

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol

Vanda Renata Reis

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2011**

Vanda Renata Reis
Engenheira Agrônoma

Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol

Orientador:
Prof^a. Dra. **SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Reis, Vanda Renata

Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol / Vanda Renata Reis. - - Piracicaba, 2011.

80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Contaminação 2. Etanol - Produção 3. Fermentação alcoólica 4. Leveduras
5. Saccharomyces I. Título

CDD 589.23
R375c

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

**Aos meus pais, Vanda e Valdemir,
agradeço pela dedicação, pelo companheirismo, pela caminhada, pela luta, pela
vida.**

**Agradeço pela vida, pelos ensinamentos, pelos sermões, e principalmente pelos
exemplos,
eles são valiosíssimos!**

**Agradeço pelos agrados e principalmente pelos desagradados.
Assim, eu pude ver que na vida nem tudo é como a gente quer.**

Aprendi a ter limites, a ser mais “gente”.

**Aprendi com vocês a ter coragem, a não desanimar, a saborear a vitória.
Agradeço por tudo o que vocês planejaram e fizeram, por tudo que planejaram e
não fizeram e o que fizeram sem planejar.**

**Aos meus irmãos Junior, Vinícius e Vanessa,
que sempre me incentivaram desde o início da minha caminhada em busca dos
meus ideais.**

Ao meu namorado Rafael, pelo companheirismo, amor, paciência e apoio.

À minha querida amiga Ana Paula, pela amizade incondicional.

A todos vocês dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para alcançar meus objetivos e sonhos e me amparar e me confortar nos momentos difíceis.

À prof^a. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pela oportunidade, confiança, orientação e, principalmente, pelo grande aprendizado que me proporcionou nesses seis anos de convívio no laboratório. Admiro muito seu caráter e a forma que realiza seu trabalho, com muito afinho e muito amor.

À minha família, por sempre me apoiar, me aconselhar e estar ao meu lado independentemente da minha decisão.

À prof^a. Dra. Silvana Perissatto Meneghin, pela amizade, carinho e alegria.

À prof^a. Dra. Marcia Maria Rosa Magri, pela amizade e ajuda durante o trabalho.

À minha grande amiga Ana Paula, por estar presente em todos os momentos da minha vida, nas alegrias, nas tristezas, na saúde, na doença e principalmente nas fermentações.

À minha querida pupila Jéssica, pela amizade, carinho e por estar sempre disposta a me ajudar. Agradeço do fundo do meu coração tanta dedicação e lhe desejo muito sucesso.

Às técnicas do LAMAM (UFSCar), Lúcia T. Picollo Silva e Afra Vital Matos Dias Gabriel, pela colaboração, convivência, sugestão e amizade.

Às “Lamanzetes” Ana Silvia, Carolina Brito, Carolina, Cristina, Daiane, Gisele, Juliana, Raizza e Tatiany por fazerem do Lamam um ótimo local para trabalhar.

À minha amiga de mestrado, Marite Del Ostro, pelos ótimos momentos que passamos e pelas caronas.

Às minhas velhas amigas Juliana, Michelli, Aline e Priscila por compartilharem minhas vitórias e derrotas.

Às minhas novas amigas Dulce, Cristina, Vanessa, Milene, Silene, Bruna, Crisla, Ariane e Zeli (Fermentec) por me ouvirem todos os dias falando da minha dissertação.

Ao querido estagiário Renato, pela amizade, conversas e ajuda na elaboração do trabalho.

Ao Centro de Ciências Agrárias–CCA/UFSCar, pela oportunidade de execução da parte experimental deste trabalho.

À querida professora de Inglês Daniela Corbanezi, pela grande dedicação e por me fazer estudar inglês.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós-graduação do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”.

Aos professores do Departamento DETAIZER/CCA/UFSCar, em especial o Prof. Vico, Prof. Clóvis e Prof. Jorge, pela amizade, incentivo a carreira acadêmica e oportunidades.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia, Laboratório PANGENE da UNESP, *campus* Botucatu, em especial Dra. Débora Colombi, Prof. Dr. Paulo Ribola e Ana Teresa Burlamarqui Faraco Antonangelo, pela ajuda na realização dos testes moleculares.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP pelo auxílio pesquisa (2009/14617-4).

**“Tudo tem a sua ocasião própria, e há tempo para todo propósito
debaixo do céu.**

**Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de
arrancar o que se plantou;**

**tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derribar, e tempo de
edificar;**

**tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de
dançar;**

**tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de
abraçar, e tempo de abster-se de abraçar;**

**tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de
deitar fora;**

**tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de
falar;**

tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz”.

(Ec 3: 1-8)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica.....	17
2.1.1 Sistemas de produção de etanol no Brasil	17
2.1.2 Linhagens selecionadas para a fermentação	19
2.1.3 Microrganismos contaminantes da produção de etanol	22
2.1.4 Influência das condições ambientais no processo fermentativo.....	26
2.2 Material e Métodos.....	29
2.2.1 Identificação molecular das leveduras	29
2.2.1.1 Extração e quantificação do DNA.....	29
2.2.1.2 PCR.....	30
2.2.1.3 Purificação e seqüenciamento	31
2.2.2 Linhagens de leveduras selecionadas.....	31
2.2.3 Armazenamento das linhagens de leveduras.....	32
2.2.4 Caracterização morfo-fisiológica das linhagens de leveduras.....	35
2.2.4.1 Crescimento Invasivo	35
2.2.4.2 Capacidade fermentativa.....	35
2.2.4.3 Floculação	36
2.2.4.4 Fenótipo <i>killer</i>	37
2.2.5 Caracterização das linhagens de leveduras quanto ao estresse	37
2.2.5.1 Resistência à temperatura.....	37
2.2.5.2 Resistência ao pH	37
2.2.5.3 Resistência ao etanol	38
2.2.5.4 Resistência à altas concentrações de glicose	38
2.2.5.5 Resistência ao actidione.....	38
2.2.6 Caracterização genética.....	39
2.2.7 Efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras	40
2.2.8 Teste fermentativo com reciclo celular e tratamento do fermento	40
2.2.8.1 Plaqueamento	41

