**O CARÁTER H₂S NEGATIVO E A FLOCULAÇÃO COMO
MARCADORES DE LEVEDURAS EM FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA COM RECICLO DE CÉLULAS**

CARLOS ALBERTO FRANÇA RIBEIRO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JORGE HORII**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Ribeiro, Carlos Alberto França.

O caráter H₂S negativo e a floculação como marcadores de leveduras em fermentação alcoólica com reciclo de células / Carlos Alberto França Ribeiro. - - Piracicaba, 2002.
59 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Aguardente 2. Cana-de-açúcar 3. Fermentação 4. Floculação 5. Leveduras I.

Título

CDD 663.53

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

Outra cópia depositada junto à CPD/ESALQ
25/01/2002

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Jorge Horii, pela orientação e estímulo;

Ao amigo e futuro colega Gustavo Schiavinato Hildebrand, pelo apoio e auxílio na execução do presente trabalho;

Aos técnicos do Setor de Açúcar e Alcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP;

À CAPES, pelo auxílio concedido na forma de bolsa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Leveduras flocculantes	5
2.2 Leveduras não produtoras de ácido sulfídrico.....	7
2.3 Hibridação de leveduras por fusão de protoplastos.....	8
2.4 Identificação de leveduras.....	9
3 METODOLOGIA.....	25
3.1 Microrganismos.....	25
3.2 Meios de cultura.....	26
3.3 Seleção de linhagens não produtoras de ácido sulfídrico.....	28
3.4 Seleção de linhagens flocculantes.....	29
3.5 Avaliação do crescimento dos recombinantes em mosto de caldo de cana.....	29

3.6 Ensaio comparativo para avaliação dos parâmetros cinéticos do recombinate selecionado.....	30
3.6.1 Multiplicação do inóculo.....	30
3.6.2 Ensaio comparativo e parâmetros estudados.....	31
3.7 Acompanhamento do recombinate mediante reciclo celular.....	34
3.8 Recuperação do recombinate em cultura mista com fermento de panificação.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Acompanhamento das linhagens previamente selecionadas.....	36
4.2 Seleção sobre os produtos de fusão.....	36
4.3 Crescimento de linhagens em mosto de caldo de cana.....	39
4.4 Ensaio comparativo para avaliação dos parâmetros cinéticos do recombinate selecionado.....	41
4.5 Acompanhamento do recombinate mediante o reciclo celular.....	45
4.6 Recuperação do recombinate em cultura mista com o fermento de panificação.....	47
5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Cinética fermentativa – Tratamento PF132b4.....	41
2 Cinética fermentativa – Tratamento FP.....	42
3 Equação de regressão para o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ – Tratamento PF132b4.....	43
4 Equação de regressão para o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ – Tratamento FP.....	43
5 Colônias obtidas da inoculação direta do vinho da última fermentação, sobre meio BSA.....	46
6 Inoculação direta de 0,1 mL de diluição 10^{-4} de mosto em meio BSA, após 24 horas de incubação.....	48
7 Aspecto da replicação em meio BSA das colônias obtidas em meio WLN, a partir de diluição 10^{-7} de amostra no final da fermentação.....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Comportamento das linhagens em relação aos parâmetros de seleção.....	37
2 Seleção de linhagens não produtoras de ácido sulfídrico e flocculantes.....	38
3 Unidades de absorbância ($\lambda=600$ nm) após 24 h de fermentação.....	40
4 Parâmetros de fermentação das linhagens estudadas (médias de 3 repetições).....	44
5 Viabilidade celular e porcentagem de colônias H ₂ S negativas no inóculo reciclado.....	45
6 Unidades formadoras de colônias no início e término das fermentações (médias de 3 repetições).....	47

O CARÁTER H₂S NEGATIVO E A FLOCULAÇÃO COMO MARCADORES DE LEVEDURAS EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM RECICLO DE CÉLULAS

Autor: CARLOS ALBERTO FRANÇA RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

RESUMO

Em função da baixa frequência de ocorrência de leveduras não produtoras de ácido sulfídrico e floculantes, pretendeu-se neste trabalho a utilização destas características como marcadores de linhagem na avaliação do reciclo de células em processos de fermentação alcoólica do caldo de cana para a produção de aguardente. O trabalho foi elaborado com base: a) no acompanhamento das características de um banco de leveduras recombinantes produzidas por fusão de protoplastos para seleção de linhagem; b) no acompanhamento da cinética fermentativa da linhagem selecionada em comparação ao fermento de panificação comercial; c) na avaliação da viabilidade e da recuperação da linhagem selecionada em meio diferencial após alguns ciclos; d) na avaliação da recuperação desta

linhagem em cultura mista com o fermento de panificação comercial. Os resultados mostraram que a levedura selecionada para o caráter H_2S negativo manteve sua viabilidade durante os ciclos, com níveis de contaminação não detectados pela metodologia empregada, apresentando comportamento cinético semelhante ao da levedura de panificação tanto em cultura pura quanto em cultivo misto, apresentando uma nova possibilidade para estudos sobre o controle de qualidade de processos de fermentação alcoólica com reciclagem de células.

H₂S NEGATIVE AND FLOCCULATION CHARACTERS AS YEAST MARKERS ON CELL RECYCLE OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION

Author: CARLOS ALBERTO FRANÇA RIBEIRO

Adviser: Prof. JORGE HORII

SUMMARY

Due to the low occurrence of hydrogen sulfide non-producing and flocculant yeast, this work was intended to use these characteristics as strain markers on cell recycle evaluation at alcoholic fermentation processes for sugar cane spirit production. The bases of the work were: a) the behavior attendance of a recombinant yeast bank made by protoplast fusion, for strain screening purposes; b) the attendance to the strain's fermentative kinetics, compared to the commercial baker's yeast; c) the viability evaluation and recovery of the selected strain at differential media, after some fermentation batches; d) the recovery evaluation of the selected strain from a mixed culture fermentation with baker's yeast strain.

The results showed that the strain selected for the H₂S negative character kept its viability during the successive recycles, with contamination levels not detected by the employed method, and also showing similar kinetic behavior to the baker's yeast, either in a single or in a mixed culture fermentation, performing a new possibility for further works on quality control of the cell recycle at alcoholic fermentation processes.

1 INTRODUÇÃO

A diversidade microbiana, com suas peculiaridades metabólicas, tem oferecido muitas possibilidades sobre o campo da biotecnologia, quer seja pelo desenvolvimento de novos processos, quer pela otimização dos já existentes.

Com isso, a busca por microrganismos que satisfaçam às necessidades de processo ou de produto é tópico constante em trabalhos científicos.

Em trabalhos anteriores de fermentação alcoólica para a produção de aguardente de cana, foram observadas as vantagens obtidas mediante o emprego de linhagens de levedura não produtoras de ácido sulfídrico e de linhagens floculantes, fato que originou um processo de seleção de leveduras que possuíssem ambas as características, podendo-se assim, usufruir destes benefícios em conjunto e obter microrganismo com baixíssima frequência de ocorrência na natureza, o que facilitaria estudo sobre alternância de linhagens em processos que utilizam o reciclo de células, bem como o controle de qualidade deste pela simplicidade das técnicas de identificação.

Devido à frequência esperada desta levedura, foi efetuado um trabalho de fusão de protoplastos (Martins *et al.*, 1999) com linhagens que apresentavam isoladamente tais características

Sobre estes produtos recombinantes de fusão de protoplastos e sobre algumas linhagens já isoladas destes, foi efetuado um trabalho de seleção de linhagens que apresentassem as características em questão, e o acompanhamento da manutenção destas características, para que o recombinante selecionado pudesse ser empregado em processo fermentativo para a produção de aguardente de cana-de-açúcar, para a utilização destas características na análise e no controle de qualidade da recuperação do inóculo.

O meio diferencial Ágar ao Sulfeto de Bismuto se torna especialmente interessante por apresentar rapidez e acuidade nos resultados, facilitando a identificação de linhagens de leveduras não produtoras de ácido sulfídrico, bem como na avaliação da contaminação das fermentações por linhagens produtoras deste gás, característica que, associada à floculação, observada na aparência do crescimento em meio líquido, traria maior exatidão na identificação desta linhagem no processo.

Mediante o exposto, o presente trabalho tem por objetivo a viabilização de um método para avaliação do controle de qualidade de inóculo em processos de fermentação alcoólica com reciclo de células, através de:

- Isolamento e seleção de linhagens de leveduras floculantes e não produtoras de ácido sulfídrico, a partir de produtos de fusão de protoplastos;
- Acompanhamento da estabilidade dos recombinantes, segundo as características em estudo;

- Seleção de linhagens segundo seu crescimento em caldo de cana;
- Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação do recombinante selecionado;
- Acompanhamento do comportamento do recombinante mediante reciclagens;
- Verificação do comportamento do recombinante em cultivo misto com linhagem isolada a partir de fermento de panificação comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O processo biotecnológico de produção de aguardente de cana segue ainda princípios rudimentares de fermentação que impedem não só a escolha, a seleção e o uso de linhagens adequadas de leveduras, como também impossibilita um controle de processo e de qualidade de produto pela existência de um padrão tecnológico ainda muito incipiente. Com medidas básicas de controle, como o tratamento térmico do caldo, dentre outras, pode-se empregar leveduras selecionadas, como nos casos de outras bebidas fabricadas no exterior.

