela disponibilidade da matéria prima. O clima e distribuição geográfica do país contribuem para um plantio e produção de cana-de-açúcar que dura o ano todo (DEMIRBAS et al., 2009), sendo de Abril a Novembro na região Centro-Sul e de Setembro a Março na região Nordeste (AMORIM et al., 2011).

O programa brasileiro de utilização da cana-de-açúcar para produção de açúcar e etanol, com co-geração de energia a partir da queima do bagaço, é tido como um modelo de geração de energia sustentável. Visto a demanda pela diminuição da utilização de energia fóssil e o fato de que outras tecnologias de energia renovável, como solar, eólica, entre outras, ainda demandam muito investimento e desenvolvimento de tecnologias de fácil aplicação. A utilização da cana-de-açúcar no Brasil é um exemplo de aproveitamento de recursos naturais abundantes (GOLDEMBERG, 2007).

O processo de fermentação tem início a partir de substratos açucarados, visando à transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono. No Brasil, os substratos mais economicamente viáveis são o caldo de cana-de-açúcar e os melaços (GOLDEMBERG et al., 2007).O caldo de cana-de-açúcar tem como açúcar predominante a sacarose, sendo os açucares redutores, glicose e frutose, em menor quantidade. Após a extração por moagem, o caldo contém de 78a86% de água, 10a20% de sacarose, 0,1a2% de açúcares redutores, 0,3a0,5% de cinzas e 0,5a1% de compostos nitrogenados, com pH na faixa de 5,2a6,8 (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O melaço é proveniente da obtenção de açúcar, sendo obtido na centrifugação da massa cozida para a separação dos cristais de açúcar. A composição do melaço destinado à fermentação varia de acordo com o processo de produção do açúcar utilizado, sendo, geralmente, 62% de açúcares, 20% de água, 8% de cinzas, 3% de matérias nitrogenadas e 7% de outros compostos, como gomas e ácidos. Nesta composição geral, os açúcares se distinguem em 32% de sacarose, 14% de dextrose e 16% de levulose (frutose); o mosto é obtido a partir da diluição do melaço para a faixa de15 a 25ºBrix (VASCONCELOS, 2012).

O processo de obtenção de álcool no Brasil é caracterizado pela fermentação industrial em tanques com volume de 0,5 a 3 milhões de litros, com alta densidade de células de levedura (10 a 15% p/v), utilizando mostos de cana-de-açúcar, melaços ou uma mistura dos dois, num período de 6 a 12 horas, obtendo ao final uma concentração de álcool de 7 a 11% (v/v) e uma quantidade de açucares residual abaixo de 0,1% (AMORIM et al., 2011).

O processo fermentativo brasileiro atual possui algumas peculiaridades, como a dificuldade de esterilizar grandes quantidades de mosto para a retirada da microbiota nativa proveniente do substrato, e também a utilização do reciclo de células para aumentar o número de ciclos fermentativos, o que é possível com a utilização de tratamento ácido que promove o controle de contaminação e a desfloculação das leveduras a serem reutilizadas (SILVA et al., 2015).

3.1 Processo industrial de fermentação alcoólica utilizado no Brasil

O processo de fermentação convencional, denominado **processo clássico**, foi amplamente utilizado nas destilarias brasileiras até o início da década de 60. Para cada fermentação realizada, um novo pé de cuba (inóculo ou fermento) era necessário, sendo que as células de levedura eram eliminadas após a separação do vinho ao fim do processo fermentativo. A fermentação era considerada concluída quando cessava a atividade biológica na cuba, também denominada de dorna, reator ou fermentador, seja por falta de nutrientes, excesso de etanol, ou outro metabólito formado que poderia agir como um inibidor biológico. O etanol era, então, recuperado por meio do processo de destilação e o reator era preparado para um novo processo (LIMA, 1960). A desvantagem do processo clássico é a sua lentidão, uma vez que o reator tem que ser higienizado e preparado, e um novo mosto e pé de cuba (concentrado de levedura) acrescentados antes de cada ciclo (COPERSUCAR, 1987).

Na década de 60, o processo clássico de fermentação começou a ser substituído pelo descontínuo, ou **Melle-Boinot**. O diferencial deste processo é o reciclo do fermento por centrifugação e a alimentação contínua do substrato no fermentador, até o preenchimento da dorna. O inicio deste processo se dá com a multiplicação do fermento em caldo; a dorna é, então, alimentada para dar início a fermentação, misturando o mosto ao fermento durante o abastecimento. Desta maneira, as leveduras introduzidas no processo não se tornam inativas devido a estresse. Após separação por centrifugação, o creme de leveduras é submetido a um tratamento ácido permanecendo em pH em torno de 2,5, com a finalidade de eliminar contaminantes e preparar o fermento para uma nova fermentação (DREWS, 1964; CARVALHO e SATO, 2001).Este processo tem como vantagem a economia de açúcar devido à menor reprodução celular, resultando em maior teor alcoólico no rendimento final. A centrifugação do fermento permite melhor eliminação de bactérias, devido à diferença entre densidade das células, e o tratamento ácido também contribui para uma fermentação mais adequada, eliminando a necessidade de um inoculo puro a cada batelada (ALMEIDA, 1960).

Este processo foi sendo aperfeiçoado para atingir rendimentos de 92-93%, em comparação com os rendimentos de 75-80% obtidos no início do Pro-Álcool.Com o reciclo de células, o processo fermentativo de produção de álcool dura de 200 a 300 dias, variando de acordo com a região, temperatura, variedade de cana-de-açúcar utilizada e demandas do mercado; o reciclo de células é realizado de 400-600 vezes durante a safra(AMORIM et al., 2011). Dados recentes mostram que o rendimento alcoólico é em média 91% em menos de 9h de fermentação (FINGUERUT, 2011).

O reciclo de células apresenta uma vantagem econômica para a indústria, pois permite aumentar o rendimento da fermentação, já que o volume celular utilizado no inicio da fermentação, não requer a utilização do açúcar para gerar células novas, permitindo que mais açúcar seja convertido em etanol. Por esta razão, os processos fora do Brasil, que não utilizam esta técnica, não podem competir com a produção nacional, apresentando valores de rendimento menores. Enquanto existe o consenso de que o processo de fermentação é bem compreendido e executado, pouco ainda se conhece sobre as condições e resposta ao estresse das leveduras, sendo este um grande desafio que o setor ainda enfrenta (AMORIM et al., 2009).

Na década de 80 após a consolidação do **processo Melle-Boinot**, houve um aumento de interesse pelo processo de fermentação continuo. Com custo de produção reduzido, este processo permite fermentações de alta eficiência, produzindo vinhos com maior teor alcoólico, resultado em menor volume de vinhaça e consumo de vapor na produção (ANDRIETTA; STUPIELLO, 1990). Este processo tem como vantagem reduzir os efeitos inibitórios do etanol e do açúcar no desempenho da levedura, e apresenta um aumento significativo de rendimento, podendo chegar a 100% em comparação com uma fermentação em batelada alimentada, além da modernização da usina e redução com gastos de mão de obra. O processo contínuo possibilita a redução de tempo não produtivo e maior controle operacional (RODRIGUES et al., 1992).

No **processo contínuo** ocorre a retirada e alimentação contínuas de mosto e vinho fermentado. A dorna é alimentada com um fluxo contínuo de mosto na concentração desejada, e o vinho também é retirado continuamente e encaminhado para destilação. A levedura, que passa por tratamento ácido, também é alimentada continuamente ao processo. O mosto fermentado segue para as centrifugas onde a fase pesada, o creme de levedura, é enviada ao tanque de tratamento ácido, e a fase leve, constituída pelo vinho delevedurado, segue para uma dorna de destilaria, sendo enviado em seguida para as colunas de destilação. A alimentação do processo pode ser feita por melaço diluído, caldo de cana, ou uma mistura de ambos. Este mosto passa por um pré-tratamento de modo a eliminar impurezas grosseiras e minimizar contaminantes de origem microbiana (LIMA et al., 2001).

O processo de fermentação mais utilizado atualmente no Brasil é o de batelada alimentada, ou Melle-Boinot, cuja maior vantagem é a recuperação do fermento do vinho por meio de centrifugação, sendo utilizado para novo ciclo de fermentação (BNDS; CGEE, 2008). O sistema de batelada é utilizado em 85% das destilarias nacionais, o restante do etanol é produzido por fermentação contínua multiestágio (baseado na fermentação por Guillaume) com reciclo da levedura (CGEE, 2009). Este sistema não foi amplamente adotado, pois apresenta dificuldades operacionais na ocorrência de uma infecção em larga escala.

O sistema Melle-Boinot tem como vantagem melhor rendimento e mensuração da fermentação, além de menor choque na levedura durante o processo e maior teor alcoólico. Além de ser um processo mais flexível no caso de problemas técnicos durante a fermentação, possibilita melhor higienização e assepsia das dornas (AMORIM, 2005).

3.2 Agentes responsáveis pela fermentação alcoólica

As leveduras são utilizadas pela humanidade a mais de seis mil anos, nos processos de fermentação, no preparo de pães, bebidas alcoólicas, etanol e outros. Como anaeróbia facultativa que é, seu metabolismo se ajusta às condições do meio, e os produtos finais obtidos dependem das condições ambientais nas quais a levedura se desenvolve (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A levedura mais conhecida e estudada é a *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo eucariótico unicelular do filo Ascomycota, o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, sendo considerado um organismo modelo para pesquisa (GOFFEAU et al., 1996), o que pode auxiliar a compreensão da estrutura celular e metabolismo de eucariotos superiores (WALKER, 1998).É um fungo robusto, capaz de suportar condições estressantes, apresenta alta eficiência fermentativa e crescimento rápido em meio líquido (REIS et al., 2013).

Em 1680, Antonie van Leeuwenhoek observou pela primeira vez a presença de leveduras na cerveja utilizando um microscópio (AMORIM, 2005), e Louis Pasteur descreveu a verdadeira causa da fermentação, no século XIX, estabelecendo a relação do metabolismo de leveduras como a *S. cerevisiae*, que metabolizam açúcares em etanol (ROMANO et al., 2008).

A descoberta da atividade metabólica microbiana no século 19 impulsionou o desenvolvimento dos processos industriais que utilizam leveduras e suas mais diversas aplicações. A levedura *S. cerevisiae* é o maior expoente das aplicações biotecnológicas, porém, atualmente, mais de 1500 espécies de leveduras já foram identificadas, sendo estas

consideradas leveduras “não convencionais”, cujo grande potencial ainda não foi totalmente elucidado (MATTANOVICH et al., 2014).

As leveduras possuem a capacidade de crescer em ambientes anaeróbicos, convertendo açúcar em álcool e dióxido de carbono. Já em condições de aerobiose as leveduras formam dióxido de carbono e água, produzindo mais células e se multiplicando mais rapidamente (COPERSUCAR, 1987). Leveduras apresentam ambos os tipos de reprodução – sexuada por esporulação com formação de ascósporos, e assexuada por brotamento (AMORIM et al., 1996). Na reprodução por brotamento, uma pequena saliência aparece na célula mãe, que aumenta gradualmente até que a passagem de material entre elas se feche, deixando uma cicatriz de brotamento na célula de origem e originando duas células fisiologicamente distintas. A esporulação se dá a partir da formação de esporos sexuais, através da meiose (COPERSUCAR, 1987).

A presença da reprodução sexuada é uma característica desejada para a realização de estudos genéticos por conta da meiose, permitindo a inserção de genes e criação de novas linhagens, esta forma de reprodução geralmente acontece sob condições de estresse (FEDERHEN et al., 2000).Lopes (2000) desenvolveu um estudo constatando que as leveduras como a PE-02, BG-1, VR-1, CAT-1, CRI-I e SA-I possuem excelente capacidade de esporulação quando em ambiente favorável e condição aeróbica.

As leveduras encontradas na microbiota de fermentações industriais são bons exemplos de microrganismos com características desejáveis em escala industrial, sendo resistentes a fatores estressantes como estresse osmótico e altas concentrações de etanol, e estas se tornam candidatas a processos de melhoramento que visam suprir as demandas por microrganismos mais eficientes (MUSSATTO et al., 2010). A maioria das leveduras industriais utilizadas no estado de São Paulo não é proveniente de modificações genéticas, mas sim de um processo de seleção de cepas com características desejáveis, ocorrido nas próprias usinas, durante o processo industrial (AMORIM, 2005).

As linhagens utilizadas nas diversas unidades industriais produtoras de etanol no Brasil são: SA-1 (proveniente da usina Santa Adélia), BG-1 (usina Barra Grande), CAT-1 (usina Virgolino de Oliveira, Catanduva-SP) e PE-2 (usina da Pedra) (BASSO et al., 2008). Estas linhagens foram isoladas e caracterizadas por cariotipagem; esta técnica permite observar o perfil genético das leveduras presentes no processo (LOPES, 2000).

As linhagens CAT-1 e PE-2 apresentam históricos de 14 a 19 anos de utilização com abrangente capacidade de implantação em processos industriais, sendo amplamente utilizadas em diversos processos, regiões e safras (BASSO et al., 2008). Estas duas linhagens de grande relevância eram, inicialmente, linhagens selvagens, ou nativas, que contaminaram os fermentadores e, posteriormente, foram selecionadas do processo e

industrializadas, deste processo se originam as linhagens mais eficientes disponíveis no mercado, tendo inicio no estudo da microbiota local da fermentação (BROWN et al., 2013).

Outros processos de seleção de leveduras que são realizados inicialmente em escala de bancada, normalmente, não obtêm sucesso quando introduzidos em escala industrial, pois as leveduras em questão não são capazes de sobreviver à pressão dos contaminantes e as condições de estresse do processo de reciclo e do tratamento ácido, não sendo capazes de permanecer no processo por mais de um mês. Estas leveduras não são resistentes o suficiente para as condições das usinas brasileiras e não estabelecem dominância sobre leveduras selvagens, *Saccharomyces* ou não, e os experimentos realizados em bancada não são capazes de reproduzir condições de estresse em escala fidedigna (AMORIM et al., 2011).

Leveduras de panificação, utilizadas como starter para processos fermentativos, e as linhagens comerciais TA e NF, não foram capazes de competir com as linhagens selvagens que contaminaram o processo, e apenas uma linhagem selvagem (JA-1) previamente isolada de uma destilaria, foi capaz de estabelecer dominância no processo e sobreviver ao tratamento ácido do reciclo de células (BASSO et al., 1993). Resultados similares foram obtidos por Silva-Filho et al. (2005), onde apenas linhagens provenientes de isolamento em usinas produtoras de etanol demonstraram capacidade de permanência durante a safra. Tais resultados foram obtidos empregando técnicas de cariotipagem e PCR, de modo a determinar a presença de leveduras selvagens ao longo do processo.

Embora a seleção de linhagens nativas, que apresentam bom desempenho para a fermentação, renda ótimos resultados, esse processo é demasiadamente laborioso e nem sempre bem sucedido. É preciso que a linhagem de interesse apresente bom rendimento, características morfofisiológicas adequadas tais como alta capacidade de dominância e resistência a fatores estressantes, não apresentar ação floculante e baixa formação de espuma (DELLA-BIANCA et al.,2013).