2.2.8.2 Açúcares redutores totais (ART).....	41
2.2.8.3 Teor alcoólico.....	42
2.2.8.4 Cálculo de eficiência fermentativa	42
2.2.9 Análise estatística	43
2.2.10 Meios e soluções utilizados	44
2.3 Resultados e Discussão	49
2.3.1 Identificação molecular das leveduras	49
2.3.2 Caracterização morfo-fisiológica das linhagens de leveduras	49
2.3.2.1 Crescimento invasivo	49
2.3.2.2 Capacidade fermentativa	52
2.3.2.3 Floculação	53
2.3.2.4 Fenótipo <i>killer</i>	55
2.3.3 Caracterização das linhagens de leveduras quanto ao estresse	55
2.3.3.1 Resistência à temperatura	56
2.3.3.2 Resistência ao pH.....	56
2.3.3.3 Resistência ao etanol.....	57
2.3.3.4 Resistência à concentrações de glicose	59
2.3.3.5 Resistência ao actidione	60
2.3.4 Caracterização genética	61
2.3.5 Efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras.....	64
2.3.6 Teste fermentativo com reciclo celular e tratamento do fermento	66
3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

Caracterização de leveduras selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol

Dentre as leveduras selvagens mais comumente encontradas na fermentação alcoólica, destaca-se o gênero *Saccharomyces* apresentando colônias rugosas com células dispostas em cachos (pseudohifas). Este biótipo de levedura tem sempre sido associado com problemas na indústria, ocasionando queda no rendimento fermentativo. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização genética, morfo-fisiológica e da resistência ao estresse de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam colônias rugosas e mucosas, buscando alternativas que possam contribuir para o manejo dessas leveduras selvagens (rugosas) na fermentação alcoólica. Foram realizados testes de caracterização para crescimento invasivo, atividade *killer*, temperatura, pH, concentração de etanol e açúcar, presença de actidione, floculação e capacidade fermentativa, utilizando-se 22 linhagens de leveduras (11 rugosas e 11 mucosas) selecionadas previamente por seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal. O efeito do tratamento ácido em diferentes valores de pH sobre o crescimento de duas linhagens (52 – rugosa e PE-02 – mucosa) foi também avaliado, seguido do monitoramento do crescimento em meio de caldo de cana após tratamento ácido. Em seguida, testes fermentativos em meio de caldo de cana foram conduzidos em culturas puras e mista dessas linhagens. Os testes de caracterização morfo-fisiológica mostraram que a invasividade em meio YEPD Agar ocorreu em baixa frequência dentre as 22 leveduras testadas; dez dentre onze leveduras rugosas apresentaram taxa de floculação expressiva, e entre as mucosas a floculação foi praticamente inexistente; nenhuma das linhagens apresentou produção de toxina *killer*; as linhagens com colônias rugosas apresentaram capacidade fermentativa significativamente inferior às linhagens com colônias mucosas, em sistema de batelada com ciclo único de 48 horas em meio de caldo de cana, demonstrando velocidade mais lenta de fermentação. Quanto à resistência ao estresse por temperatura, pH, etanol e concentração de açúcar, as linhagens mucosas tiveram maior resistência à acidez do meio, enquanto as linhagens rugosas foram mais resistentes às concentrações elevadas de etanol e açúcar. Nenhuma levedura foi resistente ao actidione. A análise genética, através dos *loci* microssatélites, revelou a presença de dois grupos principais relacionados geneticamente, sendo o primeiro ramo constituído principalmente de colônias rugosas (67%), contendo, no entanto, a linhagem PE-02, apresentando linhagens com alta taxa de floculação e tolerância às altas concentrações de açúcar e etanol; o outro grupo (com três subgrupos) compreendeu principalmente colônias mucosas, apresentando pouca resistência às situações estressantes aqui estudadas. A levedura com colônia rugosa (linhagem 52) foi bastante afetada pelo tratamento ácido em valores de pH 1,0 e 1,5, ao contrário da levedura com colônia mucosa (PE-02). A fermentação em sistema de batelada com reciclo celular e tratamento ácido conduzido em pH 1,5 teve efeito sobre o crescimento da levedura rugosa quando em cultura mista com a levedura mucosa, não resultando em prejuízo à eficiência fermentativa, quando comparada com a cultura pura da PE-02. Em cultura pura da levedura rugosa, constatou-se eficiência fermentativa por volta de 60%, confirmando o baixo desempenho destas leveduras. O conhecimento das respostas das leveduras rugosas

às situações estressantes pode ajudar a manejar a fermentação alcoólica para minimizar o efeito da levedura contaminante.