No Brasil, prevalece o uso do fermento prensado de panificação e da linhagem IZ 1904 para a produção de aguardente (Franco, 1978), sendo comum a fermentação espontânea em pequenas unidades produtoras.

Com o progresso da tecnologia de bebidas, as linhagens foram sendo selecionadas segundo características desejáveis ao processo. A produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas e a propriedade de produzir metabólitos anti-contaminantes (caráter "killer") são constantes fontes de interesse (Hammond, 1995).

Em pesquisas anteriores foram observados alguns benefícios sobre parâmetros de fermentação (Ribeiro & Horii, 1999) e sobre a aguardente (Ribeiro & Horii, 1998), advindos das características de floculação e de não produção de ácido sulfídrico, através de ensaios comparativos entre linhagens.

Na tentativa da inclusão destas características em uma única linhagem de levedura, Martins et al. (1999) efetuaram a fusão de protoplastos entre linhagens individualmente portadoras destas características, produto sobre o qual foi realizado este trabalho.

2.1 Leveduras floculantes

Segundo De Clerck (1957), as leveduras floculantes sedimentam no fundo das dornas não metabolizando todo o açúcar fermentescível do mosto cervejeiro.

Libicki et al. (1988) e Logan & Hunt (1988), atribuíram os baixos rendimentos obtidos com o uso de leveduras floculantes às limitações difusionais do substrato sobre os flocos, afirmando ser esta a maior desvantagem destes microrganismos.

Em contraste com estas afirmações, a experimentação científica com leveduras floculantes vem ganhando impulso nas últimas décadas. Prince & Barford (1982a) notaram eficiente conversão de substrato em produto por linhagem floculante, em fermentador contínuo vertical, característica que permitiu elevadas taxas de alimentação e alta concentração celular no fermentador, sem a necessidade de complexidades mecânicas para recuperação celular, com níveis de produtividade muito

superiores aos sistemas convencionais. Semelhantes resultados foram obtidos na fermentação de caldo de cana (Prince & Barford, 1982b).

Comberbach & Bu'Lock (1984) relataram vantagens sobre a utilização de leveduras fortemente flocculantes, tais como: trata-se do mais simples sistema de imobilização celular (autoimobilização), necessária aos processos contínuos de fermentação; não ocorre a diminuição da capacidade do fermentador (formação de espaço morto) provocada pelos suportes para imobilização empregados nos processos convencionais; permite a manutenção de elevada densidade celular, sem o custo gerado pela utilização de centrífugas, de outros separadores mecânicos ou da ultrafiltração; os microrganismos contaminantes são facilmente removidos pelo próprio fluxo do sistema, não comprometendo seu desempenho.

Parazzi (1995), em uma série de experimentos comparativos entre leveduras flocculantes e a linhagem IZ 1904, constatou hegemonia da linhagem flocculante, denominada "Bonfim Floc", na fermentação alcoólica do caldo de cana, podendo ser aproveitado seu potencial tecnológico em aplicações industriais de produção de álcool e de aguardente, especialmente nos sistemas onde se emprega a decantação para a separação das células.

A remoção das leveduras do vinho a ser destilado traz benefícios relacionados à capacidade e à manutenção do aparelho de destilação, produzindo ainda destilado com menor teor de aldeídos (Suomalainen & Nykänen, 1966; Ribeiro & Horii, 1998).

2.2 Leveduras não produtoras de ácido sulfídrico

O ácido sulfídrico, sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico (H_2S) possui odor repugnante, o que, aliado ao seu baixo limite de detecção ("threshold"), torna indesejável a sua presença nas bebidas.

Rankine (1963) investigou as causas da formação deste gás nos vinhos, relacionando-as com o metabolismo das leveduras. Em seu trabalho, observou que o limite de detecção para o H_2S variava entre 0,1 e 1 $\mu\text{g/kg}$ em função do tipo de vinho, e que a formação de H_2S se dava a partir de enxofre elementar e de bissulfito, mas não de sulfato, cisteína, cistina ou metionina nas concentrações presentes no vinho. A formação a partir de sulfato foi verificada em meio sintético com pH inferior a 3. O autor ainda relata que a intensidade de produção do ácido sulfídrico é dependente da linhagem de levedura.

Zambonelli (1964a) fez determinações qualitativas e quantitativas de H_2S sobre 100 linhagens de levedura, verificando a existência de linhagens não produtoras e que as linhagens apresentavam diferentes habilidades de produção, sendo estas estáveis para cada linhagem. O autor observou a frequência de 2% de ocorrência de linhagens H_2S negativas em linhagens de interesse enológico, e verificou que a produção também se dava a partir dos íons sulfato e sulfito.

Posteriormente, o mesmo autor (Zambonelli 1964b) investigou a formação de H_2S sob o ponto de vista genético, concluindo que a capacidade das leveduras de produzir ou não ácido sulfídrico é estável, transmissível aos descendentes seguindo a hereditariedade mendeliana, sendo geneticamente controlada.

Giudici et al. (1993), estudando a formação de álcoois superiores em vinho, observaram que as linhagens não produtoras de H_2S produziam maiores quantidades de álcoois superiores, principalmente de n-Propanol. Resultados semelhantes foram obtidos por Ribeiro & Horii (1998).

Na fermentação da cerveja, o sulfeto de hidrogênio produzido pelas leveduras é removido durante a maturação. O emprego de linhagens com menor capacidade de produção de H_2S pode reduzir o tempo despendido pelo processo (Hammond, 1995).

2.3 Hibridação de leveduras por fusão de protoplastos

A escolha de um método para se criar variabilidade pela alteração do material genético decorre das particularidades de cada caso, como do objetivo fundamental, do metabolismo e do ciclo reprodutivo das linhagens, bem como da natureza do caráter (quantitativo ou qualitativo).

O método de fusão de protoplastos é uma ferramenta muito útil no estudo genético de microrganismos e na geração de variabilidade por hibridação, principalmente nos casos em que existe incompatibilidade sexual entre linhagens, espécies e até mesmo gêneros diferentes dos microrganismos envolvidos (Anné & Peberdy, 1976).

A geração de variabilidade seria interessante tanto para a reunião de características de interesse biotecnológico, quanto para se criar um microrganismo com características ímpares para facilitar sua detecção no processo.

A literatura a respeito de fusão de protoplastos em leveduras é muito diversificada, sendo as diferenças apresentadas na metodologia de obtenção, onde os requerimentos para a regeneração e fusão de protoplastos, tais como enzimas líticas, estabilizadores osmóticos e agentes fusogênicos, são variáveis. As metodologias empregadas também diferem quanto ao tempo de exposição à enzima, devendo-se, portanto, adequar a metodologia a cada caso particular (Ferenczy, 1985).

Carrau et al. (1982) utilizaram a fusão de protoplastos para a obtenção de uma linhagem intergenérica que expressasse a capacidade de *Schizosaccharomyces pombe* em decompor o ácido málico, para a redução de acidez em vinhos e a taxa de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Sulo et al. (1992), utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces oviformis*, obtiveram sucesso na transferência do caráter "killer" e na qualidade dos vinhos produzidos.

A associação das características de floculação intensa e caráter "killer" foi obtida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* por Javadekar et al. (1995).

Martins et al. (1999) obtiveram linhagens floculantes e H₂S negativas por fusão de protoplastos, observando instabilidade inicial para estes fenótipos e atribuindo-a à distância taxonômica entre as espécies parentais, comprovada por eletroforese do DNA intacto destas.

2.4 Identificação de leveduras

A identificação de leveduras vem sempre se destacando como um capítulo especial da microbiologia aplicada, sendo desenvolvidas

metodologias a cada dia mais precisas, em função das crescentes relações destes microrganismos com os campos de pesquisa e desenvolvimento, nas ciências de alimentos, ecologia, clínica e farmacêutica.

Nas indústrias de alimentos, as leveduras são importantes tanto como agentes de processo, quanto como agentes deterioradores. Sua identificação segue métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, que vêm acompanhando a evolução destas áreas específicas.

Um consenso entre os pesquisadores, conforme poderá ser observado nesta breve revisão, é o de que os métodos padrão ou tradicionais de identificação figuram sobre as obras de Barnett et al. (1983), que contém 469 espécies testadas em 83 reações bioquímicas e fisiológicas, Barnett et al. (1990), que apresenta 590 espécies identificáveis por 91 testes e de Kreger-van Rij (1984), que descreve detalhes morfológicos distintos das espécies de leveduras. Suas publicações anteriores também são consideradas.