3.2.1 Características morfológicas das leveduras

As células de levedura foram descritas, inicialmente, como ovais, e com reprodução por brotamento. No entanto, outras morfologias de célula foram sendo observadas: células esféricas, mais comum na espécie *Debaromyces*; células apiculais, ou comumente conhecidas como "formato de limão", encontradas em *Hanseniaspora*; células em formato triangular, características do gênero *Trigonopsis,* e ainda células filamentosas, constituídas de células unidas entre si formando um pseudo-micélio (PHAFF et al., 1966). As formas mais comuns são as esféricas, globosas, ovoides ou alongadas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Estas diferenças morfológicas alteram a maneira de organização das colônias e

podem indicar diferença de desempenho fermentativo entre os gêneros (PHAFF et al., 1966).

As células de levedura, quando cultivadas em meio sólido, apresentam aparência lisa ou rugosa, características que podem ser utilizadas para diferenciação entre linhagens ou como reconhecimento de sinais de estresse celular (AMORIM et al., 1996). Em especial, as colônias de aspecto rugoso com morfologia do tipo pseudo-hifas são indesejadas no processo fermentativo por poderem apresentar características floculantes e tempo maior de fermentação quando comparadas com colônias de aspecto liso. Embora seja comum o uso de leveduras floculantes na produção de certas bebidas, como cerveja, vinho e outros destilados, as leveduras com esta característica não são consideradas adequadas para a produção de etanol (REIS et al., 2013).

A utilização de meios diferenciais ou seletivos no controle de populações de levedura selvagem é um recurso importante e relativamente de baixo custo, cujos resultados são obtidos geralmente de dois a três dias após o plaqueamento, com a exceção de organismos fastidiosos, que requerem maior tempo de incubação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). O meio WL (Wallerstein Laboratory), que é utilizado na identificação e isolamento de leveduras selvagens, bactérias e fungos no processo de fermentação, é um bom exemplo deste recurso, pois possui o corante Verde Bromocresol, que é metabolizado de diferentes maneiras por diferentes linhagens de levedura, permitindo identificação visual dos padrões morfológicos (JESPERSEN; JAKOBSEN, 1996).

Outros meios como o UBA (Universal Beer Agar), Wild Yeast Medium, meios contendo lisina, entre outros, também são utilizados na detecção e caracterização de leveduras selvagens. Além disso, devem ser realizadas amostragens, de mosto, água de alimentação e *swabs* dos equipamentos e fermentadores, com frequência para detectar possíveis focos descontaminação, e ainda, quando possível, realizar testes a nível molecular, tendo em vista que o sequenciamento permite detectar e identificar contaminantes com maior nível de precisão (WHITE, ZAINASHEFF, 2010).

3.2.2 Fisiologia e metabolismo em levedura

O processo metabólico das leveduras se dá tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas, absorvendo nutrientes essenciais pela membrana celular, como o nitrogênio e o carbono, obtido de açúcares e utilizado na síntese de constituintes citoplasmáticos. O processo de degradação de substratos realizado pela célula é conhecido como catabolismo (FEDERHEN et al., 2000). A fermentação e a respiração aeróbica são exemplos de via catabólica, que transfere energia contida em compostos orgânicos para moléculas de ATP, degradando compostos orgânicos através da fosforilação oxidativa (WALKER, 1998).

O meio ideal para o crescimento de leveduras deve ter um pH ácido, na faixa de 4,5 a 5,0, faixa esta que inibe o crescimento bacteriano. Com relação à temperatura a faixa é mais ampla, variando entre 0 a 47ºC, dependendo da espécie. A temperatura considerada ideal para o crescimento celular está entre 20 a 30ºC (COPERSUCAR, 1987).

Pasteur verificou em seus experimentos que as leveduras obtinham energia tanto na presença como na ausência de oxigênio, através da degradação de glicose. Na presença de oxigênio, as leveduras liberam maior quantidade de energia, e, portanto, se multiplicam mais rapidamente. A presença de oxigênio é indispensável quando se quer obter maior volume celular, porém quando se deseja fermentação para obtenção de álcool etílico, é necessária condição de anaerobiose, onde a degradação da glicose é incompleta e ocorre a formação de dióxido de carbono (AMORIM, 2005).

O processo de fermentação é definido como a degradação de glicose para obtenção de energia na forma de ATP, e ocorre no hialoplasma da célula. O processo compreende duas etapas, a glicólise a redução do piruvato (FEDERHEN et al., 2000). A glicólise é definida literalmente como a quebra da glicose, gerando adenosina trifosfato (ATP), que transfere as ligações de fosfato para a construção de novas células. Essa reação é a principal fonte de energia para a célula da levedura, porém não acontece sozinha (COPERSUCAR, 1987). A glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato em reações sucessivas, denominada glicólise; o piruvato é convertido em etanol e CO_2. Porém, parte do ácido pirúvico formado na glicólise é direcionado a outro ciclo, onde é oxidado através de ações enzimáticas formando acetilcoenzima A, utilizada na construção de moléculas maiores(FEDERHEN et al., 2000).

Durante a oxidação do piruvato ocorre troca de elétrons entre um par oxidante-redutor NAD, assim como ocorre troca de fosfatos entre o par ATP-ADP. O funcionamento destes ciclos pode explicar porque em determinadas situações ocorre maior produção de etanol e CO_2 e em outras, maior produção de células e CO_2, e também como a célula interage com o pH, temperatura e concentrações de sais do meio, além da produção de piruvato e glicerol. Os principais fatores que impactam a fermentação em leveduras são a presença ou ausência de oxigênio e a disponibilidade de glicose. Estes fatores permitem observar que a produção de álcool, CO_2 e biomassa pela levedura acontecem de forma extremamente controlada, onde a célula sempre visa tomar a rota mais energeticamente eficiente, seja para reprodução ou produção de etanol (COPERSUCAR, 1987).

3.3 Leveduras selvagens

O processo de fermentação está sujeito à contaminação por bactérias, principalmente as Gram-positivas como *Lactobacillus* ou *Bacillus*, e leveduras selvagens,

sendo estas *Saccharomyces* ou não. Estes contaminantes competem com as linhagens utilizadas pelas usinas, sobrevivendo nos fermentadores por meio do reciclo de células e devido à dificuldade em esterilizar grandes volumes de mosto e equipamentos (AMORIM et al., 2011).

Leveduras nativas, popularmente conhecidas como selvagens, são provenientes do ambiente, podendo ser introduzidas na fermentação através do substrato, água alimentadora do processo e pela falta de assepsia nas dornas. As leveduras que apresentam características contaminantes são consideradas um grande problema para a indústria de fermentação alcoólica. Porém, algumas destas leveduras nem sempre apresentam características contaminantes, e tardam a serem identificadas, caso não ocorra o constante monitoramento das dornas através de controles biológicos (CECCATO-ANTONINI, 2010). Algumas destas leveduras apresentam bom rendimento fermentativo e podem ser selecionadas como a levedura de processo em safras seguintes. Geralmente, a contaminação é detectada quando ocorre queda no rendimento da fermentação, excesso de floculação e produção de espuma ou outros sinais típicos da presença de leveduras contaminantes (PRIEST; CAMPBELL, 2003).

As leveduras selvagens que se encaixam no perfil desejado para processos de seleção apresentam alta eficiência fermentativa combinada com a capacidade de tolerância aos estresses, e também a capacidade da linhagem de exercer dominância e permanecer no processo (BASSO et al, 2008). A dominância de uma linhagem é definida pela proporção desta na população encontrada no fermentador, característica esta dependente do grau de competitividade com relação a outras linhagens e sua velocidade de crescimento. Já a persistência é a capacidade da linhagem de permanecer no processo resistindo a múltiplos fatores estressantes (DELLA-BIANCA, 2013).

Leveduras floculantes são um dos grandes problemas enfrentados pelos produtores de açúcar e álcool, visto que no processo de reciclo de células a massa de levedura passa por uma centrifugação, e a presença de leveduras floculantes reduz a eficiência desta etapa do processo, produzindo um creme de leveduras menos concentrado. O creme de levedura menos concentrado passa por grande condição de estresse durante o tratamento ácido, podendo vir a ter sua atividade celular diminuída ou morrer completamente. Outro efeito negativo é a concentração destas leveduras no fundo das dornas, deixando grandes quantidades de açucares residuais e aumentando o tempo de fermentação (AMORIM et al., 2011).

Embora o inóculo starter das fermentações industriais seja feito com linhagens selecionadas e aprimoradas para uso comercial, como PE-2, CAT-1 e SA-1, a microbiota da fermentação é rica, e em grande parte dos casos é detectada a presença de mais de uma

levedura selvagem, altamente competitiva, que estabelece dominância ou age em consórcio com a linhagem comercial (PALLMAN, 2001).

Leveduras isoladas na unidade industrial Santa Elisa foram isoladas por Cabrini e Gallo (1999) que conseguiram identificar 19 espécies, entre os gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia* e *Trichosporon*, com predominante presença da espécie *S. uvarum* durante todo o período da safra analisada. Leveduras do gênero *Candida* são comumente isoladas em processos fermentativos, porém as leveduras que mais causam danos no processo são *Dekkera*, ou *Brettanomyces* (CECCATO-ANTONINI, 2010).

O controle de contaminações bacterianas pode ser realizado com o uso de agentes antimicrobianos, porém contaminações por leveduras selvagens apresentam maior nível de dificuldade de manejo. Leveduras não-*Saccharomyces* podem ser controladas com mudanças no processo, já leveduras *Saccharomyces* selvagens representam um desafio maior, pois seu metabolismo é muito similar ao das linhagens comerciais (BASÍLIO et al., 2008).

Avaliando o desempenho de linhagens de leveduras selvagens, isoladas como contaminantes em uma indústria produtora de etanol, Parazzi, Silva e Araújo (2002) observaram que uma linhagem se destacou em relação à viabilidade celular, se adaptando perfeitamente as condições do meio. Por outro lado, outra linhagem selvagem apresentou um desempenho fermentativo bastante inferior, mas com maior crescimento celular, e quando presente no processo industrial pode causar perdas irrecuperáveis durante a fermentação alcoólica.

Detectar e isolar leveduras selvagens, uma vez que constatada sua presença na fermentação, é parte indispensável do controle microbiológico. Algumas das ferramentas de identificação são os meios diferenciais, testes fermentativos e técnicas de identificação moleculares, entre outras, e sua escolha e aplicação depende da estrutura do local e de pessoal qualificado disponível. Meios de cultura diferenciais ou seletivos permitem isolar e identificar leveduras selvagens das leveduras do processo, através de características fisiológicas e morfológicas, como necessidades nutricionais específicas, resistência a determinados compostos e interação com corantes (CECCATO-ANTONINI, 2000).

Além das técnicas convencionais, como a observação e contagem direta em microscópio, outras técnicas podem ser aliadas, empregando técnicas de identificação a nível molecular, que permitem identificar e diferenciar leveduras selvagens das linhagens comerciais com maior segurança, e acompanhar substituições de linhagens ao longo do processo por meio de identificação intraespecífica (SILVA-FILHO et al., 2005).

Quando identificado um caso de contaminação por levedura selvagem que cause prejuízo considerável no rendimento da fermentação, a melhor ação é a substituição do fermento contaminado, juntamente com o reforço das condições de assepsia e controle de

qualidade dos substratos alimentados no processo, e controle das condições de fermentação (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Atualmente, não existem produtos ou processo específicos para o controle destas leveduras que não venham a afetar também as linhagens comerciais, criando um constante desafio para os produtores. Portanto, se faz necessário o controle microbiológico da fermentação, visando minimizar perdas de rendimento, que podem se traduzir em milhões de litros de etanol, e utilizar agentes antimicrobianos de forma eficiente (AMORIM et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP.

4.1 Micro-organismo e obtenção dos isolados

Amostras de vinho (mosto fermentado) contendo leveduras foram coletadas diretamente nas dornas de fermentação na Usina Santa Helena, safra 2013/2014, safra esta que teve início em 04/04/2013. A linhagem de levedura utilizada na unidade Santa Helena era a PE-2. As colônias que apresentaram perfil de bandas diferente do apresentado para a linhagem PE-2, obtidos em gel de agarose, foram selecionadas por Silva e Viana (2013), resultando em 24 isolados, que foram mantidos em glicerol 40% sob refrigeração a – 80°C. Estes isolados foram primeiramente identificados através de uma reação de PCR simples.

As amostras utilizadas no presente trabalho são provenientes do trabalho anterior de Silva e Viana (2013). As linhagens comerciais PE-2 e CAT-1, fornecidas pela empresa LNF Latino América, foram utilizadas no presente trabalho como referência.

4.2 Reativação dos isolados

Os isolados foram cultivados em meio YPD, após diluição seriada. Embora tenham sido selecionadas cinco colônias por amostra, nem todas puderam ser reativadas (Tabela 1), totalizando 14 isolados para o presente trabalho.

Tabela 1 - Nomenclatura dos isolados a partir da data de coleta

Datas de coleta*	***Identificação dos isolados***
03/05/2013	A1 até A5
28/05/2013	B1
29/06/2013	C1, C2, C4
10/10/2013	D1 até D5

*data de coleta aleatória, de acordo com a disponibilidade do fornecedor

Para a manutenção das células, colônias de cada isolado foram inoculadas em meio YPDagar inclinado (*slants)* para melhor conservação, a aparência dos slants está apresentada no Anexo E.

As amostras também foram armazenadas em freezer -80ºC, após o cultivo em meio YPD líquido a 30ºC por 24h sob agitação (100 rpm), em incubadora tipo shaker (New

Brunswick, Psycrotherm). A seguir, 0,8 mL da cultura foram transferidos para tubos Eppendorf (1,5 mL) acrescidos de 0,2 mL de glicerol 80%.

4.3 Meios de cultura

Os meios utilizados para os estudos morfo-fisiológicos das células de levedura foram: o YPD e os meios diferenciais WLN (Wallerstein Laboratory), BiGGY (Bismuth Sulfite Glucose Glicine Yeast) e Nagai. A avaliação do crescimento dos isolados foi realizada utilizando os meios YPD, YPSac2, MCC5 e MMel5. Os meios YPSac10, MMel12 e MCC15 foram utilizados para os ensaios de Capacidade Fermentativa dos isolados. A composição dos meios está apresentada resumidamente na Tabela 2 e Anexos A e B.