Palavras-chave: Eficiência fermentativa; Contaminantes; Estresse

ABSTRACT

Characterization of wild yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermentative processes for ethanol production

Among the wild yeasts more commonly found in the alcoholic fermentation, wrinkled colonies with pseudohyphal morphology belonging to *Saccharomyces* genus are highlighted. This yeast biotype has been associated with industrial problems, resulting in the decrease of the fermentative yield. In this context, this work aimed to perform the genetic, morphological/physiological characterization and stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strains which exhibited wrinkled and mucous colonies, searching for alternatives that could contribute to the management of these wild yeasts (wrinkled colonies) in the alcoholic fermentation. Characterization tests for invasiveness in Agar medium, killer activity, temperature, pH, ethanol and sugar concentration, actidione, flocculation and fermentative capacity were carried out with 22 strains (11 wrinkled and 11 mucous colonies), which were screened previously by the sequencing of the ITS region of the ribosomal DNA. The effect of the acid treatment using different pH values over the growth of two strains (52 – wrinkled and PE-02 – mucous) was also evaluated, following the growth monitoring in sugar cane juice after acid treatment. Fermentative tests in sugar cane juice were carried out with pure and mixed cultures of these strains. The morphological/physiological tests showed that the invasiveness in YEPD Agar medium occurred in low frequency among the 22 strains tested; ten out of eleven wrinkled yeasts exhibited expressive flocculation, and among the mucous, the flocculation was near zero; none of the strains showed killer activity; the wrinkled colonies presented lower fermentative capacity comparing to mucous colonies, in a 48-hour cycle in batch system using sugar cane juice, with slower fermentation rate. Concerning the resistance to temperature, pH, ethanol and sugar concentration, the mucous colonies were more resistant to low pH, while the wrinkled colonies were more resistant to the elevated ethanol and sugar concentrations. None of the yeasts were resistant to actidione. The genetic analysis by microsatellite loci revealed the presence of two main genetic related groups, the first branch comprised mainly of wrinkled colonies (67%), containing however the PE-02 strain, showing strains with high flocculation rate and tolerance to high concentration of sugar and ethanol; the other group (with three subgroups) comprised mainly mucous colonies, showing lower resistance to the stressing conditions here studied. The yeast with wrinkled colony (strain 52) was severely affected by the acid treatment in pH values of 1.0 and 1.5, but the same did not occur with the mucous colony (PE-02). The batch fermentation with cell recycle and acid treatment in pH 1.5 had effect over the wrinkled yeast growth when in mixed culture with the mucous yeast, and did not impair the fermentative efficiency comparing to the pure culture of PE-02. In pure culture with the wrinkled colony, a fermentative efficiency as low as 60% was observed, confirming the low performance of these yeasts. The knowledge of the response to stressful conditions exhibited by the yeasts with wrinkled colonies can help to manage the alcoholic fermentation in order to minimize the effect of the contaminant yeast.

Keywords: Fermentative efficiency; Contaminant; Stress

1 INTRODUÇÃO

As leveduras constituem indubitavelmente o grupo mais importante de microrganismos comercialmente explorados, especialmente em função de sua capacidade fermentativa. Muito se conhece sobre a bioquímica da fermentação alcoólica, porém os mecanismos de controle do processo para que se possa obter o máximo de eficiência ainda carecem de estudos, uma vez que na indústria, a levedura convive com populações de bactérias e leveduras selvagens que competem pelo substrato e produzem metabólitos que afetam o desempenho do fermento. Uma das principais preocupações na indústria sucroalcooleira é combater os microrganismos contaminantes do processo de produção de álcool, os quais são causadores de problemas como consumo de açúcar, queda de viabilidade de células de levedura devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento que acarreta perda de células de levedura pelo fundo de dorna ou na centrífuga, e queda no rendimento industrial (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

Como os substratos adicionados às dornas de fermentação (melaço e/ou caldo de cana) não são esterilizados, a fermentação etanólica é considerada um processo complexo com sucessões intensas de linhagens de leveduras. Isto favorece o desenvolvimento de linhagens de leveduras selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces*, que podem causar a diminuição da produtividade e outros problemas operacionais (AMORIM; BASSO; LOPES, 2004; SILVA FILHO et al., 2005; ANDRIETTA et al., 2007). Muitas vezes estas leveduras selvagens apresentam fenótipos como floculação, formação de espuma, pseudohifas, biofilme e crescimento invasivo, as quais são características indesejáveis para a indústria (FIGUEIREDO, 2008).

Observações feitas por Ceccato-Antonini e Parazzi (2000) no monitoramento microbiológico da fermentação etanólica em unidades industriais e safras diversas, indicaram a presença de um biótipo de levedura com células dispostas em cadeias, apresentando colônias opacas, superfície crespada, pertencendo à espécie *S. cerevisiae*. Esse biótipo apresentou caracteristicamente alto crescimento, permanecendo na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma grossa, pegajosa, causando extravasamento de mosto das dornas e conseqüentemente perda de açúcar e álcool.

Ceccato-Antonini e Parazzi (1996) verificaram uma proporção de 1:1 entre leveduras rugosas e não-rugosas no fermento e no vinho, ocasionando uma queda de 10% no rendimento fermentativo e 18% na produção de álcool, numa destilaria de Jaú (SP). Para a retomada do rendimento a valores como 89,5%, o fermento teve que ser substituído.

Essas leveduras com colônias rugosas são muito freqüentes na fermentação etanólica, mas pouco se conhece sobre seu poder competitivo em comparação com linhagens típicas, que apresentam colônias mucosas, lisas, brilhantes e células isoladas, com brotamento normal.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo realizar a caracterização genética, morfo-fisiológica e da resistência aos fatores estressantes de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam células em cachos (pseudohifas) e colônias rugosas, e verificar sua competitividade em processos fermentativos em comparação com leveduras que apresentam colônias mucosas, com células dispersas, no intuito de buscar alternativas para manejar a fermentação alcoólica quando ocorrer perda no rendimento fermentativo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Sistemas de produção de etanol no Brasil

O etanol pode ser obtido por três vias: destilatória, sintética e fermentativa, sendo que no Brasil, a via fermentativa é a maneira mais importante para produção de álcool, cujo princípio é a transformação de açúcares em etanol e dióxido de carbono (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

De acordo com LIMA, AQUARONE e BORZANI (1986), qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato, constitui-se em matéria prima para obtenção de etanol. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso considerar seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação. Para o nosso país, enquanto não houver concorrência do álcool de síntese, as únicas matérias-primas de importância econômica imediata são os melaços e o caldo de cana-de-açúcar.