Tais métodos demandam tempo considerável (7 a 10 dias), experiência na execução e interpretação dos resultados, espaço em função da vidraria e dos reagentes requeridos, o que também os tornam relativamente onerosos, e nem sempre são finalizados com êxito, chegando-se algumas vezes a resultados dúbios.

Segundo Deák & Beuchat (1987), o crescente número de espécies descritas, a frequente mudança de nomes e de sinônimos, aliados ao progresso de técnicas bioquímicas sofisticadas, acabam por dificultar o acompanhamento do desenvolvimento taxonômico. Uma vez que os métodos tradicionais, baseados em critérios morfológicos e fisiológicos (forma das células ou colônias, modo de reprodução sexuada e assexuada,

assimilação de açúcares e de alguns fatores de crescimento, dentre outros) e em bioquímicos (fenotípicos), são empregados para caracterizar o universo de leveduras descritas, o que foge às necessidades inerentes aos alimentos; os autores simplificaram tais métodos tradicionais pela eficiência de discriminação de cada teste individual, ordenação dos testes subsequentes e pela exclusão das espécies cuja ocorrência em alimentos não fora descrita (ou reconhecida como accidental). O método proposto divide as leveduras em 16 subgrupos pelo uso de 4 testes básicos e 3 adicionais para a finalização da identificação; cada subgrupo contém entre 6 e 31 espécies, sendo que os 7 testes básicos são necessários e suficientes para a identificação das espécies dos subgrupos menores, enquanto que são necessários de 7 a 8 testes adicionais para os maiores subgrupos. Tais testes não forneciam respostas variáveis, como "atrasada", "fraca", "incerta" ou "variável", permitindo apenas respostas binárias. Para sua execução são necessários apenas 3 tubos de ensaio e duas placas de Petri para a identificação de cada amostra, o que torna sua aplicação desejável na identificação de leveduras em alimentos, principalmente na rotina industrial.

Rohm & Lechner (1990), reavaliaram o método proposto por Deák & Beuchat (1987), sobre 12 espécies de referência (provenientes de coleções de leveduras) e 382 leveduras isoladas de laticínios que representavam 26 espécies, identificadas pelos métodos tradicionais. Obtiveram resultados insatisfatórios, uma vez que o sistema simplificado foi capaz de identificar apenas 3 das espécies de referência e 11, dentre as 26 espécies isoladas dos laticínios. Atribuíram tais resultados ao delineamento de sua base teórica, que não admite níveis de variabilidade.

Em contrapartida, Török & King Jr. (1991), comparando metodologias de identificação e tendo como referência o método de Kreger-van Rij (1984), mostraram que o método simplificado de Deák & Beuchat (1987) forneceu maior número de identificações corretas que os demais ($p \leq 0,05$), mediante aplicação em 239 colônias separadas por uma seleção morfológica inicial sobre isolados de vegetais processados e minimamente processados, coletados durante 3 anos sucessivos. Sugeriram que, para fins taxonômicos, deve-se empregar métodos padrão de identificação, particularmente o de Kreger-van Rij (1984), e para a rotina de identificação industrial, onde os métodos de identificação devem ser rápidos e não onerosos, o método simplificado de Deák & Beuchat (1987) é altamente recomendável.

A necessidade de miniaturização dos testes convencionais permitiu o desenvolvimento de "kits" comerciais de identificação, algumas vezes acompanhados de programas de computador para auxiliar na conclusão dos resultados.

Ison (1987) desenvolveu metodologia para aplicação do sistema API 50CH (API - BioMérieux, Basingstoke, UK.) na identificação de leveduras, com acesso objetivo da assimilação e com alto grau de reprodutibilidade; trata-se "kit" comercial contendo 49 testes de assimilação de carboidratos, em cujo meio de inoculação disponível traz especificações para utilização em grupos de microrganismos como *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilli*, *Streptococci* e *Bacilli*, sem qualquer informação para o emprego em leveduras. O autor empregou espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, notando que a incubação em aerobiose levou à produção de acidez (determinante de crescimento) em

todos os testes, inclusive na ausência de inóculo (teste controle), resultando na dificuldade para a discriminação entre assimilação positiva e negativa. Tal produção poderia ter sido em ocorrência da difusão de CO₂ atmosférico no meio, formando ácido carbônico e a consequente viragem do indicador. Outro interferente seria a habilidade das leveduras em metabolizar seus carboidratos de reserva, tais como a trealose e o glicogênio, produzindo acidez. O autor propôs então a utilização de culturas de leveduras que se encontrassem no final da fase "lag" de crescimento, fase em que os carboidratos de reserva se encontram em níveis mínimos, e a cobertura dos frascos de teste com parafina líquida, para evitar a entrada de CO₂ atmosférico. Mediante tais adaptações, conseguiu concordância com os testes de assimilação de Barnett (1983), para as espécies estudadas.

Heard & Fleet (1990), desenvolveram metodologia baseada em 33 testes de assimilação de carbono, 12 testes de fermentação de carboidratos, 6 testes de assimilação de nitrogênio, testes de crescimento em ausência de vitaminas, presença de ciclohexamida e testes de morfologia e de esporulação, montados em bandeja de microtitulação com 96 alvéolos, que neles continha os reagentes previamente desidratados a vácuo. Testaram este "kit" sobre 12 espécies de referência, comparando com a metodologia tradicional de identificação. Obtiveram concordância com o método padrão adotado, concluindo que deveria ser aplicado a maior número de espécies e mais estudado cientificamente para sua validação, uma vez que o mais dispendioso é o preparo dos reagentes, tendo como vantagens a economia de tempo, de espaço (dada pelas dimensões da estante, que permite ser acondicionada em embalagens plásticas de 12 x 19 cm), de vidraria e de reagentes, pois as reações ocorrem em pequenos

alvéolos, e não em tubos de ensaio ou placas de Petri. Determinaram ainda que as estantes preparadas se mantêm estáveis durante o armazenamento por período de 8 meses a 5 °C, o que sobrepõe os problemas de dessecação ou de contaminação, comuns no armazenamento prolongado de placas de Petri contendo meio de cultura, incorrendo na necessidade de preenchimento das placas, e preparo prévio do meio, em tempo próximo ao da determinação.

Seiler (1991), a partir dos testes tradicionais, desenvolveu uma batelada de testes sobre bandeja de microtitulação, incluindo 5 testes de assimilação (D-lyxose, D-turanose, gentibiose, N-acetil-D-glucosamina e D-arabitol), para aumentar a resolução, com grau de sucesso satisfatório para a identificação de leveduras que ocorrem em alimentos, mostrando que tais reações proporcionam maior potencial de diferenciação entre as espécies.

Li et al. (1995), utilizaram o "kit" ATB 32C em conjunto com o "software" APILAB Plus (API - BioMérieux, Basingstoke, UK.), que consiste na observação da metabolização de diferentes fontes de carbono, na identificação de leveduras ocorrentes em *Milicia excelsa*. Observaram que a maioria dos isolados da espécie *Cryptococcus laurentii* (espécie dominante), não assimilavam xilose, ramnose, L-arabinose, glucuronato, celobiose e lactose, característica positiva para o banco de dados de todas as linhagens desta espécie, no banco de dados APILAB. Em face a tal situação, os autores consideraram as hipóteses de: tratar-se de uma linhagem ainda não identificada; uma adaptação das linhagens ao ambiente; o banco de dados do sistema APILAB ser construído com finalidades clínicas.

Praphailong et al. (1997), avaliaram o sistema Biolog (Biolog Inc., Hayward, CA, USA), que compreende tecnologia semi-automatizada e computadorizada, consistindo em um "kit" comercial com 96 testes de assimilação e de oxidação, dispostos em estante de microtitulação, onde cada perfil metabólico da espécie em teste é comparado ao seu banco de dados, que contém 267 espécies. Examinaram 72 linhagens de 21 espécies de leveduras relacionadas a alimentos e bebidas, obtendo identificação correta de 49 destas linhagens, no nível de espécie. Frente aos resultados, os autores recomendaram o aumento do banco de dados para que se possa identificar maior número de espécies. Verificaram que o preparo das culturas para a inoculação na estante de testes influi nos resultados, o que obriga o fabricante a especificar as condições de preparação de inóculo, incluindo o meio de cultura e a concentração celular empregada. A idade das células também influi nos resultados. Sugerem, conseqüentemente, refinamentos no banco de dados e nos testes para que o sistema possa ser empregado com maior confiabilidade.

Encinas et al. (2000), compararam o "kit" ATB 32C (API System, Vercieu, France) e o VITEK Yeast Biochemical Card (YBC, BioMérieux VITEK Inc., Missouri, USA), com os métodos tradicionais, na identificação de leveduras em salsichas fermentadas. Obtiveram melhores resultados com o "kit" ATB 32C, por incluir maior número de testes e o dobro de espécies em seu banco de dados. Ainda assim, a utilização de ambos os sistemas permitiu a identificação de apenas 50% das espécies identificadas pela metodologia tradicional. (Kreger-van Rij, 1984 e Barnett, 1990).