Tabela 2 – Composição dos meios utilizados neste trabalho

Meio de cultivo	***Composição (g/L)***	***Item***
BiGGY	Meio preparado de acordo com as instruções do fabricante (BBL)	
Nagai[1]	Meio - glicose 20; peptona 1,5; extrato de levedura 1,5; sulfato de potássio 1,5; sulfato de amônio 1,5; sulfato de magnésio 1,0 e ágar 12 Corante - eosina amarela Y 0,008 e azul de tripan 0,015	Item 4.4
MCC5	Caldo de cana 5º Brix	Item 4.7
MCC15	Caldo de cana 15º Brix	Item 4.6
MMel5	Melaço clarificado[2] a 5º Brix	Item 4.7
MMel12	Melaço clarificado[2] a 12°Brix	Item 4.6
YPD	Extrato de levedura 10, peptona 20, glicose 20 e Agar 15 Quando necessário acrescido de Cloranfenicol 100 mg/L	
YPD líq.	Extrato de levedura 10, peptona 20 e glicose 20	Item 4.7
YPSac2	Extrato de levedura 10, peptona 20 e sacarose 20	Item 4.7
YPSac10	Extrato de levedura 10, peptona 20 e sacarose 100, pH ajustado para 5,0	Item 4.6
WLN	Meio preparado de acordo com as instruções do fabricante (Difco)	Item 4.4

1 – O meio e corante foram autoclavados separadamente por 30 minutos e misturados após atingir temperatura na faixa dos 55°C.
2 – O melaço clarificado foi preparado diluindo partes iguais de melaço e água, equivalente em massa, após homogeneização em agitador magnético (Tecnal TE-0851), o pH foi ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico 10N e autoclavado a 121ºC, 1 atm por 15 minutos. Após resfriamento, o melaço foi mantido em repouso, em geladeira por 48 horas, para, então, ser coletado o sobrenadante e utilizado como melaço clarificado.

4.4 Análise molecular dos isolados

4.4.1 Comparação molecular entre isolados

Uma alçada de colônias de cada isolado, crescidas previamente em meio YPD, foi transferida para tubo Eppendorf estéril contendo 1mL solução salina com o auxílio de uma alça de platina e centrifugada a 2046 *g* por 3 minutos em minicentrífuga (Kasvi, 6400 rpm), descartando o sobrenadante e mantendo as células.

O DNA total foi extraído do precipitado adicionando 200 µL do tampão de lise e acrescentando microesferas de vidro estéreis (*glass beads*) de modo a facilitar a extração. Cada amostra foi agitada durante 1 min em agitador tipo Vortex (Phoenix, AP56) e, então, mantida em repouso por 15 min. A seguir, as amostras foram submetidas a aquecimento em água fervente por 15 min, e submetidas à agitação durante 1 min. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas e submetidas a congelamento por 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para tubos Eppendorf estéreis.

Um controle negativo, contendo apenas o tampão, foi incluído para a extração. O Buffer de lise para extração de DNA foi preparado25 mL de solução buffer foi utilizado 12,5 mL de Tris (1 M), com pH ajustado para 8,0; autoclavado e posteriormente acrescido de 178 µL de 2-mercaptoetanol, ajustando então o volume final em balão volumétrico com água Milli-Q.

Amostras do DNA extraído dos isolados e linhagens-referência, foram submetidas a comparação molecular utilizando reação de PCR, com o conjunto de *primers* delta12-delta2, segundo Xufre et al. (2011). O *primer* delta 2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAAC-3') foi descrito por Ness et al. (1993) e o *primer* delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') foi desenhado por Legras e Karst (2003).

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (Bio-RadiCycler), em 25 µL de solução, sendo 1 µL do DNA extraído, 1,0 U da enzima *Taq* Polimerase (Pharmacia), tampão Taq (Tris-HCl10 mM, KCl50 mM; Nonidet P-400,08%), 20 mol de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP e 2,5 mM $MgCl_2$. Após a desnaturação inicial (95ºC por 4 min), as amostras foram submetidas a 35 ciclos na seguinte programação: 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos e finalmente 72°C durante 10 minutos.

A eficiência de extração e a qualidade do DNA extraído foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) e tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), utilizando voltagem constante de 90 V durante 2,5 horas. As amostras de DNA foram carregadas no gel com o auxílio do tampão (glicerol 30% (p/v), azul bromophenol 0,25%, EDTA 20 mM). Depois de coradas com brometo de etídio (0,5 $\mu g.mL^{-1}$) as bandas de DNA foram

visualizadas em um transiluminador UV e fotografadas. No gel foi utilizado o marcador molecular M100 pb (Amersham Biosciences e Fermentas).

4.4.2 Identificação específica dos isolados por sequenciamento

Para a comparação específica os isolados foram submetidos à extração de DNA. O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando o kit Wizard Genomics DNA (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas por meio da reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), baseado no domínio D1/D2do rDNA 26S, como descrito por Kurtzman e Robnett (1998). O produto da amplificação (~ 600 pares de bases, pb) foi purificado utilizando o kit Charge Switch PCR Clean-up (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento Sanger foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/ USP).

As sequências foram analisadas utilizando o software ChromasPro (versão 1.49; Technelysium Pty. Ltd., Austrália) e a ferramenta de busca BLASTn[1] (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information) para comparação com sequências incluídas na base de dados GenBank[2] (NCBI) para que fosse realizada a determinação da espécie.

4.5 Estudos morfológicos

4.5.1 Plaqueamento utilizando meios diferenciais

Os meios WLN e BiGGY e Nagai foram preparados conforme composição apresentada na Tabela 1. Após o preparo das Placas de Petri, cada placa foi dividida em quadrantes, cada um inoculado por um isolado.

Os isolados foram inoculados pontualmente com o auxilio de uma agulha de platina, perfurando levemente a superfície do meio; em seguida, as placas foram incubadas em estufa (Soc. Fabbe, modelo 116) a 30°C por 48 horas, exceto para o Meio Nagai cujas placas foram incubadas a 30°C durante 5 dias.

Após o tempo requerido, as características morfológicas e de coloração foram analisadas.

Cada isolado foi inoculado em triplicata.

---

[1]http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast
[2]http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

4.5.2 Microscopia dos isolados

Uma alçada das colônias de levedura, cultivadas em meio YPD, foi ressuspensa em 1mL de solução salina (9 g.L-1). Uma gota desta solução foi transferida para lâmina de vidro e submetida à observação microscópica em microscópio (Zeiss, Axioscope).

4.6 Teste de resistência a temperatura

Uma alçada de células de levedura, provenientes de cultivo recente em placa contendo meio YPD foi transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina. Após contagem do número de células em suspensão, utilizando a câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para $1x10^8$ células/mL e desta solução foram inoculados 200µL em meio YPD, com auxílio de espalhador de células.

As placas inoculadas foram incubadas em estufa (SocFabbe, modelo 116) a 30, 33, 36, 39 e 42ºC durante 4 dias (REIS, 2011). Após o tempo estipulado as unidades formadoras de colônias foram contadas manualmente.

4.7 Teste de capacidade fermentativa

Obtenção de inoculo

A partir de colônias obtidas em meio YPD, uma alçada de células de cada isolado foi diluída em 1 mL de solução salina (9 $g.L^{-1}$). A densidade óptica (D.O.) dos inóculos foi monitorada em espectrofotômetro (Femto700S) a 600 nm, de modo a garantir a medida mais próxima de 0,1 D.O.

Fermentação em tubos múltiplos

Os ensaios fermentativos utilizando a técnica de tubos múltiplos foram realizados em tubos de ensaio contendo tubos de Durham, invertidos (van DIJKEN et al., 1986; MOREIRA et al., 2015).

A cada conjunto de tubos foram adicionados 7 mL dos meios fermentativos: YPSac10, MMel12 e MCC15 (composição descrita na tabela 2). Após esterilização, em autoclave a 121ºC e1atm por 15 min e resfriamento, os meios foram inoculados com 500 µL do inóculo e incubados em B.O.D (Tecnal TE-391) a 30°C por 24 horas.

Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.8 Avaliação de crescimento de leveduras em microplaca

O crescimento dos isolados e linhagens referência foi analisado utilizado um leitor de microplacas com capacidade para leitura de 96 micropoços (Tecan Infinite M200, RChisto).

Cada amostra foi analisada em triplicata, em quatro meios diferentes: YPD, YPSac2, MCC5 e MMel5, na respectiva ordem, segundo o esquema apresentado na Figura 1.A composição dos meios está apresentadas na Tabela 2.

Em cada micropoço foi inoculado 50 µL de uma suspensão de células, obtida conforme descrito no item 4.6, e 50 µL do meio de cultivo 2x concentrado.Em todas as placas foi utilizado um controle negativo contendo 50 µL de meio e 50 µL de solução salina ($9gL^{-1}$).

O cultivo foi realizado a 30ºC com leitura de absorbância (densidade óptica – D.O.) em comprimento de onda 600 nm, a cada 2h durante 24h.

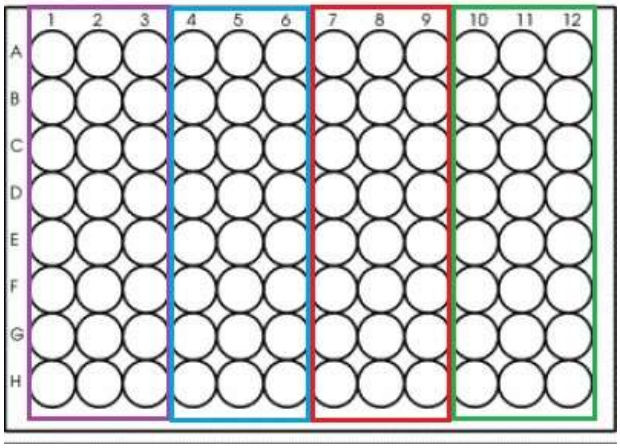


Figura 1 - Esquema utilizado para o ensaio de cultivo das amostras em microplaca contendo os meios YPD (roxo), YPSac (azul), MCC (vermelho) e MMel (verde)

4.9 Análise estatística

A interação entre os resultados de caracterização morfo-fisiológica e o crescimento máximo obtido nos meios YPD e YPSac foi avaliada por análise de *cluster* por similaridade. Os dados qualitativos foram transformados em quantitativos através da atribuição de valores.

As análises estatísticas dos valores padronizados foram realizadas com o pacote estatístico SAS 9.3

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras de levedura coletadas em uma usina durante diferentes períodos da safra 2013/2014 foram submetidas à plaqueamento e seleção resultando em 14 isolados. Este material foi analisado sob diferentes aspectos a fim de analisar o perfil dos isolados, buscando identificar isolados com características desejáveis para ser utilizado como cultura *starter*. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

5.1 Cultivo das amostras de levedura em meio YPD

O cultivo dos isolados e das linhagens referência, PE-2 e CAT-1, em meio YPD (acrescido de cloranfenicol) propiciou a obtenção de colônias de aspecto liso ou rugoso, ambas de coloração creme, sendo as de aspecto rugoso predominante (64%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Características morfológicas obtidas dos isolados quando cultivados em meio YPD

Isolado	Aspecto	Isolado	Aspecto
A1	Liso	**D1**	Rugoso
A2	Liso	**D2**	Rugoso
A3	Liso	**D3**	Rugoso
A4	Rugoso	**D4**	Rugoso
A5	Rugoso	**D5**	Rugoso
B1	Rugoso		
C1	Liso		
C2	Liso	**CAT-1**	Liso
C4	Rugoso	**PE-2**	Liso

*Cultivo a 30°C por 48h

5.2 Análise molecular dos isolados

A análise genômica dos isolados e linhagens referência foi realizada a partir da reação de PCR baseada nos polimorfismos interdelta, utilizando *primers* específicos. O genoma da levedura *S. cerevisiae* contém regiões de sequências de DNA repetitivos, como as regiões delta, e o posicionamento e número dessas regiões possui padrões intraespecíficos, que podem ser utilizados para diferenciar (*genetic finger printing*) e identificar espécies de levedura isoladas de processos ou de microbiota local (XUFRE et al., 2011).

O produto da eletroforese em gel de agarose (Figura 2) mostra os perfis de banda obtidos a partir do marcador molecular (1 kb).

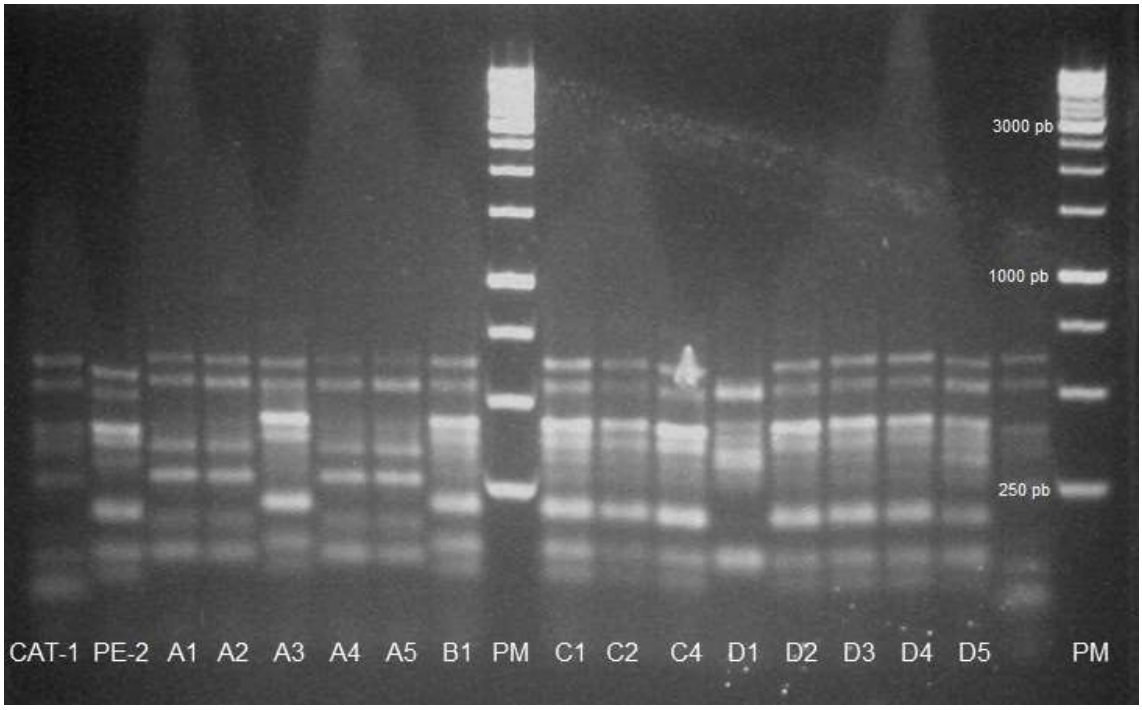


Figura 2 - Produto da reação de PCR dos isolados e linhagens referência, utilizando marcador de peso molecular (1 kb)

Fonte: arquivo pessoal

A observação dos perfis de banda obtidos dos isolados de fermentação e das linhagens referência, CAT-1 e PE-2, permite identificar (a) padrões distintos entre os isolados e (b) entre os isolados e as linhagens referência.

O perfil de bandas obtidos dos isolados A1, A2, A4 e A5, provenientes de início de safra, apresenta semelhança entre si, enquanto os perfis de B1 e C1 apresentam semelhança com os perfis obtidos para os isolados C2 e C4, sendo que B1 a C4 são provenientes de meio de safra. Os isolados D2, D3, D4 e D5 (provenientes de final de safra) são semelhantes entre si. O perfil de bandas obtido pelo isolado A3 parece ser similar ao perfil da linhagem referência PE-2; o perfil obtido para o isolado D1 não apresentou semelhança entre os demais isolados nem com as linhagens referência, o que evidencia a diversidade dos isolados selvagens presentes em uma fermentação alcoólica.

5.2.1 Identificação específica dos isolados por sequenciamento

As sequências de DNA extraídas dos isolados e linhagens referência foram submetidas a sequenciamento; as sequências obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta de busca BLASTn. A comparação permitiu analisar os dados a nível de semelhança (Tabela 4). Esta ferramenta analisa a sequência isolada com um banco de

dados de sequências conhecidas, e um algoritmo estatístico gera um percentual de semelhança. Todos os isolados e linhagens referência são da espécie *S. cerevisiae*.