Dois tipos de destilarias de álcool podem ser encontrados, as anexas e as autônomas, sendo as primeiras partes integrantes de uma usina de açúcar, podendo utilizar o caldo ou méis, e as segundas são independentes, com matéria-prima própria.

O processo tecnológico de fabricação de etanol é formado por uma seqüência de operações industriais que resumidamente seriam: extração da sacarose dos colmos de cana; preparo do mosto; fermentação; e destilação (Figura 1).

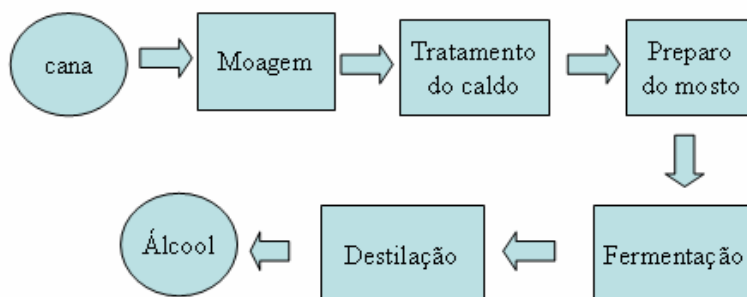
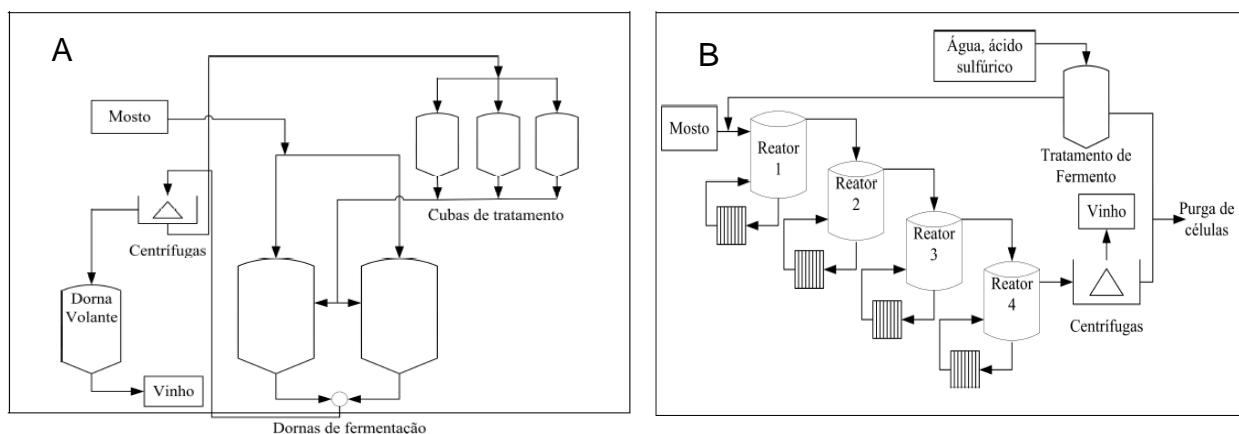


Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de álcool direto da cana (LOPES, 2009)

A fermentação alcoólica é o fenômeno por meio do qual os açúcares são transformados em álcool e gás carbônico, principalmente por ação das leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, há várias maneiras de se conduzir a fermentação. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Atualmente, a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala ocorre em processos fermentativos em batelada e contínuos, representados na Figura 2. Segundo Amorim (2005), 85% das unidades produtoras de etanol do país funcionam em sistema de batelada, e somente 15% em sistema contínuo. A explicação desses números está nas vantagens que o sistema em batelada apresenta como maior rendimento na fermentação, melhor mensuração do rendimento da fermentação, causa menos choques no fermento, obtenção de maior teor alcoólico na fermentação, sistema mais flexível (caso ocorra acidentes), possibilita melhor assepsia das dornas e maior controle das vazões.



- Figura 2 - (A) Esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação. (B) Esquema do processo de fermentação contínua para produção de álcool (FERREIRA, 2008)

No sistema em batelada Melle-Boinot, responsável por grandes avanços tecnológicos, inicia-se a fermentação com a inoculação do pé-de-cuba nas dornas, sendo o mosto alimentado com uma vazão definida, de modo a minimizar os efeitos de inibição pela alta concentração de açúcar no substrato (FERREIRA, 2008). A fermentação do mosto ocorre durante a alimentação da dorna, e continua após o

término do enchimento da mesma, terminando quando o teor de açúcares fermentescíveis (ou ART) se torna desprezível (CARIOCA; ARORA, 1984). O tempo de alimentação é em torno de 4 a 5 horas e o tempo de “morte” da dorna varia de 4 a 7 horas.