Velázquez et al. (2001), afirmaram que a utilização de características morfológicas deve ser evitada na rotina da indústria de alimentos, pois demanda longo tempo de incubação e considerável experiência, necessária à interpretação dos resultados. Muitos "kits" comerciais para a identificação de espécies de interesse clínico, como o sistema API 32C (API - BioMérieux, Basingstoke, UK.), poderiam, teoricamente, ser aplicados aos demais tipos de leveduras. Os autores ressaltaram, entretanto, dois problemas advindos da utilização de tais "kits": os testes foram escolhidos de acordo com seu poder discriminatório sobre leveduras de interesse clínico, tendo seus bancos de dados formados a partir destas; para as demais espécies, muitos testes são redundantes, sendo que testes essenciais inexistem.

Em função da demanda por testes comerciais para a identificação de leveduras nos alimentos, que proporcionem resultados fidedignos, de fácil interpretação e de rápida aquisição dos resultados, preferencialmente com auxílio computacional, os mesmos autores compuseram um banco de dados com 168 espécies de leveduras e 92 testes bioquímicos e fisiológicos, construindo um "software" contendo tais bancos de dados, o qual permite a identificação exata da espécie em teste, mediante os resultados, ou sugere testes adicionais aos iniciais, para a correta identificação, quando necessária, como ocorre, por exemplo, entre *Saccharomyces barnetti* e *S. exiguus*, que não são passíveis de distinção pelos testes iniciais, ocasião em que o "software" informa a necessidade de outros testes para a correta identificação, como a assimilação de etanol.

Tal "software", denominado "Prole-Food", ainda oferece informações sobre características morfológicas que permitam a

identificação quando os testes anteriores não forem suficientes, tendo-se como exemplo, a produção de pseudomicélio para a distinção entre *Debaryomyces hansenii* e *D. maramus*. Caso os resultados fornecidos ao programa não coincidam com as espécies de seu banco de dados, é relatada uma lista das espécies mais próximas, que coincidam em 80% das características, informando ainda quais as características as distinguem da espécie em estudo.

O "kit" com os testes iniciais propostos pelos autores contém 22 reações que avaliam a utilização de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, resistência a agentes anti-fúngicos e à pressão osmótica. Este "kit" foi chamado "YeastIdent" e, em conjunto com o "software", identificou corretamente as espécies de referência, sendo ainda validado por técnica de eletroforese de RNA de baixo peso molecular.

Técnicas serológicas também foram descritas. Campbell (1971), avaliou 47 espécies de 13 gêneros, não obtendo correlações diretas entre agrupamentos taxonômicos e características serológicas. Porém, combinando os testes serológicos com crescimento em anaerobiose, morfologia e crescimento em lisina ou nitrato como fontes de nitrogênio, as espécies foram facilmente identificadas.

A simplificação veio em seguida (Campbell, 1972), sendo que os isolados que apresentavam as mesmas características serológicas e morfológicas (tamanho, forma e borda das colônias crescidas em WL agar - "Wallerstein Laboratories"), foram caracterizadas como da mesma espécie pelos métodos tradicionais de identificação, aplicados na identificação de leveduras de 3 diferentes ambientes: "flor" do Xerez, água de rio e dejetos.

Demostrou que se trata de sistema eficiente e menos laborioso para a identificação de espécies.

Oosthuizen et al. (1987), descreveram e compararam as composições de ácidos graxos de cadeia longa de 72 linhagens, representantes de 29 espécies de leveduras cervejeiras e selvagens. Com a metodologia empregada foi possível diferenciar a espécie *Saccharomyces cerevisiae* das demais envolvidas no estudo. O tempo requerido para a obtenção dos resultados foi de 4h, após a obtenção das células, enquanto que nos métodos tradicionais, foi de 10 dias.

Em adição aos testes convencionais, testes bioquímicos no nível molecular fornecem dados importantes para a caracterização das leveduras. Similaridades ou diferenças entre as principais macromoléculas celulares (DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos) podem ser utilizadas para elucidar não somente o grau de parentesco, como também as conexões evolutivas (Déak & Beuchat, 1987).

A separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE) constitui poderosa ferramenta para a identificação de leveduras (Bouix & Leveau, 1983), com poder de discriminação entre linhagens da mesma espécie. Porém, a principal desvantagem deste método, em conjunto com os demais métodos que avaliam características fenotípicas, é que se pode obter respostas diferentes para uma mesma linhagem ou espécie, dependendo do estágio metabólico em que esta se encontre. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu a criação de novas técnicas de identificação de leveduras, baseadas em análises sobre o DNA, uma vez que sua estrutura não varia com os estádios metabólicos (Ness et al, 1993).

De Jonge et al. (1986), empregaram a eletroforese de campo ortogonal alternado (OFAGE) na construção de perfis de cariótipos, pela separação dos cromossomos no gel de eletroforese, para a identificação de leveduras.

BASSO et al. (1993), empregaram a eletroforese do tipo TAFE (transverse alternating pulsed-field electrophoresis) na cariotipagem de linhagens de leveduras em unidades industriais de produção de etanol combustível. Relataram que o congelamento, a liofilização e o armazenamento por 9 meses, nestas condições, não acarretaram alterações no perfil de separação dos cromossomos de uma linhagem, o que também não ocorreu após sucessivos ciclos fermentativos desta linhagem. Observaram que as linhagens utilizadas como inóculo (TA, NF e Fleischmann) não persistiam nas dornas de fermentação nas escalas industriais, sendo totalmente substituídas por linhagens contaminantes após 40 dias de processo. Porém, uma linhagem utilizada como inóculo e isolada do próprio processo em safras anteriores (JA1), foi a única que persistiu ao longo da safra. As leveduras dominantes mostraram perfis distintos, evidenciando uma população bastante variada na dorna de fermentação, que se alteram em proporção no decorrer da safra. Sugerem ainda a exploração mais sistemática das habilidades fermentativas das leveduras dominantes, já selecionadas no processo industrial.

Sheehan et al. (1991), aplicaram a eletroforese do tipo CHEF (contour-clamped homogeneous electric field) na cariotipagem de linhagens de cervejaria. Otimizaram o método em sua resolução, obtendo resultados após 6 horas da obtenção da massa celular; demonstraram que a alta resolução do método permite a diferenciação de linhagens dentro de uma

mesma espécie, mesmo quando estas são muito semelhantes, o que permite: estudos taxonômicos e evolutivos; estudos de estabilidade de linhagens no nível cromossômico; utilização como método preparativo para extração de cromossomos ou genes; demonstrar modificações genéticas em recombinantes; proporcionar a possibilidade de localização de mudanças nos cromossomos, relacionadas a um fenótipo particular; utilização no controle de qualidade industrial.

Segundo Ness et al. (1993), a ação de enzimas de restrição sobre o DNA, seguida pela reação em cadeia da polimerase ("polimerase chain reaction - PCR), na presença de sequências conhecidas ("primers"), também chamada de amplificação, gera perfis distintos de bandas em gel de eletroforese, o que permite a identificação. A utilização de "primers" adequados permite amplificação de sequências específicas do DNA contido no genoma total da célula, o que permite a diferenciação de *Saccharomyces cerevisiae* no nível de linhagem. Desenvolveram metodologia baseada no número e no posicionamento das sequências δ (sequências de 0,3 kb que existem, estatisticamente, para cada 150 kb do genoma de leveduras), mediante a utilização de "primers" apropriados (δ_1 e δ_2), uma vez que estes parâmetros variam com a linhagem, confirmando seus resultados sobre diferentes linhagens, sendo que diferentes linhagens produziram diferentes perfis e, a mesma linhagem produziu perfis idênticos. Tal método permitiu a detecção de contaminações no nível de 1%.

Andriguetto et al. (2000), avaliaram a amplificação aleatória sobre os fragmentos de DNA (randomly amplified polymorphic DNA - RAPD), pela utilização da PCR, na identificação de leveduras em laticínios.

Compararam seus resultados com os do "kit" API 32C e com os métodos tradicionais. Afirmaram que a técnica é rápida, de fácil execução e reprodutibilidade, podendo representar uma alternativa aos métodos convencionais. Os autores sugeriram o aumento no banco de dados com inclusão de maior número de espécies de referência, para a melhoria da resolução e consequente identificação de maior número de espécies ou linhagens.