Tabela 4 - Porcentagem de semelhança dos isolados com o genoma da levedura *S. cerevisiae* utilizando a ferramenta de busca BLASTn

Isolados	Descrição	Query cover*	Identificação
CAT-1	*S. cerevisiae*	100%	100%
PE-2	*S. cerevisiae*	100%	100%
A1	*S. cerevisiae*	100%	99%
A2	*S. cerevisiae*	100%	100%
A3	*S. cerevisiae*	100%	100%
A4	*S. cerevisiae*	100%	100%
A5	*S. cerevisiae*	100%	100%
B1	*S. cerevisiae*	99%	100%
C1	*S. cerevisiae*	100%	100%
C2	*S. cerevisiae*	100%	99%
C4	*S. cerevisiae*	100%	100%
D1	*S. cerevisiae*	100%	100%
D2	*S. cerevisiae*	100%	100%
D3	*S. cerevisiae*	100%	99%
D4	*S. cerevisiae*	100%	100%
D5	*S. cerevisiae*	100%	99%

*Query cover = percentual da sequência buscada que corresponde a uma sequência conhecida no banco de dados, gerada através de um algoritmo estatístico

5.3 Estudos morfo-fisiológicos dos isolados

As células dos isolados de levedura foram cultivadas em meio WLN, BiGGY e Nagai com a finalidade de avaliar as características morfológicas e fisiológicas dos isolados.

O meio BiGGY permite a identificação da produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), um produto secundário da fermentação alcoólica e responsável por um odor desagradável, produzido por certas linhagens de levedura; o bismuto presente na composição do meio é responsável por sua identificação (NETO; MENDES-FERREIRA, 2005).

O meio WL é utilizado na identificação de leveduras selvagens, bactérias e fungos, devido a presença do corante verde Bromocresol, um indicador de pH que pode ser metabolizado por diferentes microrganismos. Diferentes linhagens metabolizam o corante de

maneira distinta, permitindo identificar padrões morfológicos individuais (JESPERSEN; JAKOBSEN, 1996).

Por outro lado, o meio Nagai (NAGAI, 1963) permite a identificação da presença de deficiência respiratória hereditária em leveduras, na forma de colônia tipo *petite*.

5.3.1 Cultivo das amostras em meio WLN

As características dos isolados cultivados em meio WLN foram descritas de acordo com as características morfológicas exibidas pelas colônias (Tabela 5). O meio WLN permite identificar diferentes colorações, morfologias e texturas dos isolados, possibilitando diferenciar linhagens que podem vir a exibir características distintas e de interesse em um processo fermentativo. A utilização deste meio permite o monitoramento da diversidade de populações de leveduras nativas (PALLMAN et al., 2001). A aparência de uma colônia selecionada de cada isolado está apresentada na Figura 3 e a aparência das placas obtidas está apresentada no Anexo F.

Tabela 5- Características morfológicas dos isolados e linhagens referência cultivados em meio WLN

Isolado	Diâmetro	Textura	Cor	Superfície	Borda	Elevação
CAT-1	8 mm	Brilhante	Verde claro	Lisa	Lisa	Convexa
PE-2	6 mm	Brilhante	Verde claro	Lisa	Lisa	Convexa
A1	5 mm	Brilhante	Verde	Lisa	Lisa	Convexa
A2	5 mm	Brilhante	Verde	Lisa	Lisa	Convexa
A3	7 mm	Opaca	Verde claro	Crespa	Crespa	Convexa
A4	6 mm	Brilhante	Verde claro	Crespa	Crespa	Convexa
A5	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c
B1	7 mm	Opaca	Verde claro	Crespa	Crespa	Convexa
C1	6 mm	Opaca	Verde claro	Lisa	Crespa	Convexa
C2	5 mm	Opaca	Verde claro	Lisa	Crespa	Convexa
C4	5 mm	Opaca	Verde claro	Lisa	Crespa	Convexa
D1	1 cm	Opaca	Verde claro	Crespa	Crespa	Convexa
D2	1 cm	Opaca	Verde claro	Lisa	Crespa	Convexa
D3	6 mm	Opaca	Verde claro	Crespa	Crespa	Convexa
D4	7 mm	Opaca	Verde claro	Lisa	Crespa	Convexa
D5	1 cm	Opaca	Verde claro	Crespa	Crespa	Convexa

Condições de cultivo: 30°C por 48h
n/c = não apresentou crescimento

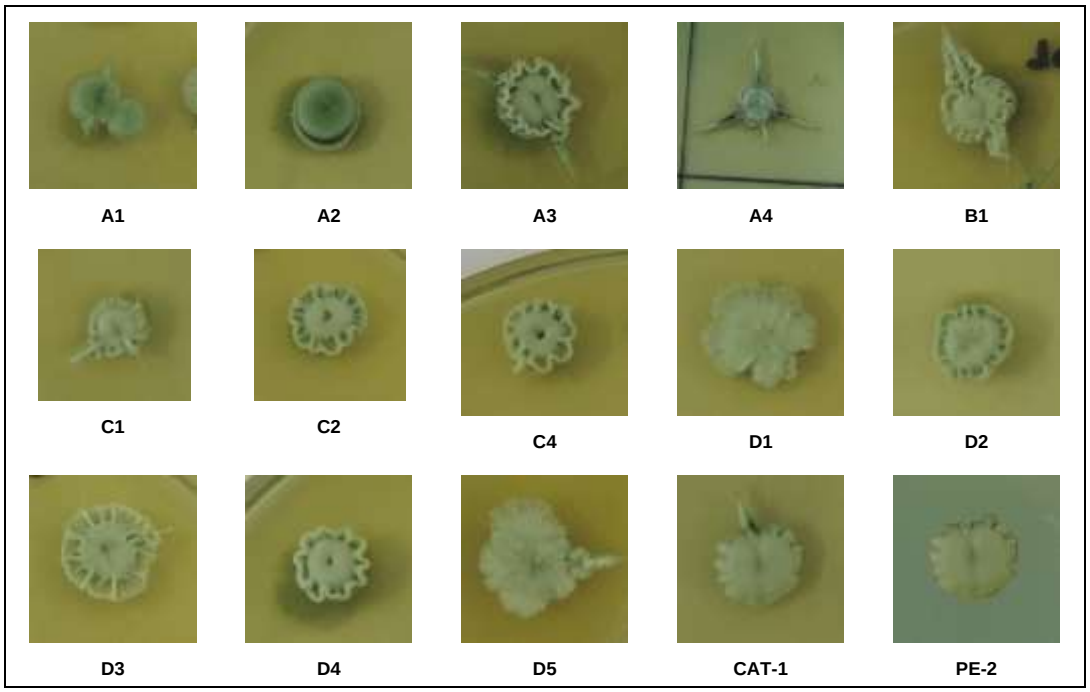


Figura 3- Aparência de uma colônia de isolados e linhagens referência selecionada após cultivo em meio WLN a 30ºC após 48 horas

Fonte: arquivo pessoal

O cultivo dos isolados e linhagens referência em meio WLN proporcionou a obtenção de colônias de tamanhos diferentes, e com colorações diversas, permitindo diferenciar variações de aspecto morfológico como textura, elevação e aparência da superfície da colônia.

A observação das características observadas para as amostras (Tabela 5) sugere que os isolados A1, A2, A4, C1 e D4 podem ser classificados como similares às linhagens referência, embora o diâmetro da colônia fosse menor do que a linhagem referência.

Os isolados A1 a A5, provenientes do início da safra 2013/2014, apresentaram diferentes características morfológicas, embora os isolados A1 e A2 apresentam perfil similar entre si. O isolado A5 não apresentou crescimento neste meio.

Os isolados B1 e C1 a C4 são provenientes de meio de safra. O isolado B1 mostrou perfil distinto, enquanto os isolados C1, C2 e C4 mostraram ser similares entre si, e podem ser classificados como similares às linhagens referência.

As amostras D1 a D5, provenientes do final da safra, apresentaram perfis morfológicos distintos entre si, porém D1, D2 e D5 podem ser classificados como similares entre si e distintos das linhagens referência. O isolado D4 pode ser classificado como similar às linhagens referência. Os isolados A3, A4, B1 e C1apresentaram padrão equivalente a crescimento invasivo, como pode se observar na Figura 3.

O padrão morfológico de linhagens comerciais cultivadas em meio YPD acrescido do corante rosa de bengala (MOREIRA et al., 2015) mostrou resultados similares aos padrões morfológicos das linhagens CAT-1 e PE-2, com colônias brilhantes, superfície e bordas lisas e elevação convexa. Os referidos autores ressaltam a importância da utilização de métodos de caracterização morfológica, que embora simples, são uma ferramenta importante para conhecer a microbiota da fermentação.

5.3.2 Cultivo das amostras em meio BiGGY

O cultivo em meio BiGGY proporciona a identificação de atividade da sulfito redutase (H_2S) em leveduras, devido a coloração da colônia de acordo com a concentração de sulfito produzida. A utilização do meio BiGGY para identificação da formação de sulfeto foi validada por Jiranek et al. (1995) e Zambonelli (1964), que descreveram uma relação direta do escurecimento das colônias obtidas com a capacidade da levedura em produzir H_2S.

A avaliação qualitativa da produção de sulfeto foi realizada por meio da atribuição de valores de escala continua de acordo com a coloração da colônia no meio de cultivo, variando entre 0 e 4, sendo: (0) branco, (1) bege, (2) marrom claro, (3) marrom escuro e (4) preto, segundo Neto e Mendes-Ferreira (2005). Na Tabela 6 estão apresentados os valores atribuídos aos isolados cultivados em meio BiGGY e a coloração das colônias pode ser observada na Figura 4 e no Anexo G.

Tabela 6- Características morfológicas dos isolados e linhagens referência cultivados em meio BiGGY*

Isolado	Diâmetro	Cor	Isolado	Diâmetro	Cor
A1	6 mm	2	**D1**	4 mm	2
A2	5 mm	2	**D2**	5 mm	2
A3	8 mm	2	**D3**	5 mm	2
A4	n/c	n/c	**D4**	5 mm	2
A5	n/c	n/c	**D5**	6 mm	2
B1	9 mm	2			
C1	1 cm	1			
C2	6 mm	3	**CAT-1**	5 mm	2
C4	4 mm	2	**PE-2**	5mm	2

*Condições de cultivo: 30º C por 48 horas
Escala de cor utilizada para determinar a produção de H_2S = branco (0); bege (1); marrom claro (2); marrom escuro (3) e preto (4); n/c = não apresentou crescimento

Os resultados obtidos mostram que a maioria dos isolados é pouco produtor de H_2S, assim como as linhagens referência. A exceção são os isolados A4 e A5 que não tiveram

crescimento neste meio e os isolados C1 como menor produtor de H_2S e o isolado C2 com maior produção de H_2S.

A presença de atividade sulfito redutase em linhagens comerciais de *S. cerevisiae* bem como em linhagens não *Saccharomyces*, foi verificada por Mendes-Ferreira et al. (2002), evidenciando a grande variabilidade encontrada entre linhagens de leveduras.

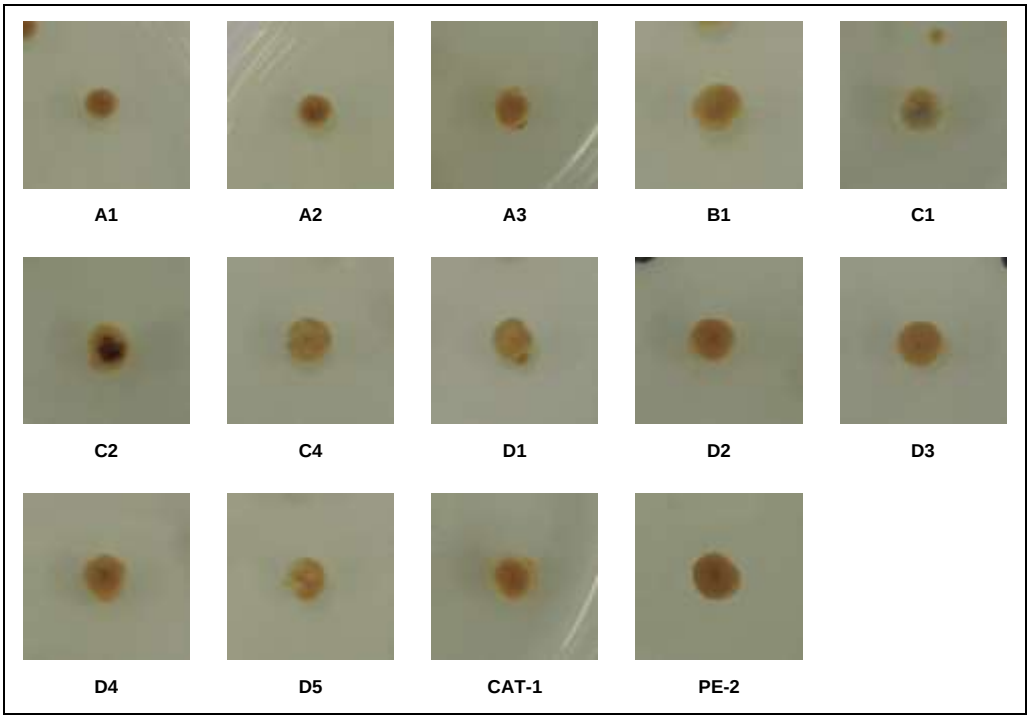


Figura 4 - Aparência dos isolados e linhagens referência cultivados em meio BiGGY a 30°C após 48hs
Fonte: arquivo pessoal

5.3.3 Cultivo das amostras em meio Nagai

As amostras após cultivo em meio Nagai (1963) apresentaram variantes fenotípicos *petite*, no entanto, sua presença não foi expressiva.

A presença da deficiência respiratória é observável pela ação do corante e pela característica morfológica, sendo as colônias deficientes muito menores do que as que não possuem esta deficiência. Na Tabela 7 estão apresentadas as características de coloração apresentadas para cada isolado e, a aparência das placas está apresentada no Anexo H.

Os deficientes respiratórios *petite* são observados na forma de colônias menores coradas em roxo brilhante, já as colônias normais são maiores e coradas em menor intensidade em um violeta cinzento.

A avaliação qualitativa da presença de deficiência respiratória foi realizada por meio da atribuição de valores de escala contínua de acordo com a coloração da colônia no meio

de cultura adaptado de Neto; Mendes-Ferreira (2005). Os valores atribuídos a cada amostra estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Avaliação qualitativa dos isolados e linhagens referência cultivados em meio Nagai

Isolado	Cor	Valor atribuído
A1	Roxo escuro	3
A2	Roxo escuro	3
A3	Violeta cinzento	2
A4	Violeta cinzento	2
A5	Roxo escuro	3
B1	Violeta cinzento	2
C1	Violeta cinzento	2
C2	Roxo escuro	1
C4	Roxo escuro	3
D1	Roxo escuro	1
D2	Roxo escuro	1
D3	Roxo escuro	3
D4	Violeta cinzento	2
D5	Violeta cinzento	1
CAT-1	Violeta cinzento	2
PE-2	Violeta cinzento	2

Condição cultivo: 30°C por 5 dias
Coloração roxo escura = isolados apresentam deficiência respiratória na forma de células petite,
Coloração violeta cinzento = ausência de deficiência respiratória, isolados considerados normais
0= n/c, 1= presença de ambas as células, normais e deficientes, 2= células normais, 3= células deficientes

A análise da aparência dos isolados cultivados neste meio, utilizando a atribuição de valores de escala contínua, mostrou que cinco dos isolados (35,7%) apresentaram células deficientes respiratórias, cinco (35,7%) apresentaram células normais e quatro (28,6%) apresentaram a presença de ambas as células normais e deficientes.