Terminada a fermentação, o mosto fermentado, denominado de vinho ou vinho bruto, é encaminhado para uma dorna volante e segue para as centrífugas para separação do fermento. O vinho delevedurado (centrifugado) é enviado às colunas de destilação, enquanto o creme ou leite de leveduras vai para a cuba de tratamento. O processo de tratamento ácido do leite de levedura varia bastante conforme a unidade produtora, mas de modo geral sofre inicialmente uma diluição com água (até a proporção de 1 parte de leite de levedura para 1 parte de água) e a seguir recebe a adição de ácido sulfúrico até atingir um pH na faixa de 2,0 a 3,0. A seguir, o fermento tratado vai para a cuba de descanso, onde permanece por 2,0 a 3,0 horas (FERREIRA, 2008).

2.1.2 Linhagens selecionadas para a fermentação

Apesar dos esforços visando a utilização de outros microrganismos para a obtenção de etanol nas destilarias brasileiras, a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* continua sendo a mais adequada, pois por se tratar de processos não estéreis, necessita-se de um microrganismo “robusto”, capaz de suportar condições drásticas.

As leveduras *S. cerevisiae* apresentam alta eficiência fermentativa, um crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (ANDRIETTA et al., 2007).

Além disto, conseguem sobreviver e se adequar a ambientes inóspitos e estressantes através da sua capacidade de formar filamentos, de apresentar crescimento invasivo sob a forma de pseudohifas, de flocular, de formar espuma e de desenvolver biofilmes. Este microrganismo não só pode explorar novos ambientes à

procura de nutrientes, como também consegue se fixar e persistir naqueles adequados ao seu desenvolvimento (CECCATO-ANTONINI, 2008).

As células de *S. cerevisiae*, quando submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados pelo estresse (RUIS; SCHÜLLER, 1995; SWAN; WATSON, 1998; ESTRUCH, 2000). Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da ATPase (BIRCH; WALKER, 1999).

Em culturas de *S. cerevisiae* ocorre o acúmulo de trealose em resposta a uma mudança na temperatura de 30°C para 44°C, quando a concentração de trealose atinge valores intracelulares máximos (CARVALHEIRO; ROSEIRO; GIRIO, 1999). A resposta ao choque térmico é caracterizada pela síntese de proteínas específicas denominadas de proteínas de choques térmico ou Hsp (*heat shock proteins*), que funcionam como chaperonas nos processos de desnaturação e recuperação de proteínas danificadas (JAKOBSEN; PELHAM, 1991). Além de choques térmicos, são induzidas por outras formas de estresse como altas concentrações salinas e etanol, estresse oxidativo, baixos valores de pH, escassez de nutrientes e presença de metais pesados no meio (KIANG; TSOKOS, 1998; ESTRUCH, 2000).

Diferenças substanciais entre linhagens de *S. cerevisiae* justificam a seleção de linhagens mais apropriadas para o ambiente da fermentação alcoólica industrial. Atualmente existe o fornecimento por unidades produtoras de biomassa, de grandes volumes de leveduras previamente isoladas de unidades brasileiras durante o período da safra, sendo que essas leveduras recebem o nome de leveduras selecionadas.

Na Tabela 1 são apresentadas, como exemplos, características de alguns tipos de leveduras *S. cerevisiae* selecionadas, como SA-1 (Copersucar), BG-1 (Copersucar), CAT-1 (Fermentec/ESALQ) e PE-2 (Fermentec/ESALQ). Estas são leveduras selecionadas pela técnica de cariotipagem a partir de processos industriais de produção de etanol, das usinas Santa Adélia, Barra Grande, Usina VO (Grupo Virgolino de Oliveira) Catanduva e Usina da Pedra, respectivamente (AMORIM, 2005; BASSO et al, 2008).

Na Tabela 2 é apresentada uma comparação entre algumas leveduras selecionadas com a levedura de panificação, evidenciando a influência dos teores de glicerol e trealose na viabilidade celular.

Tabela 1 - Algumas características de leveduras selecionadas (FERREIRA, 2008)

Parâmetro	Referência	SA-1	BG-1	CAT-1	PE-2
Y_{X/S}	0,04	0,044	0,0463	0,0409	0,0479
Y_{P/S}	0,46	0,4665	0,4642	0,4694	0,4637
Prod	2,50	2,6579	2,1971	2,5674	2,5113
VCS	5,80	6,0803	5,0518	5,8369	5,7802
Conv	90	93,96	79,07	90,48	89,82
Prod esp	0,48	0,4420	0,4183	0,4799	0,4042
VCS esp	1,05	0,9535	0,9069	1,0288	0,8772

Legenda: Y_{X/S} = rendimento de células; Y_{P/S} = rendimento de produto; Prod = produtividade; VCS = velocidade de consumo de substrato; Conv = conversão de substrato; Prod esp = produtividade específica; VCS esp = velocidade de consumo de substrato específica.

Tabela 2 - Comparação de algumas leveduras selecionadas com levedura de panificação (PAN) (FERREIRA, 2008)

Parâmetros	PE-2	VR-1	CAT-1	PAN
Rendimento (%)	91,0	90,5	91,2	88,1
Glicerol (%)	3,38	3,20	3,54	4,70
Trealose (%)	9,5	10,6	10,3	6,0
Viabilidade Final (%)	94,0	95,0	97,0	61,0

Uma comparação entre os rendimentos Y_{P/S} na Tabela 2 mostra pouca diferença entre as quatro leveduras selecionadas, estando estes rendimentos em termos percentuais em torno de 90 – 91%. Mas quando comparadas com a levedura de panificação para a produção de etanol, tal rendimento cai para a faixa dos 88%. Outro aspecto interessante é com relação à viabilidade celular, que se situa na faixa de 94 a 97% para as selecionadas, contra 61% para as leveduras de panificação, sendo também estas últimas maiores produtoras de glicerol (FERREIRA, 2008)

Embora a utilização de uma levedura qualquer selecionada seja uma alternativa viável para o início da safra, o uso de leveduras provenientes do próprio processo é a

expectativa para o futuro das usinas brasileiras. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de produção de álcool está relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo (STROPPIA; ANDRIETTA; ANDRIETTA, 2003).