Gomes et al. (2000), compararam 4 métodos de identificação sobre 10 linhagens de leveduras, sendo 5 empregadas em fermentação para a fabricação de álcool combustível, e 5 isoladas de cerveja não pasteurizada, proveniente de 5 diferentes fábricas. Seus resultados obtidos da avaliação de 9 meios diferenciais, que continham indicadores/corantes, mostraram que tal metodologia não é capaz de diferenciar as linhagens utilizadas nas destilarias de álcool; quanto às linhagens provenientes de cervejarias, foi possível a distinção em 4 grupos, sendo um formado por 2 linhagens com 100% de similaridade e os demais, formados pelas linhagens individuais. A análise do perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) permitiu a diferenciação entre as linhagens, com exceção a duas linhagens de cervejaria, que não correspondiam aos resultados do método anterior e se assemelhavam às alcooleiras; mesmo assim, a variabilidade entre as linhagens da indústria alcooleira foi menor que a proveniente das linhagens cervejeiras. A análise do cariótipo (CHEF) permitiu a distinção de 3 grupos: um formado pelas 5 linhagens alcooleiras e pelas 2 linhagens cervejeiras, em acordo com o método SDS-PAGE, apresentando padrão típico de *Saccharomyces*, outro grupo formado por duas linhagens cervejeiras, as que apresentaram 100% de similaridade no teste em meio diferencial, e um

terceiro grupo formado por uma única linhagem, resultados que não permitiram a distinção entre linhagens da mesma espécie. Quanto à análise do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD), foi possível a distinção entre todas as linhagens estudadas, o que pode validar este método para identificação de linhagens de uma mesma espécie de interesse industrial. Concluíram que, para a rotina de análises industriais, o uso de meios diferenciais, apesar de simples, depende tempo e promove baixa eficiência; a análise do perfil proteico total (SDS-PAGE) foi eficiente, consistindo metodologia rápida e de baixo custo, porém, demanda experiência na interpretação dos resultados e rigorosa padronização de técnicas para se evitar o efeito ambiental sobre a expressão dos genes; o polimorfismo gerado pelo RAPD-PCR mostrou ser o método mais eficiente, pois produziu o maior número de variáveis, não sofrendo efeitos ambientais. Sugerem para a análise de leveduras das indústrias de álcool e cerveja, uma seleção inicial empregando meios diferenciais, seguida de SDS-PAGE ou RAPD.

Baleiras-Couto et al. (1995), considerando que um número muito grande de dados complexos pode ser gerado pela análise de RAPD, a leitura visual e o processamento dos dados dificultam a interpretação. A análise do componente principal (principal component analysis - PCA), é destinada a dados complexos como a composição de ácidos graxos ou perfis de ressonância magnética nuclear; trata-se de análise estatística que combina características correlatas em grupos de variáveis independentes chamadas "componentes principais"; a vantagem de seu emprego em dados multivariados é a de que os resultados são apresentados em gráfico, revelando imediatamente a similaridade ou dissimilaridade das amostras de

referência. Neste gráfico, amostras semelhantes tendem a se agrupar, enquanto que se distanciam em função direta do grau de dissimilaridade. Estes autores utilizaram a técnica de RAPD e a amplificação da menor sub-unidade do DNA ribossômico (ss rDNA), uma vez que são previstos altos graus de homologia entre linhagens da mesma espécie, com as finalidades de se confirmar o grau de parentesco entre linhagens de leveduras e para suprir o programa PCA com maior número de dados. Empregaram 32 isolados de leveduras e 11 linhagens conhecidas, provenientes de coleção. Tais técnicas se mostraram como poderosas ferramentas para a identificação de leveduras, de forma a serem sugeridas para estudos de relações genéticas no nível de espécie e, dependendo dos "primers" utilizados, são capazes de distinguir sub-espécies e linhagens.

Em função da necessidade do controle microbiológico em processos de fermentação alcoólica com reciclo de células, o melhor método de identificação, a exemplo de outros processos biotecnológicos que empregam leveduras, seria o que permitisse melhor resolução, maior precisão, com a menor demanda de trabalho, material e espaço. Infelizmente, tal método não é conhecido (Deák & Beuchat, 1987).

Assim, a escolha de uma linhagem com características ímpares, de baixíssima frequência de ocorrência na natureza ou naturalmente inexistente, construída por meio de engenharia genética, em muito facilitaria sua identificação, bem como a determinação do grau de contaminação nos diferentes estádios do processo fermentativo.

Com tal intuito, Hinrichs et al. (1999), construíram uma levedura pela clonagem de gene que codifica a beta-glucanase de cevada,

no gene LEU2 de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, o que permitia precisão em sua identificação.

Martins et al. (1999) utilizaram a fusão de protoplastos para produzir recombinantes que apresentassem o caráter H₂S negativo e floculação, características discutidas em estudos de fermentação do caldo de cana (Ribeiro & Horii, 1999) e na qualidade da aguardente (Ribeiro & Horii, 1998).

et al.,

Os autores relataram que as primeiras linhagens recombinantes isoladas para estudo (Martins 1999), não apresentaram estabilidade para tais características em conjunto. Demais populações recombinantes, não selecionadas para tais características, foram submetidas à seleção no presente estudo, para se verificar as características da linhagem selecionada na fermentação do caldo de cana, com o objetivo de viabilização de um método para avaliação do controle de qualidade de inóculo em processos de fermentação alcoólica com reciclo de células.

3 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba - São Paulo.

Consistiu basicamente na seleção e no acompanhamento da manutenção das características em estudo, sobre um banco de produtos de fusão de protoplastos, provenientes de Martins et al. (1999), conforme descrito a seguir.

3.1 Microrganismos

Foram empregados os seguintes microrganismos:

- Produtos de fusão de protoplastos entre mutantes auxotróficos de linhagem não produtora de ácido sulfídrico (IZ 987) e de linhagem floculante (ABXR.11B), estocados em frascos contendo meio YEPDA inclinado e óleo mineral, a temperatura de 5 °C , num total de 12 frascos (Martins et al. 1999);

- Linhagens pré-selecionadas para estas características, em número de 13, provenientes do mesmo trabalho, armazenadas em tubos de ensaio com meio YEPDA inclinado, a 5 °C.

- Linhagem isolada a partir de fermento de panificação comercial.

3.2 Meios de cultura

- “Yeast extract peptone dextrose” (YEPD), para a seleção da característica de floculação, de composição (% g/L):

Extrato de levedura.....	1%
Peptona.....	1%
Glicose.....	2%

- “Yeast extract peptone dextrose agar” (YEPDA), para armazenamento de linhagens e para isolamento de colônias, com composição:

Extrato de levedura.....	1%
Peptona.....	1%
Glicose.....	2%
Agar.....	1,5%

- “Bacto Bismuth Sulfite Agar desidratado” - DIFCO - (BSA)

para a seleção da característica de não produção de ácido sulfídrico, com a seguinte composição (g/L):

Extrato de carne.....	5
Peptona.....	10
Glicose.....	5
Fosfato dissódico.....	4
Sulfato ferroso.....	0,39
Sulfeto de bismuto.....	8
Agar.....	20
Verde brilhante.....	0,025

- “Bacto W L Nutrient Medium Desidratado” – Difco – (WLN), utilizado no acompanhamento do crescimento celular durante as fermentações em ensaio de cultivo misto, com composição (g/L):

Extrato de levedura.....	4,0
Casitona.....	5,0
Dextrose.....	50,0
Fosfato monopotássico.....	0,55
Cloreto de potássio.....	0,425
Cloreto de cálcio.....	0,125
Sulfato de magnésio.....	0,125

Cloreto férrico.....	0,0025
Sulfato de manganês.....	0,0025
Agar.....	20,0
Verde de bromo cresol.....	0,022

- Caldo de cana clarificado (Ribeiro & Horii, 1999), esterilizado nos tratamentos em geral, com exceção ao ensaio de reciclagem da linhagem selecionada, porém, sem suplementação.

3.3 Seleção de linhagens não produtoras de ácido sulfídrico

Em função da maior facilidade de diferenciação de recombinantes, a seleção para a característica de não produção de ácido sulfídrico foi primeiramente efetuada.

As linhagens selecionadas foram então diretamente inoculadas sobre placas (em triplicata), contendo o meio BSA, para se acompanhar a estabilidade desta característica.

As populações de microrganismos produtos de fusão de protoplastos foram inoculadas em superfície sobre o meio de cultivo YEPDA (em triplicata), após a eliminação do óleo mineral, elaboração de suspensão e diluição seriada desta até a ordem de 10^{-10} .

As placas que apresentaram crescimento adequado ao isolamento foram replicadas em meio BSA, no qual as linhagens H_2S negativas formam colônias com coloração branca e as produtoras adquirem coloração escura, variando desde o marrom claro ao negro, em função da intensidade de produção.

Em todos os casos a temperatura e o tempo de incubação foram de 30 °C e de 24 a 48 horas, respectivamente.

3.4 Seleção de linhagens floculantes

O teste de floculação foi efetuado empregando-se o meio YEPD, através da visualização da formação de flocos após período de incubação de 48 horas em "shaker" New Brunswick, sob agitação orbital de 100 rpm e temperatura de 30 °C. Foram empregados frascos "erlenmeyers" de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio.

As linhagens previamente selecionadas foram diretamente inoculadas a partir de seus respectivos tubos de estoque.