5.3.4 Microscopia dos isolados

Visando observar a aparência das células de levedura dos isolados em comparação com as linhagens referência, PE-2 e CAT-1, as células, após cultivo em meio YPD, foram submetidas à análise morfológica a fresco. Na Figura 5 estão apresentadas as imagens dos isolados e das linhagens referencia provenientes da observação em microscópio.

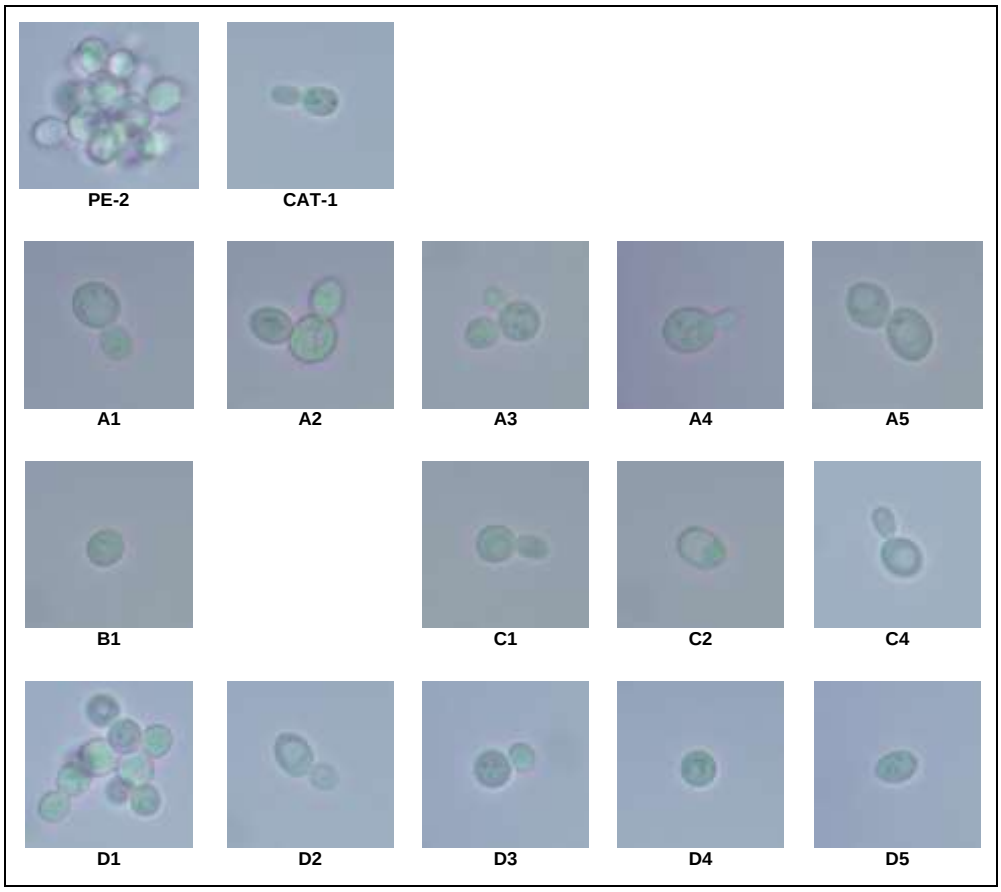


Figura 5 – Microfotografia da imagem de células provenientes dos isolados em preparo a fresco após cultivo em YPD a 30°C por 24h. Observação emMicroscópio óptico Zeiss, Axioscope

As células observadas apresentaram aparência uniforme e predominantemente arredondada, com presença de brotos. Os isolados A2, A4, C1, e D2 apresentaram algumas células ovaladas, e os isolados D1 e a linhagem controle PE-2 apresentaram características de agrupamento das células, o que pode evidenciar possível formação de pseudohifas. A aparência da linhagem PE-2 reflete as condições da amostra armazenada no Laboratório LBAB.

Células de *S. cerevisiae* nativas que apresentam colônias rugosas associadas a formação de pseudohifas são comuns na fermentação alcoólica. Isto é considerada uma característica indesejável para a indústria, por estar associada à floculação e com o aumento do tempo de fermentação. A presença desta característica pode ser um sinal de resposta ao estresse (REIS et al., 2013).

Algumas linhagens de *S. cerevisiae* possuem um padrão sexual de agregação, descrito como co-floculação e formação de células em cadeia. Isto é causado pela incapacidade do broto de se soltar de sua célula mãe, resultando na agregação de aproximadamente 30 a 50 células, que não possuem capacidade de se reagrupar após serem mecanicamente separadas. A morfologia de colônias e células pode variar em

resposta aos estímulos do ambiente; e, a presença de pseudohifas tem sido associada com danos ao processo fermentativo (STEWART, 2009; SOARES, 2010).

5.4 Teste de resistência a temperatura

Amostras dos isolados e linhagens referência foram cultivadas em meio YPD, em diferentes temperaturas, a fim de observar a tolerância de crescimento das leveduras em temperaturas elevadas. Os resultados qualitativos referentes ao crescimento das amostras estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Crescimento das leveduras em diferentes temperaturas (T) de incubação em meio YPD

Amostras	T 30ºC	T 33ºC	T 36ºC	T 39ºC	T 42ºC
A1	x	x	x	x	-
A2	x	x	x	x	-
A3	x	x	x	x	-
A4	x	x	x	-	-
A5	x	-	x	x	-
B1	x	x	x	-	-
C1	x	x	x	x	-
C2	x	x	x	x	-
C4	x	x	x	x	-
D1	x	x	x	x	-
D2	x	x	x	x	-
D3	x	x	x	x	-
D4	x	x	x	x	-
D5	x	x	-	-	-
PE-2	x	x	x	x	-
CAT-1	x	x	x	x	-

Condições de cultivo: 4 dias. Estufa com variação de temperatura de ± 1º C.

(x) = crescimento; (-) = ausência de crescimento

As colônias formadas, após quatro dias de cultivo nas diferentes temperaturas, mostraram uma diferença de tamanho inversamente proporcional ao aumento da temperatura. Na temperatura de 42ºC não houve crescimento celular.

O trabalho realizado por Laluce et al. (2009) confirma que a faixa de temperatura ideal para a fermentação é de 30 a 35°C. O aumento de temperatura impacta diretamente a viabilidade celular, e quando esta variação de temperatura ocorre durante a fermentação, principalmente nos meses de verão, pode ocorrer queda no rendimento de etanol.

5.5 Estudos de capacidade fermentativa utilizando tubos múltiplos

As fermentações no sistema de tubos múltiplos de Durham foram realizadas utilizando os meios YPSac10, MMel12 e MCC15, observando o comportamento dos isolados durante a fermentação. A aparência dos tubos está apresentada nos Anexos C e D.

Os indícios de fermentação observados foram a presença do desprendimento de CO_2 no interior dos tubos de Durham e também na superfície do fermentado, bem como a presença de odor alcoólico e agradável, característico de uma fermentação bem-sucedida. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Capacidade fermentativa (CF) dos isolados e linhagens referência em diferentes meios

Isolado	Meio YPSac10			Meio MMel12			Meio MCC15		
	CF	Odor	CO_2	CF	Odor	CO_2	CF	Odor	CO_2
A1	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm
A2	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm
A3	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	1 cm
A4	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f
A5	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f
B1	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm
C1	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm
C2	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	2 cm
C4	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm
D1	+	Alcoólico	1 cm	+	Fraco	2 cm	+	Fraco	2 cm
D2	+	Alcoólico	1 cm	+	Fraco	1 cm	+	Fraco	1 cm
D3	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm
D4	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm
D5	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	1 cm
CAT-1	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	1 cm
PE-2	+	Alcoólico	2 cm	+	Alcoólico	1 cm	+	Alcoólico	2 cm

CF – capacidade fermentativa analisada pela técnica de tubos múltiplos
CO_2 – altura do desprendimento de CO_2 observado no interior dos tubos de Durham
Condições de cultivo: 30°C por 24h
n/f = não apresentou fermentação, (+) presença de bolhas de CO_2 no tubo e na superfície, (-) = ausência de bolhas de CO_2 no tubo e na superfície

No meio YPSac10, com exceção dos isolados A4 e A5, todos os outros apresentaram desempenho fermentativo desejado, produzindo bolhas visíveis de CO_2 e

odor forte e agradável. Embora os isolados A2, B1, C4 e D3 tenham apresentado menor desprendimento de CO_2.

No meio MMel12, com exceção dos isolados A4 e A5, o desempenho fermentativo ocorreu dentro do desejado, com presença de bolhas de CO_2 no interior do tubo de Durham e na superfície do fermentado, odor alcoólico agradável e adocicado. Os isolados D1 e D2 apresentaram menor produção de CO_2 e odor alcoólico mais fraco neste meio, em oposto ao meio YPSac10, onde a fermentação ocorreu dentro do padrão dos demais isolados.

Os isolados A1, B1, C2, D2, D4 e D5 apresentaram comportamento semelhante à linhagem referência PE-2, enquanto A2, A3, C1, C4, D1 e D3 são mais similares à linhagem referência CAT-1.

Por fim, no meio MCC15, os isolados apresentaram o mesmo comportamento, com a presença dos indícios de fermentação em todos os isolados exceto A4 e A5. As bolhas de CO_2 observadas apresentaram em média de 1 a 2 cm.

Avaliando o desempenho nos três meios, com exceção dos isolados A4 e A5, os demais apresentaram desempenho satisfatório e consistente dentro do tempo normal de fermentação, mantendo a aparência e o odor agradável esperados de uma fermentação alcoólica normal.

As linhagens comerciais PE-2, CAT-1, Red Star e Ragi Instan, cultivadas em mosto com diferentes concentrações de açúcar, apresentaram bolhas no tubo de Durham e presença de espuma, o que sugere serem estas linhagens boas fermentadoras (MOREIRA et al., 2015). Assim, os resultados obtidos indicam que estes isolados podem ser considerados bons fermentadores.

5.6 Avaliação de crescimento de leveduras em microplaca

Os isolados e as linhagens referência foram analisados quanto ao crescimento em meio YPD 2%, YPSac 2%, e MCC (caldo de cana) 5º Brix e MMel (melaço clarificado) 5º Brix, em microplacas.

Os resultados do crescimento das linhagens referência CAT-1 e PE-2 estão apresentados na Figura 6. Embora os meios YPSac, MCC e MMel contenham sacarose, as linhagens apresentaram perfis de crescimento diferentes, evidenciando diferenças na velocidade de crescimento e no volume celular (DO) (Figura 6), comportamento este que se repete no cultivo dos isolados nos mesmos meios (Figuras 7 a 10).

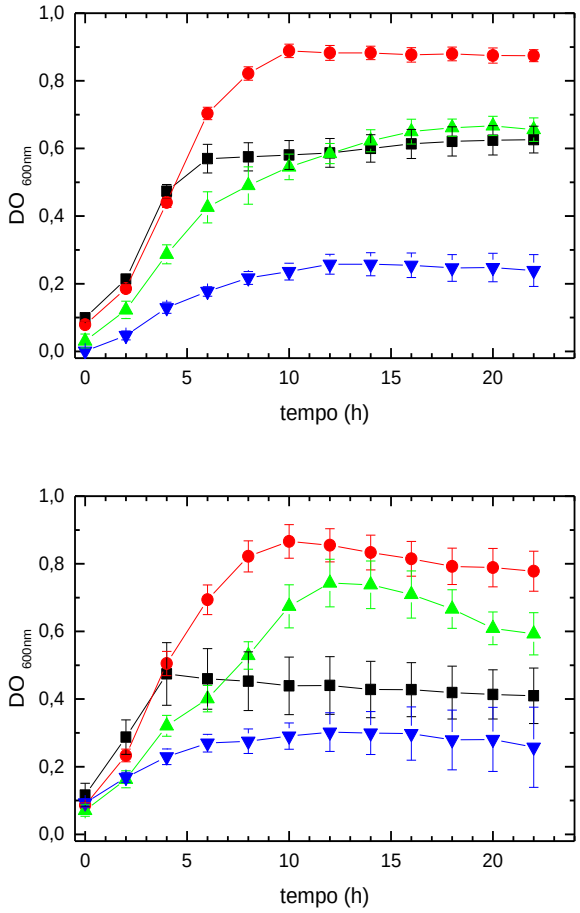


Figura 6 - Crescimento das linhagens referência CAT-1 (superior) e PE-2 (inferior) em meio YPSac2 (vermelho);MMel5 (verde); meio YPD (preto); meio MCC5 (azul), a 30°C por 24 h.

No cultivo em meio YPD (Figura 7), a linhagem referência CAT-1 apresentou crescimento superior aos isolados, enquanto a linhagem PE-2 apresentou crescimento intermediário, sendo inferior a alguns dos isolados. Os isolados A1 a A5 apresentaram desempenho superior ao observado para a linhagem PE-2 e inferior ao comportamento da linhagem referência CAT-1 (Fig 7A). Convém ressaltar que os isolados A1 a A5 são referentes à coleta de início de safra. Os demais isolados apresentaram uma faixa de crescimento próxima à da linhagem PE-2 (Fig 7B e 7C).