2.1.3 Microrganismos contaminantes da produção de etanol

A contaminação por microrganismos é um fato comprovado na maioria das usinas produtoras de álcool do país, nas quais o problema pode ser agravado em razão do processo utilizado, que fornece as condições ideais de desenvolvimento da população desses microrganismos (ALTHERTUM et al, 1984).

De acordo com Alquati (1990), a planta da cana-de-açúcar, como todo organismo vivo, possui uma microbiota característica distribuída tanto no sistema vascular como em sua camada periférica. A presença maciça de microrganismos tem origem no campo, estes adentrando nos colmos através da ocorrência de infestação de pragas ou por danos provocados nos colmos pelas operações de corte/carregamento/transporte, facilitando assim a infecção. As canas saudáveis podem conter de 10^1 a 10^8 bactérias/g e 10^1 a 10^3 bolores e leveduras/g (GALLO, 1989).

Esta microbiota é levada juntamente com o caldo bruto no momento de sua obtenção através da moagem das plantas. O número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como pela falta de assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material. Bovi e Marques (1983) também destacam que alguns microrganismos podem adentrar a indústria pela água utilizada em alguns processos, como na lavagem da cana, no preparo do pé-de-cuba e na limpeza dos equipamentos.

Os microrganismos mais comumente encontrados no caule da cana são bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*, além de bolores e leveduras como *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (GALLO, 1989).

Os efeitos causados pelas bactérias na fermentação alcoólica são consumo de açúcares, excreção de compostos tóxicos às leveduras, acúmulo de ácidos no decorrer

dos ciclos fermentativos, aumento do tempo de fermentação, sobra de açúcares no final da fermentação e diminuição do rendimento fermentativo (ALCOOBRAS, 2005).

As bactérias podem também induzir a floculação das leveduras do processo. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em etanol e CO₂ pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio. Além disso, nas unidades que realizam o reaproveitamento de células, as operações de recuperação de fermento ficam prejudicadas pela presença dessas estruturas, comprometendo seriamente o desempenho industrial (LUDWIG; OLIVA NETO; ANGELIS, 2001).

As pesquisas aplicadas à fermentação alcoólica tem se concentrado, preferencialmente, em problemas relativos às contaminações bacterianas, permanecendo as infecções por leveduras selvagens (leveduras que não foram inoculadas na fermentação), pouco estudadas e conhecidas.

Se para o controle da contaminação bacteriana é possível a utilização de agentes antimicrobianos, o mesmo não pode ser dito, em relação às leveduras selvagens ou “invasoras”. Algumas unidades industriais têm se deparado com problemas atribuídos à presença de leveduras contaminantes que, altamente competitivas dentro das condições existentes, passam a predominar na população de células presentes (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 1998). Quando isso ocorre, o processo industrial se torna mais lento e a destilaria acaba por produzir menor quantidade de etanol por dia, em comparação com os dias em que não há esse tipo de contaminação. Dessa forma, uma fermentação mais lenta impõe uma diminuição da moagem da cana, que, por sua vez, diminui o descarregamento desta no pátio da indústria, causando problemas no cronograma de colheita. Tudo isso provoca custos diretos e perda de receita diária para a indústria (AGROSOFT BRASIL, 2008).

Vários autores têm se empenhado na identificação de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica. Neder (1957) identificou leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia* e *Candida* a partir de caldo de cana e de mosto em fermentação, sendo identificadas espécies como *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. chevalieri*, *Candida krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *Pichia membranaefaciens*, entre outras.

A análise de amostras de caldo bruto, caldo misto e água de embebição em usina de açúcar de cana, realizada por Lima et al. (1974), permitiu a identificação das

espécies *Candida diddensiae*, *C. fabianii*, *C. intermedia*, *C. santamariae*, *Cryptococcus kuetzingii*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera corticis*, *Rhodotorula pallida*, *R. rubra*, *S. uvarum*, *Torulopsis norvegica* e *Trichosporon cutaneum*.

Oliveira e Pagnocca (1988) detectaram as leveduras *Hansenula anomala*, *Saccharomyces kluyveri* e *S. cerevisiae* como contaminantes em uma unidade industrial a partir de amostras de fermento centrifugado, fermento tratado e mosto em fermentação.

Castro (1995) isolou e identificou, a partir de amostras de vinhos e fermento centrifugado, principalmente os gêneros *Candida* (42,8%) e *Saccharomyces* (38,1%).

Observações feitas por Ceccato-Antonini e Parazzi (2000) no monitoramento microbiológico da fermentação etanólica, em unidades industriais e safras diversas, indicaram a presença de um biótipo de levedura com células dispostas em cadeias, apresentando colônias opacas, superfície crespada, pertencendo à espécie *S. cerevisiae*. Esse biótipo apresentou caracteristicamente alto crescimento, permanecendo na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma grossa, pegajosa, causando extravasamento de mosto das dornas e conseqüentemente perda de açúcar e álcool. Há trabalhos que mostram que leveduras com estas características tem baixo potencial fermentativo (BASSO; AMORIM; OLIVEIRA, 1996), porém há suposição que possam ser mais resistentes à agentes antimicrobianos, como dióxido de cloro, por exemplo (MENECHIN, 2008).