Quanto às populações contendo híbridos e segregantes, produtos da fusão de protoplastos, foi utilizado inóculo proveniente das colônias que não produziram ácido sulfídrico, após transferência para tubos estoque contendo YPDA inclinado.

3.5 Avaliação do crescimento dos recombinantes em mosto de caldo de cana

Os recombinantes que não apresentaram a característica de produção de H₂S foram armazenados em tubos contendo meio YEPDA inclinado. A partir destas culturas estoque, foram efetuadas suspensões em água destilada e esterilizada, contendo concentração celular de 1,5 g/L

(matéria seca), para inocular frascos “erlenmeyers” de 250 mL, contendo 100 mL de mosto de caldo de cana esterilizado. A taxa de inoculação foi de 15,0 mg/L (matéria seca).

Os frascos foram incubados em “shaker” New Brunswick, com agitação orbital de 100 rpm, a 30 °C por 24 horas.

Decorrido o tempo de incubação, foram tomadas alíquotas dos vinhos para a determinação da absorbância em espectrofotômetro, empregando-se o comprimento de onda de 600 nm, após sucessivas centrifugações e lavagens do precipitado, seguidas pela diluição da alíquota original em proporção de 1:10 (v/v).

3.6. Ensaio comparativo para a avaliação dos parâmetros cinéticos do recombinante selecionado.

A metodologia utilizada neste ensaio está descrita a seguir.

3.6.1 Multiplicação do inóculo

A partir de culturas estoques da linhagem recombinante e da linhagem isolada do fermento de panificação comercial, foram efetuadas suspensões em água destilada e esterilizada com concentração celular de 1,5 g/L (matéria seca). Esta suspensão foi utilizada para inocular frascos “erlenmeyers” de 250 mL, contendo 100 mL de meio YEPD, com taxa de inoculação de 15 mg/L.

A massa celular produzida em cada frasco, após 24 horas de incubação a 30 °C e 100 rpm de agitação no “shaker” New Brunswick, foi

empregada na inoculação de cada dorna de fermentação contendo 4 L de mosto de caldo de cana clarificado e esterilizado, em fermentador com capacidade para 3 dornas.

Manteve-se a temperatura de fermentação em 30 °C e a agitação (por palhetas) em 100 rpm. Após o término da fermentação, a massa celular foi separada por centrifugação, seguida por lavagens consecutivas do precipitado.

3.6.2 Ensaio comparativo e parâmetros estudados

As fermentações deste ensaio transcorreram no fermentador anteriormente descrito, nas mesmas condições de temperatura e de agitação.

Foram efetuadas 3 repetições para cada tratamento, utilizando-se taxa de inoculação de 4 g/L (matéria seca).

O volume de mosto clarificado e esterilizado utilizado em cada dorna de fermentação foi de 4 L.

As determinações analíticas e os cálculos efetuados foram:

- brix areométrico (COPERSUCAR, 1987), efetuada sobre caldos tratados, mostos e mostos em fermentação;

- Açúcares redutores totais (ART), através do método espectrofotométrico de Somogyi & Nelson, segundo Neish (1952), utilizando-se espectrofotômetro digital COLEMAN modelo SP35-D, efetuada sobre os mostos e mostos em fermentação;

- Concentração de leveduras, pelo método espectrofotométrico proposto por Stratford & Keenan (1988);

- Teor alcoólico, através da conversão por tabela apropriada, do valor de densidade obtida pelo densímetro digital A. PAAR modelo DmA-45 (Barone, 1994).

- Concentração celular produzida (matéria seca), segundo a equação:

$$X = X_f - X_0, \text{ onde:}$$

X = concentração celular produzida (g/L);

X_f = Concentração celular final (g/L);

X_0 = Concentração celular inicial (g/L).

- Porcentagem de células produzidas ($X_{\%}$), segundo a equação:

$$X_{\%} = \frac{X}{X_f} \times 100$$

- Açúcar consumido (expresso em glicose):

$$S = - (S_f - S_0), \text{ onde:}$$

S = açúcar consumido (g/L);

S_f = concentração final de açúcares (g/L);

S_0 = concentração inicial de açúcares (g/L).

- Fator conversão de substrato em biomassa, segundo a equação:

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{X}{S}, \text{ onde:}$$

$Y_{\frac{x}{s}}$ = fator de conversão de substrato em biomassa.

- Etanol produzido:

$$P = P_f - P_i, \text{ onde:}$$

P = etanol produzido (g /L);

P_f = concentração de etanol final (g/L);

P_i = concentração de etanol inicial (g/L).

- Fator de conversão de substrato em etanol:

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{P}{S}, \text{ onde}$$

$Y_{\frac{p}{s}}$ = fator de conversão de substrato em etanol (g/g).

- Produtividade de etanol:

$$PR = \frac{P}{t}, \text{ onde:}$$

PR = produtividade de etanol (g/Lh),

t = tempo de fermentação (h).

- Eficiência de fermentação ($\eta_P(\%)$), com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (51,1 % g/g):

$$\eta_{P(\%)} = \frac{Y_{\frac{p}{s}} \times 100}{51,1} \times 100$$

- Velocidade específica máxima de crescimento, segundo o coeficiente angular da equação da reta do logaritmo neperiano da concentração de leveduras em função do tempo de fermentação, correspondente à fase exponencial de crescimento, determinada por regressão linear (Pirt, 1985):

$$\ln[X] = \mu \cdot t + b, \text{ onde:}$$

$\ln[X]$ = logaritmo neperiano da concentração de leveduras na fase exponencial de crescimento;

μ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

t = tempo (h);

b = coeficiente linear da equação do logaritmo da concentração de leveduras em função do tempo de fermentação, na fase exponencial de crescimento.

3.7 Acompanhamento do recombinante mediante reciclo celular

A massa celular da linhagem selecionada, necessária para a inoculação da fermentação inicial, foi obtida conforme a metodologia descrita no item 4.6.1.

Foram efetuadas 5 fermentações com 3 repetições, nas condições descritas no item 4.6.2.

Ao final de cada fermentação, foram determinadas:

- Viabilidade celular, pela metodologia descrita por COPERSUCAR (1987);

- Porcentagem de recuperação de H_2S negativas, através da contagem das unidades formadoras de colônias pelo plaqueamento em

superfície de diluições do vinho da ordem de 10^{-4} a 10^{-7} , em triplicata, sobre o meio BSA.

Foi definida como porcentagem de recuperação de H_2S negativas o resultado da expressão:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{ de colônias totais} - \text{n}^\circ \text{ de colônias } H_2S \text{ positivas})100}{\text{n}^\circ \text{ de colônias totais}}$$

n° de colônias totais

3.8 Recuperação do recombinante em cultura mista com fermento de panificação.

Neste ensaio a taxa inicial de inoculação (matéria seca) foi de 4 g/L, sendo 2 g/L da linhagem selecionada e 2 g/L da linhagem isolada a partir do fermento de panificação comercial.

Foram efetuadas 3 repetições em dornas contendo 4 L do mosto de caldo de cana esterilizado anteriormente descrito.

Amostras do início e do término das fermentações foram diluídas em proporções de 10^{-4} a 10^{-7} , plaqueadas em meio WLN e, após 24 horas de incubação a 30 °C, replicadas para o meio diferencial BSA.

Todos os plaqueamentos foram efetuados em triplicata.

As concentrações médias das linhagens H_2S negativas (linhagem selecionada) e positivas (fermento de panificação) foram expressas em UFC/mL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos ensaios são a seguir apresentados.

4.1 Acompanhamento das linhagens previamente selecionadas

Após 6 meses de armazenamento com repicagens periódicas, as linhagens previamente selecionadas não foram capazes de manter a característica de não produção de ácido sulfídrico mantendo, porém, a característica de floculação, conforme ilustra a tabela 1.

4.2 Seleção sobre os produtos de fusão

Os produtos de fusão que apresentaram colônias não produtoras de ácido sulfídrico foram os nomeados PF 67b, PF77, PF 132b e PF170. Em todos os casos não ocorreram colônias produtoras deste ácido.

Entretanto, as massas celulares provenientes destas colônias não foram capazes de flocular em meio YPD líquido, conforme ilustra a Tabela 2.

Tabela 1. Comportamento das linhagens em relação aos parâmetros de seleção.

Linhagens	Produção de ácido sulfídrico	Floculação
PF 7/2	+	+
PF 7/3	+	+
PF 7/7	+	+
PF 7/21	+	+
PF 7/24	+	+
PF 7/29	+	+
PF 7/35	+	+
PF 67/3	+	+
PF 67/13	+	+
PF 67/14	+	+
PF 70/26	+	+
PF 70/24	+	+
PF 70/29	+	+
(+) expressa a característica		

Tabela 2. Seleção de linhagens não produtoras de ácido sulfídrico e flocculantes.