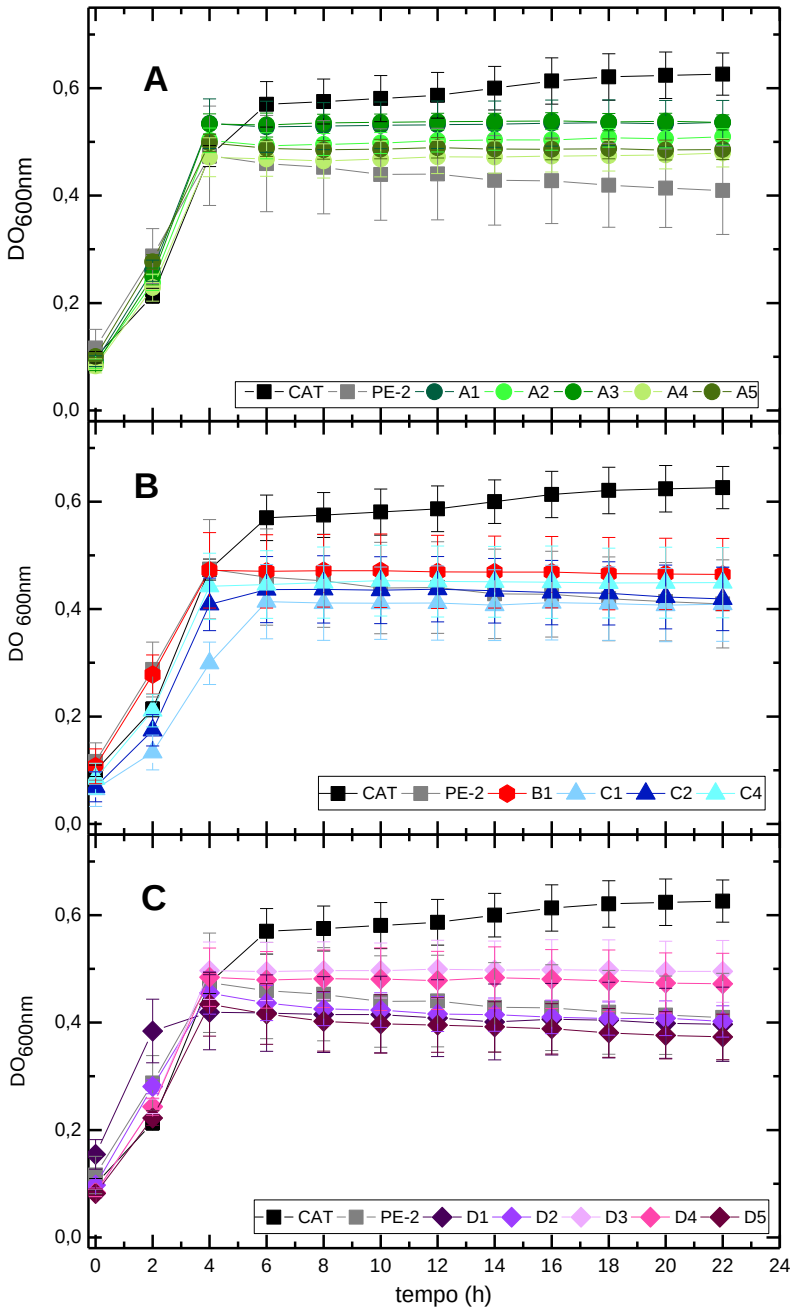


Figura 7 - Crescimento dos isolados e linhagens referência no meio YPD a 30°C

No meio YPSac (Figura 8), os isolados e linhagens referência apresentaram crescimento similar, porém alguns dos isolados apresentaram maior taxa de crescimento do que ambas as linhagens referência, sendo estes os isolados A3 (Fig. 8A), D4 e D3 (Fig. 8C). O isolado B1 apresentou tempo de crescimento mais rápido do que as linhagens referência (Fig. 8B). Os demais isolados apresentaram valores muito próximos aos das referências, CAT-1 e PE-2. Os valores de DO observados foram superiores aos obtidos nos outros meios estudados, com valores acima de 0,7.

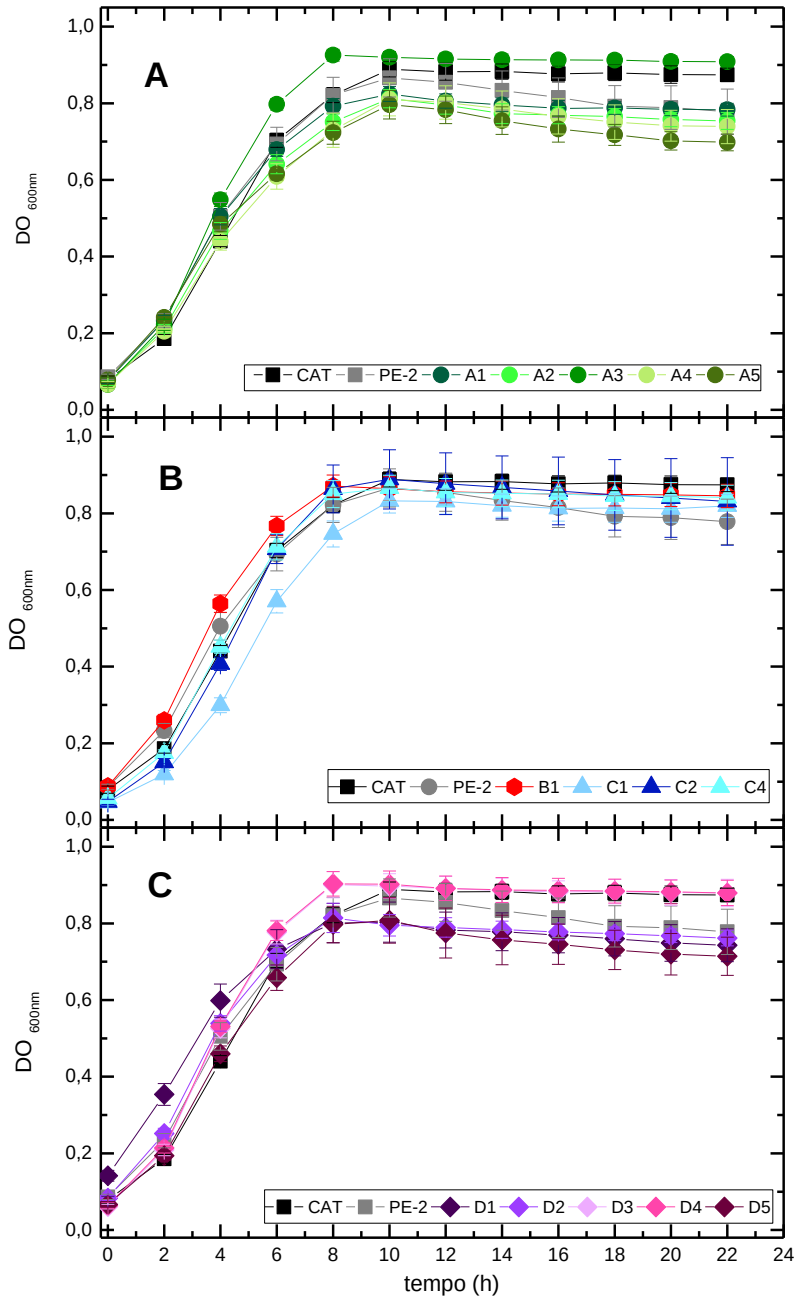


Figura 8 - Crescimento dos isolados e linhagens referência em meio YPSac2, a 30°C

No meio MCC5 (caldo de cana) (Figura 9) o crescimento não foi tão expressivo, porém todos os isolados tiveram crescimento maior quando comparado com as linhagens referência, com destaque para os isolados D3 e D4 (Fig. 9C), seguidos de B1 (Fig. 9B), C4 e A1 (Fig. 9A). As linhagens CAT-1 e PE-2 tiveram um desempenho muito inferior neste meio.

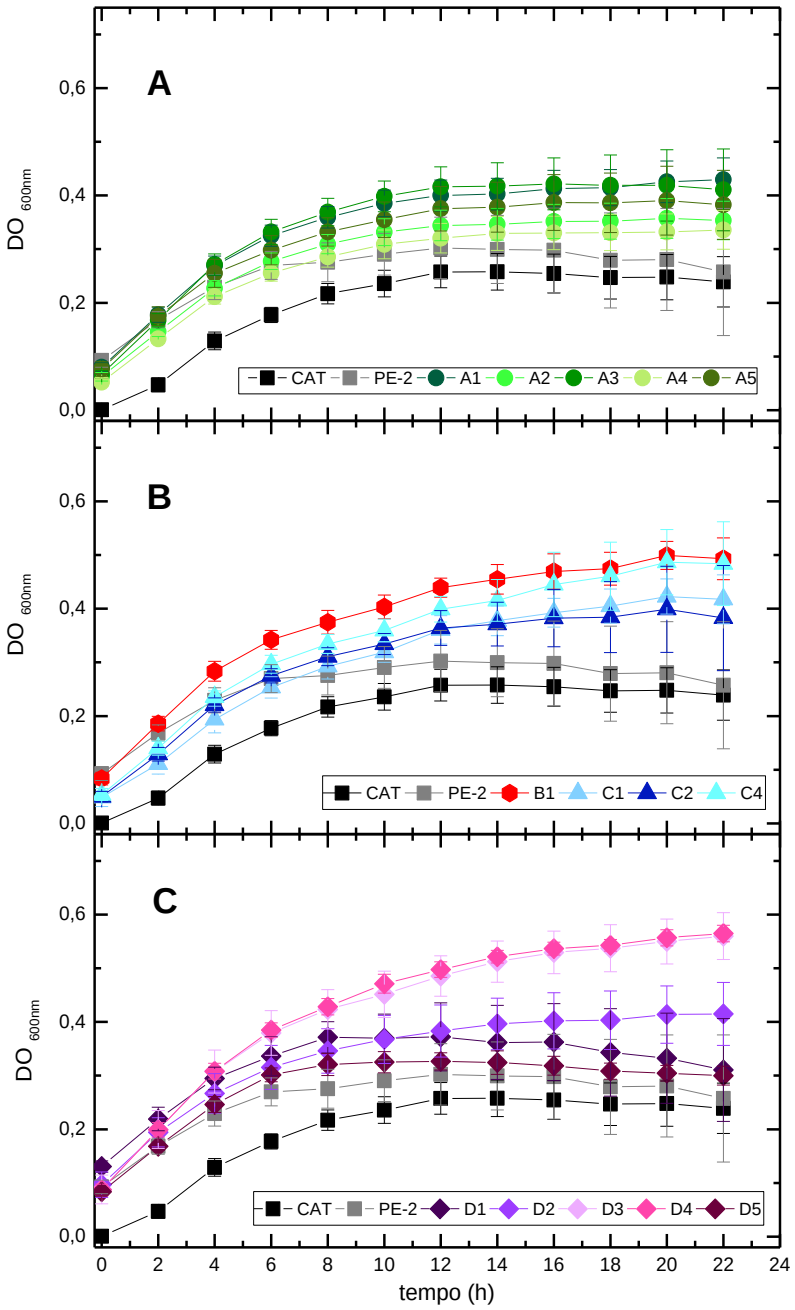


Figura 9 - Crescimento dos isolados e linhagens referência em meio MCC5, a 30°C

Por fim, no meio contendo melaço clarificado (MMel, Figura 10), todas as amostras de levedura apresentaram crescimento, as linhagens referência apresentaram desempenho mediano, superadas pelos isolados A3, A5 (Fig. 10A) e D1 (Fig. 10C). Este último apresentou um desempenho superior e menor tempo de crescimento, seguido pelo isolado D4. A linhagem referência PE-2 apresentou desempenho superior a CAT-1. Em geral, neste meio, os isolados apresentaram maior crescimento do que as linhagens referência.

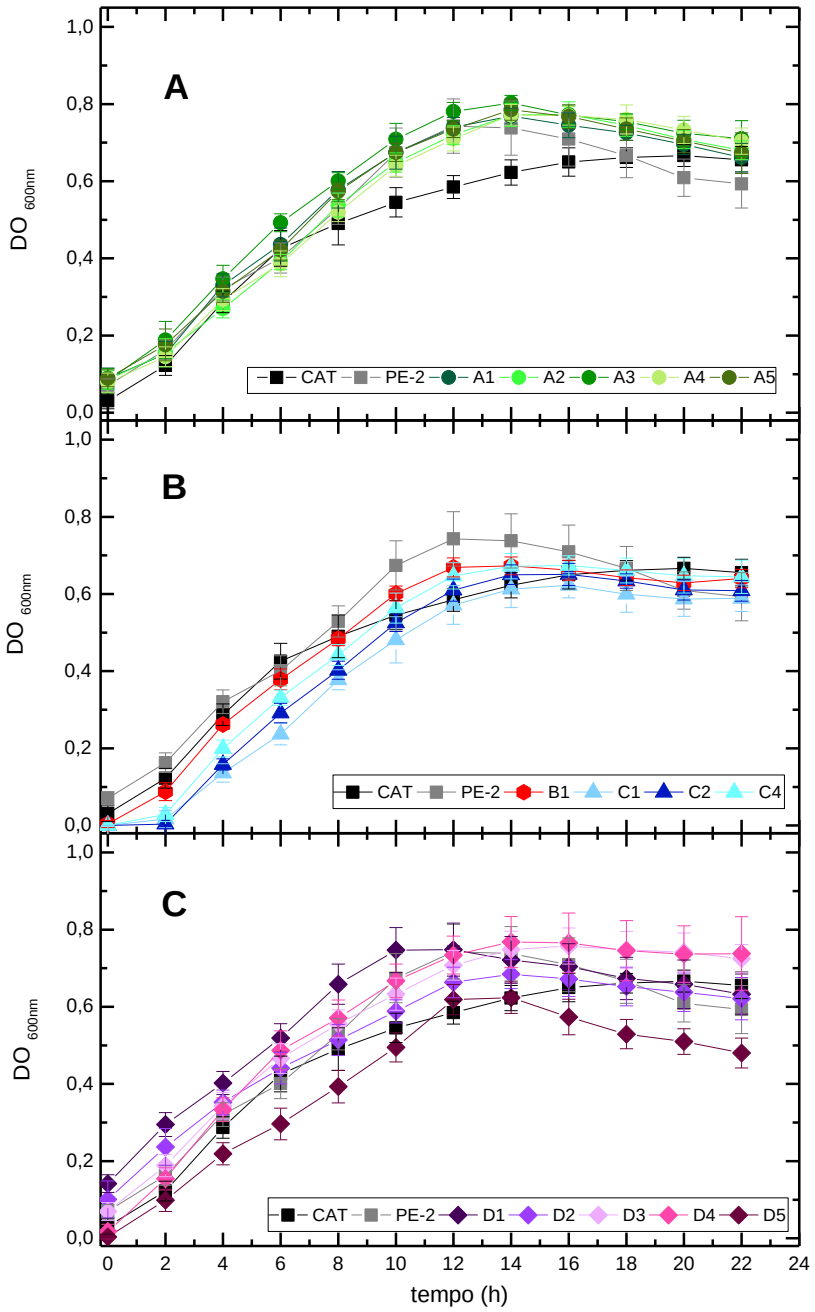


Figura 10 - Crescimento dos isolados e linhagens referência em meio MMel5 a 30°C

A velocidade de crescimento pode ser dada pela relação da produção de biomassa pelo tempo. A análise qualitativa do crescimento dos isolados em microplaca indica que estes apresentaram velocidades de crescimento diferentes, dependendo do meio utilizado. Os meios YPD e YPSac2 continham, teoricamente, 20 g ART/L, e após o crescimento em YPD as amostras de levedura apresentaram D.O. máxima na faixa de 0,35 a 0,55, e 0,6 para a linhagem referência CAT-1. Por outro lado, no meio YPSac, a D.O. máxima obtida ficou em torno de 0,8; portanto, com uma produção maior de biomassa.

No crescimento em meio MCC5, as leveduras apresentaram D.O. máxima de 0,4, com exceção do isolado D4. Já no meio MMel5 a D.O. obtida ficou em torno de 0,8.

5.7 Análise de clusters

As características morfo-fisiológicas e o crescimento máximo obtido após cultivo dos isolados e linhagens referência nos meios YPD e YPSac foram submetidas à análise de cluster por similaridade.

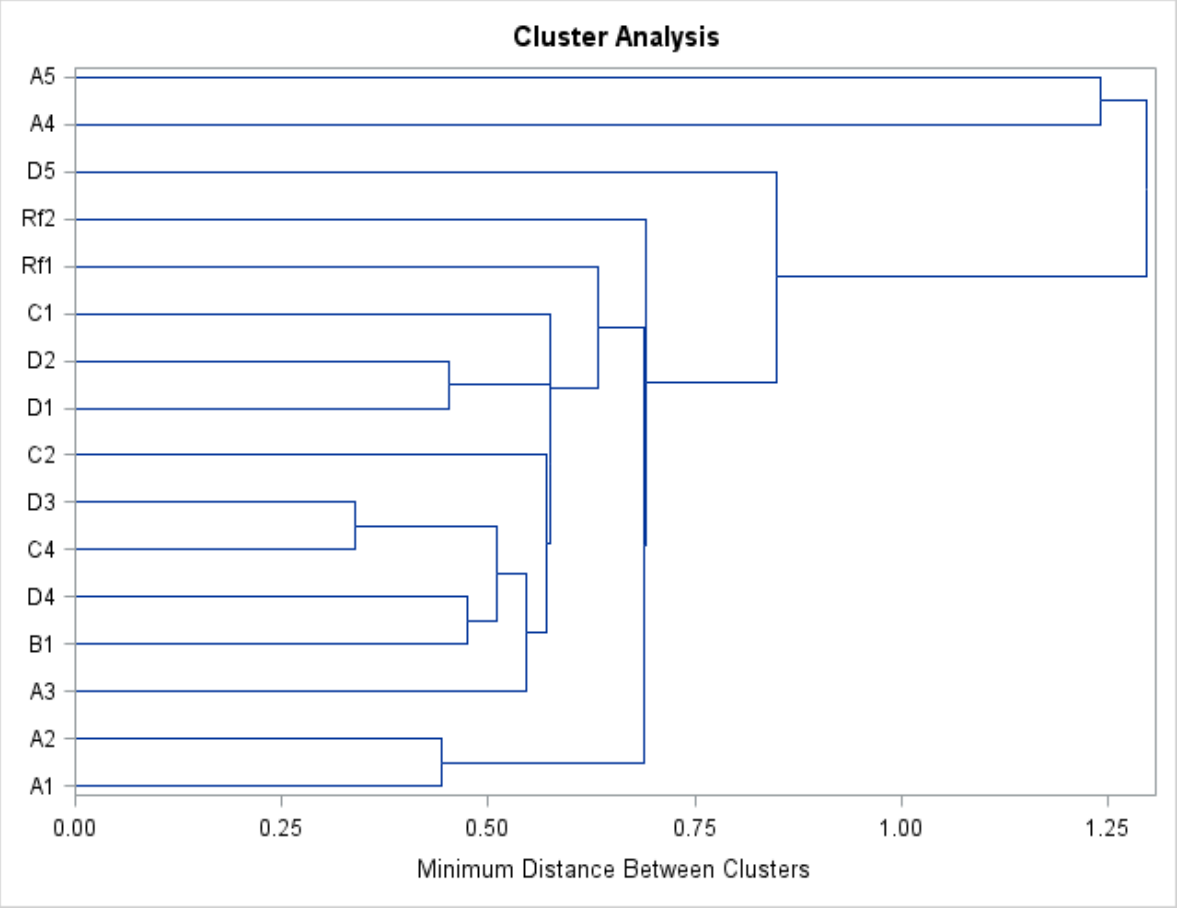


Figura 11 - Análise de clusters obtida a partir dos dados previamente analisados. R1 = linhagem referência CAT-1, R2 = linhagem referência PE-2.

A análise de *cluster* por similaridade (Figura 11), com um corte na altura da distancia 0,75, permite observar a formação de quatro grupos principais, sendo os isolados A4, A5 e D5 formando grupos individuais e o restante das amostras formando um grande grupo.

Os isolados A4 e A5 não apresentaram capacidade fermentativa e não cresceram em alguns meios. O isolado D5 não apresentou crescimento em altas temperaturas e o menor crescimento observado no meio YPD (DO = 0,373), no ensaio em microplaca.

A análise do grupo maior, que engloba a maioria das amostras, sugere não haver grandes diferenças entre os isolados e as linhagens-referência, embora a análise do perfil de polimorfismos contradiga este resultado.

6 CONCLUSÕES

A análise molecular dos isolados e linhagens referência mostrou diferentes padrões de bandas resultantes da reação de PCR, e o sequenciamento do DNA extraído permitiu uma diferenciação intraespecífica, mostrando que todos os isolados pertencem à espécie *S. cerevisiae*. Os isolados amostrados no final da safra apresentam certa semelhança com a linhagem referência PE-2 e um padrão de bandas mais consistente entre si, diferente dos isolados provenientes do início de safra.

O plaqueamento dos isolados em meio diferenciais permitiu observar características diferentes entre os isolados. Todas as amostras estudadas apresentaram um limite de crescimento acima de 39ºC. O estudo de capacidade fermentativa demonstrou bom desempenho nos três meios utilizados, com exceção de dois isolados que não apresentaram capacidade fermentativa em nenhuma das condições.

Na avaliação de crescimento em microplacas, os isolados apresentaram comportamentos distintos nos quatro meios analisados simultaneamente, estas diferenças são evidenciadas quando comparadas com as linhagens referência.

Os isolados apresentam características morfológicas e de comportamento distintas, tanto entre si como quando comparados com as linhagens referência, padrão este que se repete na análise molecular aplicada nas amostras. Em síntese, foram identificadas linhagens selvagens de *S. cerevisiae* que possuem traços desejáveis para aplicação industrial. Estas linhagens podem ser aplicadas tanto na produção de etanol, como em engenharia de bioprocessos. Este estudo, mesmo que inicial, abre campo para maiores questionamentos e desenvolvimentos.

Os isolados de final de safra, exceto D5, parecem apresentar características mais adequadas para serem utilizados como cultura starter em uma fermentação. O isolado D5 foi mais susceptível ao stress e apresentou baixo crescimento.

Isto pode ser o produto de uma adaptação evolutiva sofrida pela levedura ao longo do processo, causada pelos fatores estressantes impostos às leveduras, como altas concentrações de etanol e o reciclo de células com tratamento ácido, bem como a pressão exercida por outras leveduras contaminantes.

Este trabalho de caracterização permitiu conhecer melhor as características apresentadas por isolados de fermentação, evidenciando a riqueza do bioma encontrado em ambiente industrial. Conhecer as características e potencial destes isolados é importante para os constantes desenvolvimentos das tecnologias de fermentação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.L. Processo de Recuperação de Leveduras ou Processo Melle-Boinot. In: **Semana da Fermentação Alcoólica***,* 1, Piracicaba, 1960, Anais, p. 254-262.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. São Paulo: Fermentec, 2005. 448p.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processo de produção de álcool - controle e monitoramento**. Fermentec/Fealq/Esalq-Usp. Piracicaba, 1996.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum**: composition and usage. In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, D.R.; AUSTIN, G.D.; KLUHSPIES, C. (eds) The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries, vol. 1. Nottingham University Press, Nottingham, pp 39–46. 2009.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, Springer-Verlag, v. 91, p. 1267–1275, July 2011.

ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (II) contínua. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, p. 45-51, 1990.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica da cariotipagem. Paper presented at the V Congresso Nacional da **STAB**, 1993.

BASÍLIO, A.C.; de ARAÚJO, P.R.; de MORAIS, J.O.; da SILVA FILHO, E.A.; de MORAIS, M.A. Jr; SIMÕES D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, p. 322–326, 2008.

BNDES, CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.

BROWN, N.A.; DE CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLD, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN. G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 277-290, 2013.

CABRINI, K.T.; GALLO C.R. Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 17, n. 6, p. 48-50, 1999.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica, São Paulo: Editora Edgar Blücher, cap. 10, p.205-216, 2001.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. São Carlos: EdUFSCar, 2010. 105p.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, D.F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB**, v. 18, p. 40-46, 2000.

COPERSUCAR. **Fermentação**. São Paulo: São Paulo Copersucar, 1987. 434p.

CGEE. CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Brasília, DF: CGEE, 2009. 536p.

DELLA-BIANCA, B.E.; BASSO, T.O.; STAMBUK, B.U.; BASSO, L.C.; GOMBERT, A.K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology Technology**, v. 97, p. 979–991, 2013.

DEMIRBAS, M.F.; BALAT, M.; BALAT, H. Potential contributions of biomass to the sustainable energy developments. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 1746-1760, 2009.

DREWS, W. A fermentação do melaço de cana de açúcar no Brasil. In: **Simpósio de Fermentação**1. São Paulo, 1964. Anais. p. 213-222.

FEDERHEN, S.; HARRINGTON, F.; HARRISON, I.; HOLTON, C.; LEIPE, D.; SOUSOV, V. (2000) - **Yeasts** – site de taxonomia da ordem. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ htbin-post/ Taxonomy/wgetorg. Acesso em 12/09/2016

FINGUERUT, J. Evolução da tecnologia industrial e perspectivas para o futuro. V Semana de Fermentação Alcoólica. 2011. Disponível em: http://stab.org.br/fermentacao/Jaime.pdf. Acesso em 22/11/16

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOIUS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-567, 1996.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, p. 808-810, 2007.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 139-155, 1996.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, PA. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H_2S-production potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 46, n. 2, p. 269-273. 1995.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331–371, 1998.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J.O.; OLIVEIRA, K.F.; SOUZA, C.S.; MORAIS, M.R. Optimization of temperature, sugar concentration and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 627-637, 2009.

LANSING, R. Recent developments in Brett management and monitoring. **Wine Business Montly**, May, 2004.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**: Processos Fermentativos e Enzimáticos, São Paulo: Editora Edgar Blücher, cap. 1, v. 3, p. 01- 43, 2001.

LIMA, U.A. Sistema de Fermentação Alcoólica. In: Semana da Fermentação Alcoólica, 1, Piracicaba, 1960, Anais, p.242-253.

LEGRAS, J; KARST, F. Optimization of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, p. 249-255, 2003.

LOPES, M.L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE-2) utilizada no processo industrial de produção de etanol.** 2000. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

LORENZ, M.C.; CUTLER, N.S; HEITMAN, J. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*.**Molecular Biology of the cell**. v. 11, p. 183-199, 2000.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.S.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V.; MIYOSH, A.; THOMPSON, F.L.; MORAIS JR, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 298, 2010.

MATTANOVICH, D.; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microbial cell factories**, v.13, n.34, p. 2-5, 2014.

MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Survey PF hydrogen sulphide production by wine yeasts. **Journal of Food Protection**, v.64, n.6, p.1033-1037. 2002.

MOREIRA, C.S.; SANTOS, M.S.C.; BARROS, N.S.; CARDOSO, C.A.L.; BATISTOTE, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 55-63, set-dez. 2015.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G., GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**. v. 28, p. 817-830, 2010. Doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001

NAGAI, S. Diagnostic color differentiation plates for hereditary respiration deficiency in yeast. **Journal of Bacteriology**, Nara, Japan, v. 86, p. 299-392. 1963.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A.A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2,p. 275-278,June2005 .

NESS, F.; LAVALLE, F.; DUBOURDIEU D.; AIGLE, M.; DULAU, L. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 89-94, 1993.

PARAZZI, C.; SILVA, A. R.; ARAUJO, R. T. Avaliação de diferentes linhagens de leveduras selvagens na fermentação alcoólica. **STAB**. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, Piracicaba, v. 20, n.3, p. 36-40, 2002.

PALMANN, C.L. Use of WL medium to profile native flora fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 58, p. 198-203, 2001.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. **The life of yeasts: their nature, activity, ecology, and relation to mankind.** Cambridge, Mass:Harvard University Press, 1966. 186p.

PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. **Brewing microbiology.** 3.ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 399 p.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processo fermentativo para produção de etanol**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba. 2011.

REIS, V.R; BASSI, A.P.G; SILVA, J.C.G; CECCATO-ANTONINI, S.R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphalmorphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1121-1131, Dec. 2013.

RODRIGUES, M.I.; ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI, F. Simulação da Produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. **STAB**. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, Piracicaba, v. 10, n.5, p. 35-41, 1992.

ROMANO, P.; FLEET, G.; BOEKHOUT, T. Alcoholic fermentation: beverages to biofuel. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 965-966, 2008.

SILVA, R.S.; OLIVEIRA, P.A.; SILVA, E.R.S.; CARDOSO, C.A.L.; ERNANDES, J.R.; BATISTOTE, M. Efeitos do tratamento ácido na fermentação alcoólica. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 37, n. 1, p. 52-56, jan-abr 2015.

SILVA, A.R.; VIANA, N.C. **Caracterização molecular de cepas de leveduras presentes e dominantes durante fermentação alcoólica em usinas.** 2013. 29 p. Trabalho de Graduação (Graduação – Tecnologia) Faculdade de Tecnologia de Piracicaba, Centro de Educação Tecnológica “Paula Souza”, Piracicaba, 2013.

SILVA-FILHO, E.A.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; DE MORAES, J.O.F.; MORAIS JR., M.A.; SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenkoek**, v. 88, p. 13–23, 2005.

SOARES, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.1-18, 2010.

STEWART, G.G. The Horace Brown Medal lecture: forty years of brewing research. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, p. 3-29, 2009.

UNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2 Acesso 18/11/16.

VASCONCELOS, J.N. **Ethanolic fermentation**. In: SANTOS, F.; BOREM, A.; CALDAS, C. Sugarcane: bioenergy, sugar and bioethanol. 2012, Brasilia: MAPA/ACS: UFV/DEA. Cap. 15, p. 387.

VAN DIJKEN, J.P.; VAN DEN BOSCH, E.; HERMANS J.J.; DE MIRANDA, L.R.; SCHEFFERS, W.A. Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. **Yeast**, v. 2, p. 123-127, 1986.

WALKER,G.M. **Yeast physiology and biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons, 1998. 321 p.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast** – the practical guide to beer fermentation.1 ed. Boulder, Colorado: Brewers Publication, 2010. 304p.

XUFRE, A., ALBERGARIA, H., GÍRIO, F., SPENCER-MARTINS, I. Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 127-132, 2011.

ZAMBONELLI, C.; SOLLI, M.G.; GUERRA, D. Richerche biometriche sulla produzione di hidrogeno sulfurato in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 14, p. 129-135, 1964.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BOM, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.N.; MACEDO, L.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ANEXOS

WL Nutrient Medium • WL Nutrient Broth WL Differential Medium

Intended Use

WL Nutrient Medium and WL Nutrient Broth are used for cultivating yeasts, molds and bacteria encountered in brewing and industrial fermentation processes.

WL Differential Medium is used for isolating bacteria encountered in brewing and industrial fermentation processes.

Summary and Explanation

WL (Wallerstein Laboratory) nutrient media were developed by Green and Gray[1,2] in their study of various fermentation processes. An exhaustive study examining the methods of fermentation control procedures in worts, beers, liquid yeasts and similar fermentation products led to the development of these media.

At a pH of 5.5, counts of viable bakers' yeast may be made on the WL Nutrient Medium. By adjusting the pH to 6.5, the medium is suitable for obtaining counts of bakers' and distiller's yeast. The medium can support the growth of bacteria, but unless the number of yeast cells is small the bacteria may not be detected. Due to this limitation, Green and Gray developed WL Differential Medium that inhibits the growth of yeasts without inhibiting the growth of bacteria present in beers.