Produtos de fusão	Número de colônias que expressaram as características	
	H ₂ S negativa	Floculação
PF 6	0	nd
PF 7b	0	nd
PF 65	0	nd
PF 67b	19	0
PF 70b	0	nd
PF 72	0	nd
PF 73	0	nd
PF 74	0	nd
PF 77	9	0
PF 130	0	nd
PF 132b	5	0
PF 170	11	nd

nd = não determinado

A instabilidade observada para as características em estudo pode ter sido devida ao distanciamento taxonômico entre as linhagens originais (IZ 987 e ABXR 11B), observado pelas diferenças entre os perfis eletroforéticos de seus cariótipos e pelo baixo coeficiente de similaridade determinado por dendrograma obtido de RAPD, obtidos por Martins et al. (1997).

Heluane *et al.* (1993) verificaram alteração dos genomas em relação aos parentais, dos produtos de fusão entre *Pachysolen tannophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*, em função do distanciamento taxonômico, reforçando a hipótese anterior.

Este fato sugere a utilização de um maior número de linhagens originais para emprego neste tipo de técnica de hibridação, o que aumentaria a possibilidade de se obter recombinantes estáveis para as características em estudo, pelo aumento da probabilidade de compatibilidade entre os parentais.

4.3 Crescimento de linhagens em mosto de caldo de cana

A Tabela 3 ilustra o crescimento, expresso em absorbância, das linhagens não produtoras de ácido sulfídrico, em mosto de caldo de cana, após 24 horas de incubação e diluição 1:10 (v/v)

Tabela 3. Unidades de absorvância ($\lambda=600$ nm) após 24 h de fermentação.

Linhagens	A _{600nm}	Linhagens	A _{600nm}
PF67b1	0,013	PF67b19	0,004
PF67b2	0,004	PF132b1	0,004
PF67b3	0,000	PF132b2	0,018
PF67b4	0,004	PF132b3	0,022
PF67b5	0,000	PF132b4	0,538
PF67b6	0,000	PF132b5	0,292
PF67b7	0,013	PF170a1	0,086
PF67b8	0,004	PF170a2	0,004
PF67b9	0,004	PF170a3	0,080
PF67b10	0,004	PF170a4	0,080
PF67b11	0,013	PF170a5	0,031
PF67b12	0,004	PF170a6	0,080
PF67b13	0,008	PF170a7	0,004
PF67b14	0,004	PF170a8	0,004
PF67b15	0,013	PF170a9	0,070
PF67b16	0,004	PF170a10	0,004
PF67b17	0,018	PF170a11	0,004
PF67b18	0,004		

O melhor crescimento foi obtido com a linhagem PF132b4, a qual foi eleita para dar continuidade aos ensaios, denominando-a desde então de “Tratamento PF132b4”.

4.4 Ensaio comparativo para a avaliação dos parâmetros cinéticos do recombinante selecionado.

O crescimento de leveduras (X), o etanol produzido (P) e a concentração do substrato (S) no decorrer das fermentações estão representados pelas figuras 1 (Tratamento PF132b4) e 2 (Tratamento FP).

Figura 1 – Cinética fermentativa – Tratamento PF132b4.

Figura 2 – Cinética fermentativa – Tratamento FP.

Os dados de produção de etanol, pelo critério utilizado, definiram que as fermentações duraram 15 horas, em ambos os tratamentos.

Através destas figuras pode se observar perfis de comportamento muito semelhantes entre as linhagens, os quais foram traduzidos em parâmetros cinéticos representados na Tabela 4.

Observando-se a evolução da multiplicação celular dos tratamentos, nota-se que a maior velocidade de crescimento foi verificada no período compreendido entre a terceira e a sexta hora de fermentação, sendo, portanto, este o período utilizado para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento, segundo as equações de regressão linear representadas pelas figuras 3 e 4.

Figura 3 – Equação de regressão para o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ – Tratamento PF132b4.

Figura 4 – Equação de regressão para o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ – Tratamento FP.

Tabela 4. Parâmetros de fermentação das linhagens estudadas (médias de 3 repetições).

Parâmetros	PF132b4	FP
Tempo de fermentação (h)	15	15
X_0 =Concentração de células inicial (g/L)	4,00	4,00
X_f =Concentração de células final (g/L)	11,7	11,5
X =Concentração celular produzida (g/L)	7,7	7,5
$X_{\%}$ =Porcentagem de células produzidas (%)	65,8	65,2
S =Açúcar consumido (g/L)	127	126
$Y_{\frac{x}{s}}$ =Fator de conversão de substrato em biomassa	0,0606	0,0595
P =Etanol produzido (g/L)	50,6	48,8
$Y_{\frac{p}{s}}$ =Fator de conversão de substrato em etanol (g/g)	0,398	0,387
PR =Produtividade de etanol (g/Lh)	3,37	3,25
$\eta_P(\%)$ =Eficiência de fermentação (%)	77,9	75,7
μ max. (h^{-1})*	0,158	0,172

* Período compreendido entre 3 e 6 horas decorridas das fermentações

Os parâmetros cinéticos estudados não evidenciaram grandes discrepâncias entre as linhagens, mostrando que a linhagem selecionada possui mesmo potencial fermentativo que a linhagem obtida do fermento prensado industrial, comumente utilizado em processos fermentativos de álcool e aguardente.

Em estudo comparativo entre linhagens de levedura, Parazzi (1995) obteve eficiência de fermentação de 58,7% com a linhagem IZ 1904, que tem sido considerada como referencial em ensaios de fermentação, bem como largamente utilizada em indústrias de álcool, e valores ao redor de 80% para as demais leveduras de seu ensaio, limites entre os quais se encontram as linhagens do presente trabalho.

Em caldo de cana clarificado (10 brix), Parazzi (1995) obteve valores de produtividade de etanol situados entre 3 e 4 g/Lh, concordantes com os obtidos nas condições deste experimento porém, superiores aos obtidos por Nóbrega (1994), com produtividade de 2,2 g/Lh.

Os valores de velocidade específica máxima de crescimento de seu experimento em muito se aproximam dos obtidos por Ribeiro & Horii (1999) e dos calculados a partir dos dados de Parazzi (1995), que variavam de 0,03 a 0,13 h⁻¹.

4.5 Acompanhamento do recombinante mediante o reciclo celular.

A Tabela 5 ilustra os resultados de viabilidade celular e de porcentagem de recuperação da linhagem PF132b4, após o término de cada fermentação.

Tabela 5. Viabilidade celular e porcentagem de colônias H₂S negativas no inóculo reciclado.

Fermentação	Viabilidade (%)	Recuperação de H ₂ S negativas (%)
1	98	100
2	96	100
3	97	100
4	95	100
5	97	100

Estes resultados mostraram que o tratamento térmico do mosto para sua clarificação, associado às condições de assepsia na condução das fermentações e ao próprio metabolismo da linhagem durante

a fermentação alcoólica, foram suficientes para que não ocorressem contaminações por microrganismos produtores de ácido sulfídrico nos níveis detectáveis pela metodologia empregada, na qual o meio diferencial BSA favoreceu satisfatoriamente a obtenção dos resultados.

Este estudo deve ser ampliado em escala e em número de ciclos, para que se possa delinear recomendações adequadas.

A Figura 5 mostra uma placa de Petri contendo o meio BSA inoculado diretamente com o vinho proveniente da quinta fermentação.

Figura 5 – Colônias obtidas da inoculação direta do vinho da última fermentação, sobre o meio BSA.

4.6 Recuperação do recombinante em cultura mista com o fermento de panificação.

Os resultados obtidos do ensaio de fermentação com cultura mista da linhagem PF132b4 com a isolada do fermento de panificação, após a replicação das colônias obtidas do meio WLN no meio BSA, após 24 horas de incubação, encontram-se ilustrados na tabela 6.

Tabela 6. Unidades formadoras de colônias no início e término das fermentações (médias de 3 repetições).

	UFC/mL		
	H ₂ S negativas	H ₂ S positivas	Total
Início de fermentação	$1,0 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$
Final de fermentação	$2,8 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$5,7 \cdot 10^8$

Como as linhagens em estudo apresentaram comportamentos cinéticos semelhantes, mostraram também crescimento semelhante quando plaqueadas em superfície, não indicando antagonismo entre elas, dado pela manutenção da proporcionalidade entre as colônias H₂S negativas e positivas. Tal fato infere na aplicabilidade do meio BSA como indicador da recuperação de linhagens e avaliação do grau de contaminação em processos que utilizam o caráter de não produção de ácido sulfídrico como marcador.

Exemplos do crescimento no meio diferencial da fermentação em cultura mista são ilustrados pelas figuras 6 e 7.

Figura 6 – Inoculação direta de 0,1 mL de diluição 10^{-4} de mosto em meio BSA, após 24 horas de incubação.