WL Nutrient Medium and WL Differential Medium are used simultaneously as a set of three plates. One plate is prepared from WL Nutrient Medium and two plates from WL Differential Medium.[3] The WL Nutrient Medium plate is incubated aerobically to obtain a total count of mainly yeast colonies. A differential agar plate is incubated aerobically for growth of acetic acid bacteria, *Flavobacterium*, *Proteus* and thermophilic bacteria. Another differential agar plate is incubated anaerobically for growth of lactic acid bacteria and *Pediococcus*.

Principles of the Procedure

Yeast extract is a source of trace elements, vitamins and amino acids. Peptone provides nitrogen, amino acids and carbon. Dextrose is the source of carbohydrate. Monopotassium phosphate buffers the media. Potassium chloride, calcium chloride and ferric chloride are essential ions and help to maintain osmotic balance. Magnesium sulfate and manganese sulfate are sources of divalent cations. Bromcresol green is a pH indicator. Agar is the solidifying agent in WL Nutrient Medium and WL Differential Medium. Cycloheximide inhibits yeasts and molds in WL Differential Medium.

Formulae

Difco™ WL Nutrient Medium

Approximate Formula* Per Liter

Yeast Extract	4.0	g
Pancreatic Digest of Casein	5.0	g
Dextrose	50.0	g
Monopotassium Phosphate	0.55	g
Potassium Chloride	425.0	mg
Calcium Chloride	125.0	mg
Magnesium Sulfate	125.0	mg
Ferric Chloride	2.5	mg
Manganese Sulfate	2.5	mg
Agar	20.0	g
Bromcresol Green	22.0	mg

Difco™ WL Nutrient Broth

Consists of the same ingredients without the agar.

Difco™ WL Differential Medium

Consists of the same ingredients as WL Nutrient Medium with the addition of 4.0 mg cycloheximide.

**Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.*

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend the powder in 1 L of purified water:
   Difco™ WL Nutrient Medium* – 80 g;
   Difco™ WL Differential Medium* – 80 g;
   Difco™ WL Nutrient Broth – 60 g.**
   Mix thoroughly.

   ** If desired, the pH may be adjusted to 6.5 ± 0.2 by adding approximately 27-32 mL (see label directions) of 1% sodium carbonate solution per liter of purified water prior to dissolving the powder.*

   *** If desired, add fermentation vials to tubes before autoclaving to assess gas production.*
2. Heat the agar media with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Autoclave agar and broth media at 121°C for 15 minutes.
4. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Anexo A - Composição do meio WLN

Fonte: Difco Manual

<https://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf> Acesso em 09/09/2016

Formula

BBL™ BIGGY Agar

Approximate Formula* Per Liter

Bismuth Ammonium Citrate	5.0	g
Sodium Sulfite	3.0	g
Dextrose	10.0	g
Glycine	10.0	g
Yeast Extract	1.0	g
Agar	16.0	g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend 45 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for not more than 1 minute to completely dissolve the powder. DO NOT AUTOCLAVE.
3. Cool to approximately 45-50°C. Swirl to disperse the insoluble material and pour into plates.
4. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

Consult appropriate references for information about the processing and inoculation of specimens such as tissues, skin scrapings, hair, nail clippings, etc.[2-5] The streak plate technique is used primarily to obtain isolated colonies from specimens containing mixed flora. When using slants, streak the surface of the slant with a sterile inoculating loop needle using two to three isolated colonies.

Incubate plates in an inverted position (agar side up) for up to 5 days at 25 ± 2°C.

Expected Results

Within 5 days of incubation, the plates should show isolated colonies in streaked areas and confluent growth in areas of heavy inoculation. Slants should show evidence of growth.

Examine plates and slants for colonies showing characteristic growth patterns and morphology. The following table summarizes typical *Candida* colonial morphology.[6]

SPECIES OF CANDIDA	COLONIAL MORPHOLOGY
C. albicans	Smooth, circular or hemispherical brown-black colonies; may have slight mycelial fringe; no color diffusion into surrounding medium; no metallic sheen.
C. tropicalis	Smooth, discrete, dark brown to black colonies (may have black-colored centers); slight mycelial fringe; diffuse blackening of medium after 72 hours; metallic sheen.
C. krusei	Large, flat, wrinkled silvery brown-black colonies with brown peripheries; yellow to brown halo diffusion into medium; metallic sheen.
C. keyfr	Medium size, flat, dark reddish-brown glistening colonies; may have slight mycelial fringe; no diffusion.

References

1. Nickerson. 1953. J. Infect. Dis. 93:43.
2. Haley, Trandel and Coyle. 1980. Cumitech 11, Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical mycology laboratory. Coord. ed., Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Isenberg and Garcia (ed.). 2004 (update, 2007). Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Kwon-Chung and Bennett. 1992. Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
5. Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Availability

BBL™ BIGGY Agar

Cat. No. 211027 Dehydrated – 500 g

United States and Canada

Cat. No. 297254 Prepared Plates – Pkg. of 20*
297255 Prepared Slants – Pkg. of 10*

Europe

Cat. No. 255002 Prepared Plates – Pkg. of 20*

Mexico

Cat. No. 252563 Prepared Plates – Pkg. of 10*

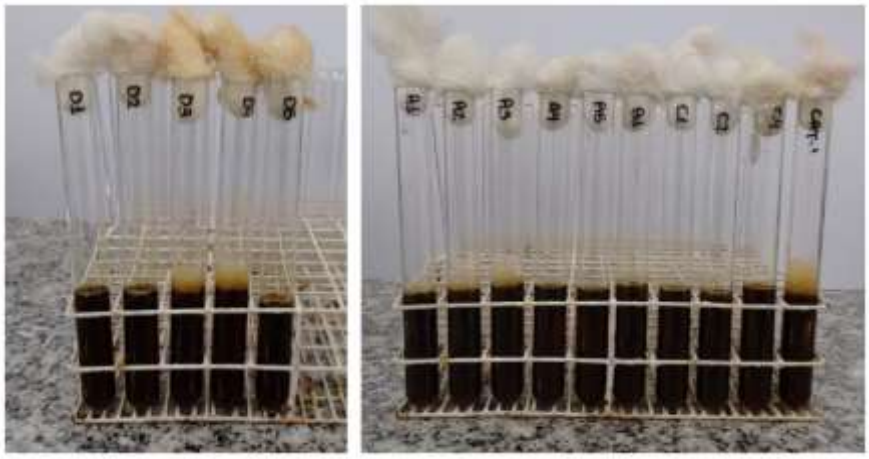
*Store at 2-8°C.

Anexo B - Composição do meio BiGGY

Fonte: Difco Manual <https://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf> Acesso em 09/09/2016

Anexo C - Fermentação em tubos múltiplos utilizando meio YPSac

Fonte: Arquivo pessoal

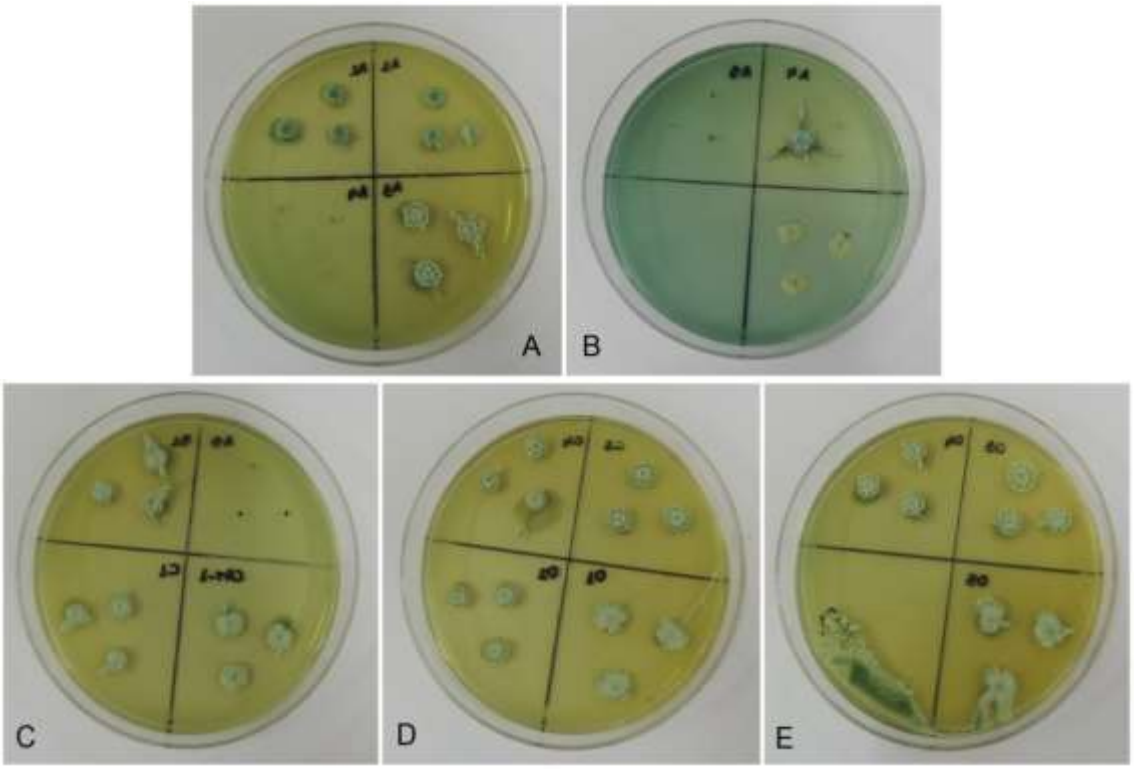


Anexo D - Fermentação em tubos múltiplos utilizando meio MMel12

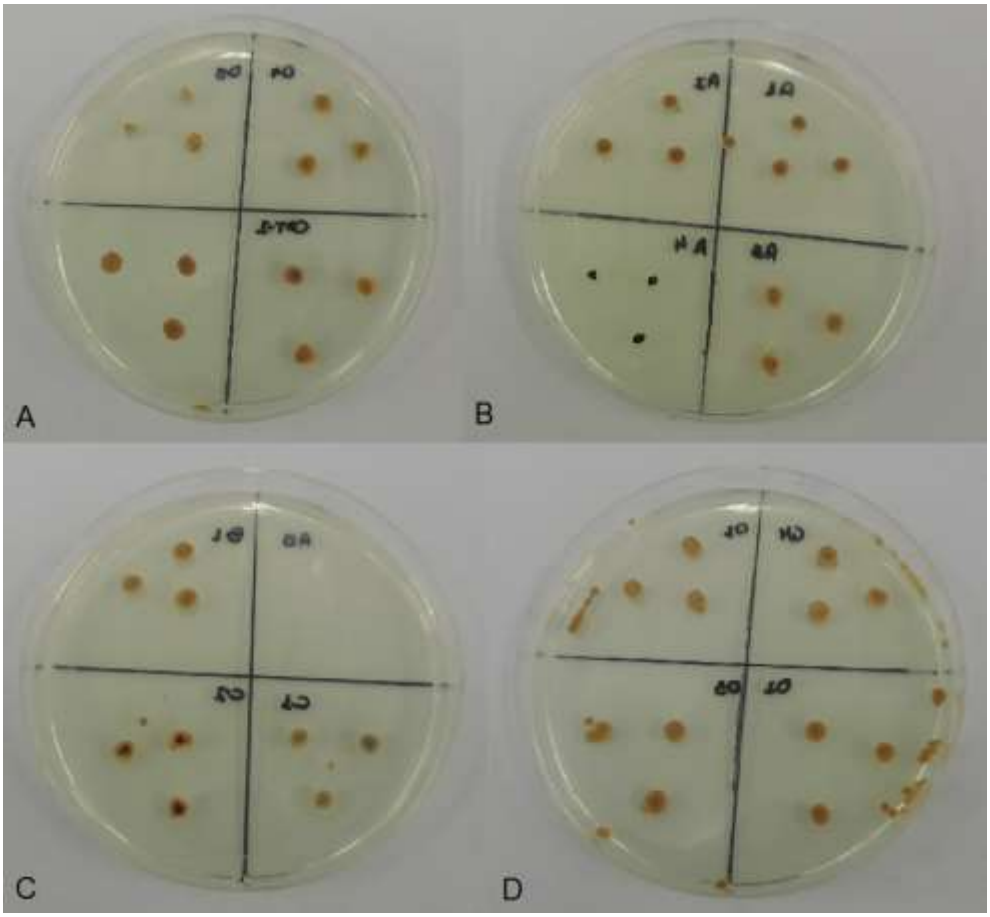
Fonte: Arquivo pessoal

Anexo E - Slants para conservação de colônias selecionadas.

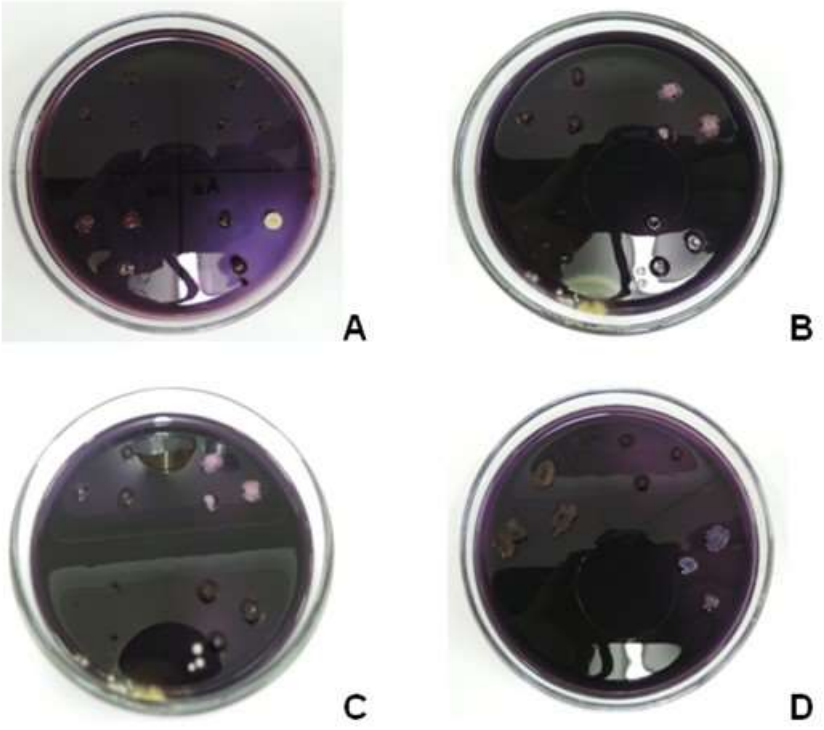
Fonte: Arquivo pessoal



Anexo F - Aparência dos isolados e linhagens referência após plaqueamento em meio WLN, a 30°C durante 48 horas



Anexo G - Aparência dos isolados e linhagens referência após plaqueamento em meio BiGGY, a 30° C durante 48 horas



Anexo H - Cultivo pontual dos isolados,em triplicata, em meio Nagai a 30ºC por 5 dias, cada quadrante representa um isolado. (A) A1,A2,A3,A4; (B) A5,B1,C2,C4; (C) C1,CAT-1,D1,D2; (D) D3,D4,D5.

Fonte: arquivo pessoal.