Figura 7 – Aspecto da replicação em meio BSA das colônias obtidas em meio WLN, a partir de diluição de 10^{-7} de amostra no final da fermentação.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram montados os ensaios, este trabalho permitiu concluir que:

a) As linhagens submetidas à técnica de transformação por fusão de protoplastos não produziram recombinantes que mantivessem as características de não produção de ácido sulfídrico e de floculação conjuntamente;

b) A linhagem selecionada produziu parâmetros cinéticos semelhantes ao da linhagem isolada a partir do fermento de panificação comercial, podendo ser empregada em estudos futuros de fermentação alcoólica;

c) O meio diferencial BSA permitiu a avaliação da reciclagem do inóculo, proporcionando resultados coerentes, tanto em cultura pura da linhagem selecionada, quanto em fermentações de cultura mista com a linhagem isolada a partir do fermento de panificação. Porém, há ainda a necessidade da comparação desta metodologia proposta com outros métodos de identificação, e a inclusão de mais uma característica na linhagem selecionada, para que se possa diminuir ainda mais a probabilidade de ocorrência de microrganismo com metabolismo similar na natureza, surtindo-se assim, maior precisão e acuidade neste tipo de avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIGUETTO, C.; PSOMAS, E.; TZANETAKIS, N. et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.1, p.5-9, Jan. 2000.

ANNÉ, J.; PEBERDY, J.F. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glicol. **Journal of General Microbiology**, v.92, p.413-417, 1976.

BALEIRAS-COUTO, M.M.; VOGELS, J.T.W.E.; HOFSTRA, H. et al. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification technics for food-borne yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, n.5, p.525-535, May 1995.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 811p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1002p.

BARONE, M.C. Influência da condução do processo de fermentação sobre a qualidade e produtividade do hidromel. Piracicaba, 1994. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M. et al. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro, 1993. **Anais**. Águas de São Pedro: STAB - Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 1993. p.246-250.

BOUIX, M.; LEVEAU, J.Y. Electrophoretic study of the macromolecular compounds excreted by yeasts: application to differentiation between strains of the same species. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, n.2, p.133-142, Feb.1983

CAMPBELL, I. Numerical taxonomy of various genera of yeasts. **Journal of General Microbiology**, v.67, p.223-231, 1971.

CAMPBELL, I. Simplified identification of yeasts by a serological technique.

Journal of the Institute of Brewing, v.78, n.3, p.225-229, May 1972

CARRAU, J.L.; AZEVEDO, J.L.; SUDBERY, P.; CAMPBELL, D. Methods

for recovering fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Revista**

Brasileira de Genética, v.5, n.1, p.221-226, 1982.

COMBERBACH, D.M.; BU'LOCK, J.D. Continuous ethanol production

in the gas-lift tower fermenter. **Biotechnology Letters**, v.6, n.2, p.129-134, Feb. 1984.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL

DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Fermentação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, Divisão industrial. 1987. 434p.

DEÁK, T.; BEUCHAT, L.R. Identification of food-borne yeasts. **Journal**

of Food Protection, v.50, n.3, p. 243-264, Mar. 1987.

DE CLERCK, J. **A textbook of brewing**. London: Chapman & Hall, 1957.

587p.

DE JONGE, P.; DE JONGH, F.C.M.; MEIJERS, R.; et al. Orthogonal-field-

alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts.

Yeast. v.2, n.2, p.193-204, Feb. 1986.

- FERENCZY, L. Protoplasts fusion in yeasts. In: PEBEERDY, J.F.; In: FERENCZY, L. (Ed.) **Fungal protoplasts: applications** In biochemistry and genetics. New York: Marcel Dekker, 1985. v.6, cap.14, p.279-306.
- FRANCO, C.J. A fermentação alcoólica. *Saccharum STAB*, v.1, n.3, p.31-36, 1978.
- GIUDICI, P. ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having a impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.44, n.1, p.17-21, 1993.
- GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ARGUESO, J.L. et al. Methods for yeast characterization from industrial products. **Food Microbiology**, v.17, n.2, p.217-223, Apr. 2000.
- HAMMOND, J.R.M. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. **Yeast**, v.11, n.16, p. 1613-27, Dec. 1995.
- HEARD, G.M.; FLEET, G.H. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, n.5, p.447-451, May 1990.
- HELUANE, H.; SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.; FIGUEIROA, L. de; CALLIERI, D.A.S. Characterization of hybrids obtained by protoplast

fusion, between *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Applied Microbiology and Biotechnology, v.40, p.98-100, 1993.

HINRICHS, J.; JUTERSCHNIG, U.; STAHL, U. DNA labelling for unambiguous identification of yeast strains. **Branntweinwirtschaft**, v.139, n.8, p.118-122, Aug. 1999.

ISON, R.W. A revised method for the application of API 50CH carbohydrate kits to yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v.4, n.1, p. 9-11, Jan. 1987.

JAVADEKAR, V.S.; SIVARAMAN, H.; GOKHOLE, D.V. Industrial yeast strain improvement: construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, n.2, p.94-102, 1995.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts**, a taxonomic study. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984.1082 p.

LI, H.; VEENENDAAL, E.; AB SHUKOR, N.A. et al. Yeast populations on the tropical timber tree species *Milicia excelsa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.322-326, May 1995.

LIBICKI, S.B.; SALMON, P.M; ROBERTSON, C.R. Effective diffusive permeability of a non reacting solute in microbial cell aggregates.

Biotechnology and Bioengineering, v.32, n.1, p.68-85, Jun. 1988.

LOGAN, B.E.; HUNT, J.R. Bioflocculation as a microbial response to substrate limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 2, p. 91-101, Feb. 1988.

MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Characterization of fusion products protoplasts of yeasts and their segregants by electrophoretic karyotyping and RAPD. **Revista de Microbiologia**, v.30, n.1, p.71-76, Jan. 1999

NEISH, A.C. Determination of reducing sugars. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA. **Analytical methods for bacterial fermentation**. 2.ed. Saskatoon,1952, p.34. (Report, 46-8-3).

NESS, F.; LAVALLÉE, F.; DUBOURDIEU, D. et al. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.62, n.1, p.89-94, Jan. 1993

NÓBREGA, I.C.C. Características da qualidade de aguardentes de cana comerciais e comparação entre dois processos de fermentação. Viçosa, 1994. 67p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa

OOSTHUIZEN, A.; KOCK, J.F.L.; VILJOEN, B.C. et al. The value of long-chain fatty acid composition in the identification of some brewery yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, n. 3, p. 174-176, May 1987.

PARAZZI, C. Fermentação alcoólica com leveduras floculantes. Rio Claro, 1995, Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista.

PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Oxford: Blackwell, 1985, 274p.

PRAPHAILONG, W.; VAN GESTEL, M.; FLEET, G.H. et al. Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts. **Letters In Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p.455-459, Jun. 1997.

PRINCE, I.G.; BARFORD, J.P. Continuous tower fermentation for power ethanol production. **Biotechnology Letters**, v.4, n.4, p.263-8, Apr. 1982.

PRINCE, I.G.; BARFORD, J.P. Tower fermentation of sugar cane juice. **Biotechnology Letters**, v.4, n.7, p.469-74, Jul.1982.

RANKINE, B.C. Nature, origin and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.14, p.79-91, Feb.1963.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Efeito de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na tecnologia de aguardente de cana. (compact disc). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., Rio de Janeiro, 1998. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998.

RIBEIRO, C.AF.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola**, v.56, n.2, p.255-263, abr./jun.1999.

ROHM, H.; LECHNER, F. Evaluation and reliability of a simplified method for identification of food-borne yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.5, p.1290-1295, Jul.1990

SEILER, H. Some additional physiological characteristics for the identification of food-borne yeasts. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.45, n.4, p.253-258, Apr.1991.

SHEEHAN, C.A.; WEISS, A.S.; NEWSON, I.A. et al. Brewing yeast identification and chromosome analysis using high resolution CHEF gel

- electrophoresis. **Journal of the Institute of Brewng**, v. 97, n.3, p. 163-167, May 1991
- STRATFORD, M.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. **Yeast**, v.4, p.107-15, 1988.
- SULO, P.; MICHALCÁKOVÁ, S.; REISER, V. Construction and properties of K1 type killer wine yeasts. **Biotechnology Letters**, v.14, n.1, p.55-60, 1992.
- SUOMALAINEN, H. & NYKÄNEN, L. The aroma components produced by yeast in nitrogen-free sugar solution. **Journal of the Institute of Brewing**, v.72, p.469-79, 1966.
- TÖRÖK, T.; KING JR., A.D. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1207-1212, Apr. 1991.
- VELÁZQUEZ, E.; CRUZ-SÁNCHEZ, J.M.; RIVAS-PALÁ, T. et al. Yeastident-food/prolefood, a new system for the identification of food yeasts based on physiological and biochemical tests. **Food Microbiology**, v.18, n.6, p.637-646, Dec. 2001.

ZAMBONELLI, C. Ricerche genetiche sulla produzione di idrogeno solforato in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.14, p.143-153, 1964.

ZAMBONELLI, C. Ricerche biometriche sulla produzione di idrogeno solforato da solfati e solfiti in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**. Milano, v.14. p.129-141, 1964.