Ceccato-Antonini e Parazzi (1996) verificaram uma proporção de 1:1 entre leveduras rugosas e não-rugosas no fermento e no vinho, ocasionando uma queda de 10% no rendimento fermentativo e 18% na produção de álcool, numa destilaria de Jaú (SP). Para a retomada do rendimento a valores como 89,5%, o fermento teve que ser substituído.

Trabalho realizado durante 3 safras consecutivas sobre as características de 300 leveduras selvagens isoladas de 46 destilarias mostrou que 57% das colônias apresentavam borda lisa e 43% borda rugosa. Todas as leveduras apresentando colônias com borda rugosa mostraram problemas na fermentação como espuma em excesso, floculação e/ou sobra de açúcar no vinho. Entre as leveduras de colônias de borda lisa, 65% apresentaram pelo menos um dos problemas citados (FERMENTEC

NEWS, 2005).

Figueiredo (2008) analisou fenotipicamente 17 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas diretamente das dornas de fermentação industrial quanto à produção de espuma, floculação, presença de pseudohifas, biofilme e crescimento invasivo, verificando a possível correlação com a hidrofobicidade celular e polimorfismos em genes envolvidos com estes fenômenos. As melhores correlações observadas foram entre a hidrofobicidade celular, floculação e formação de biofilme, sendo este último parâmetro inversamente correlacionado com o crescimento invasivo no ágar em 70% das linhagens analisadas.

As leveduras rugosas ou também chamadas de leveduras floculantes possuem a habilidade de se agregarem espontaneamente e formar flocos. Stewart e Russel (1975) descreveram a floculação como sendo uma agregação de células inicialmente livres, que após se unirem, sedimentam no meio ou flutam. Esse fenômeno ocorre devido a fatores intrínsecos, como o controle genético (genes que expressam proteínas conhecidas como floculinas que permitem que essas leveduras cresçam de forma floculada) e a fatores extrínsecos, como as condições do meio em que se encontram e sua interação com a estrutura da parede celular.

Segundo Calleja (1974), a floculação pode ser dividida em passiva e ativa. A floculação passiva ocorre quando há formação de cadeias ou cachos de leveduras devido a não separação das células após a divisão (as leveduras estudadas neste trabalho encaixam-se nesta definição), enquanto que a formação de agregados estáveis como consequência da colisão é chamada de floculação ativa.

Quando as células de uma única linhagem se agregam chama-se de autofloculação, enquanto que agregações entre diferentes linhagens ou entre diferentes espécies provocam a co-floculação, podendo ser entre leveduras de cepas diferentes ou até mesmo entre leveduras e bactérias (ESSER, HINRICHS; KUES, 1987).

O processo de floculação das leveduras pode ser observado em indústrias de bebidas como um fenômeno benéfico, que pode facilitar a separação do fermento da suspensão de bebida fermentada (JIN; SPEERS, 1998), enquanto que na indústria do álcool este processo é considerado desfavorável, pois ocasiona problemas durante a

etapa de fermentação e de separação do fermento nas centrifugas (YOKOYA; OLIVANETO, 1991).

Desta forma, a instalação de leveduras selvagens na fermentação pode acarretar sérios problemas operacionais. A eliminação de linhagens invasoras, quando detectado prejuízo considerável ao processo, consiste na substituição do fermento contaminado por fermento adaptado, melhoria na assepsia das tubulações, controle da qualidade da água utilizada na diluição do mosto, maior eficiência do tratamento térmico/químico do caldo e controle da temperatura de fermentação (CECCATO-ANTONINI, 1998).

A detecção das leveduras contaminantes no processo e a diferenciação destas em relação à levedura do processo não são tarefas fáceis. Vários métodos têm sido propostos, incluindo técnicas moleculares como a cariotipagem, por exemplo. Porém a utilização de uma ou várias técnicas concomitantemente depende das condições de trabalho nas destilarias e de pessoal treinado não só para executar como também para interpretar os resultados (CECCATO-ANTONINI, 2010).

2.1.4 Influência das condições ambientais no processo fermentativo

A habilidade de um microrganismo de crescer e sintetizar um produto em um dado ambiente é determinada pelas características genéticas do organismo. Sendo assim, o desenvolvimento bem sucedido de um processo fermentativo depende primeiramente da obtenção de uma boa cepa por seleção e mutação, e segundo em elucidar o efeito dos parâmetros ambientais no crescimento e formação do produto, tais como pH, temperatura, concentração de açúcares, oxigênio e álcool.

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009).

Os valores de pH dos mostos industriais geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5, com uma boa capacidade tampão, porém as leveduras mantem uma homeostase de forma quase independente dos valores do pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Segundo Maia (1989), o pH interno da célula se mantém na faixa de 5,8 a 6,9, seja qual for o pH extracelular na faixa de 2 a 7. Entretanto, baixos valores de pH tornam o meio mais agressivo, uma vez que exigem das leveduras um maior dispêndio de energia na manutenção do pH interno, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática que ficam expostas ao meio externo. O pH do meio externo também afeta a velocidade de crescimento das leveduras, a qual atinge um máximo quando o pH está compreendido entre 5 e 6 (STECKELBERG, 2001).

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de microrganismos, influenciando o crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular em leveduras (BATISTA, 2001). As temperaturas ótimas para a produção industrial de álcool situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C, dependendo das condições climáticas da região. À medida que a temperatura aumenta, eleva-se a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível à toxidez do álcool, levando à formação de metabólitos secundários como o glicerol. Além disso, as temperaturas elevadas permitem maior perda de álcool por evaporação em dornas abertas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001)

Quanto à concentração de açúcares, o estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva à redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

Quanto à utilização de oxigênio, as leveduras *S. cerevisiae* têm características facultativas, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência (fermentação) como na presença de oxigênio (respiração). Porém, quando há altas concentrações de açúcares ocorre a inibição da atividade de enzimas respiratórias, levando à produção de álcool na presença de oxigênio, processo denominado Efeito Crabtree (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1986).

A fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno este denominado Efeito Pasteur. Este efeito está intimamente

associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento (fase estacionária) nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose (STECKELBERG, 2001).

O efeito inibitório do álcool produzido por *S. cerevisiae* durante a fermentação é complexo e resulta no principal fator que desencadeia fermentação incompleta e conseqüentemente diminuição no rendimento do processo. O álcool retarda o crescimento da levedura, reduz viabilidade e habilidade fermentativa (FERREIRA, 2002). Os fatores que influenciam a sensibilidade ao álcool (temperatura, aeração, composição do meio) agem direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática (STECKELBERG, 2001).

Algumas análises evidenciaram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de álcool inferiores a 26 g/L, mas é inibido totalmente quando a concentração de álcool atinge 68,5 g/L no meio da fermentação (SOUZA, 2009).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Identificação molecular das leveduras

Foram selecionadas 52 linhagens de leveduras isoladas de diferentes unidades produtoras de etanol, dessas, 27 linhagens apresentavam colônias mucosas e células dispersas e o restante apresentava crescimento pseudohifal (células em cachos) e colônias rugosas. As leveduras foram identificadas por seqüenciamento da região ITS incluindo o gene 5,8S do DNA ribossomal (Figura 3), para seleção daquelas da espécie *S. cerevisiae*.

Esses testes moleculares foram realizados na seguinte ordem: extração do DNA, quantificação do DNA, PCR (*Polymerase chain reaction*), purificação e seqüenciamento, conforme os itens descritos a seguir e foram realizados na UNESP - Campus de Botucatu (Departamento de Parasitologia, Laboratório PANGENE- Pesquisas e Análises Genéticas).

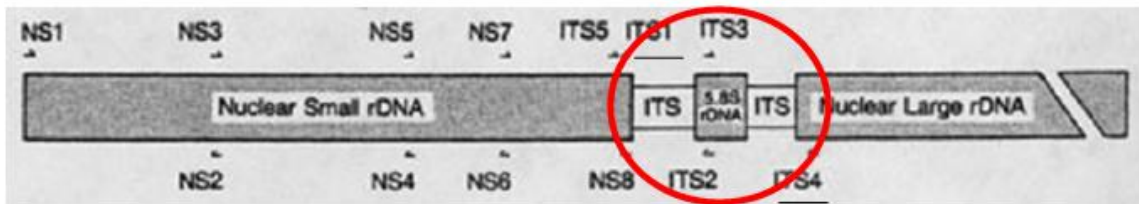


Figura 3 - Localização dos *primers* (grifado em preto) para amplificação da região ITS do rDNA (círculo vermelho). Fonte: WHITE et al. (1990)

2.2.1.1 Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA, utilizou-se um eppendorf com 10 μ L de tampão TE e adicionou-se a linhagem de levedura com um palito estéril. Em seguida, o eppendorf foi colocado em um freezer (por 1 hora a -80°C ou *overnight*). Após esse processo, colocou-se as amostras em um monobloco a 99°C por 20 minutos.

Depois do choque térmico, centrifugou-se as amostras, o sobrenadante foi recuperado e quantificado. A quantificação foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro (ND-100 Nanodrop), fazendo a leitura em 260 nm e utilizando-se 2 μ L da amostra.

2.2.1.2 PCR

Para a realização do PCR foi necessário diluir as amostras de DNA para aproximadamente 50 ng/ μ L. Antes de iniciar o PCR realizou-se um gradiente de temperatura para determinação da temperatura de anelamento. A reação de amplificação foi realizada em um volume de 10 μ L, contendo 5 μ L de Go taq Green Mix, 0,5 μ L de *primer* ITS-1 (10 mM), 0,5 μ L de *primer* ITS-4 (10 mM), 2 μ L de DNA e 2 μ L de água Milli-Q estéril. As seqüências e a localização dos *primers* na região alvo estão descritas na Tabela 3 e Figura 3, respectivamente. Utilizou-se termociclador modelo Biometra TGradient Thermal Cycler (USA), cujo programa de amplificação está descrito na Tabela 4.

Tabela 3 - *Primers* (Invitrogen) utilizados nas reações PCR para amplificação da região ITS incluindo o gene 5,8S do DNA ribossomal

Nome	Seqüência (5' → 3')	Orientação
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Forward
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse

Tabela 4 - Programa utilizado no termociclador para amplificação da região ITS do DNA ribossomal, incluindo o gradiente de temperatura para determinação da temperatura de anelamento

Fase	Temperatura	Tempo	Etapa
1	95°C	5 minutos	Desnaturação inicial
2**	95°C	1 minuto	Desnaturação
3**	*Gradiente de T°: 51°C a 61°C	45 segundos	Anelamento
4**	72°C	1 minuto	Extensão
5	72°C	1 minuto	Finalizar a atividade da taq
6	4°C	Indefinido	Manter as amostras

*Gradiente: 51°; 51,2°; 51,9°; 53°; 54,2°; 55,4°; 56,6°; 57,8°; 59°; 60,1°; 60,8° e 61°C.
As fases assinaladas com ** foram repetidas por 35 ciclos

Os produtos PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dissolvida em tampão TAE 1X e gel RED (1 μ L/10 mL de gel). O gel foi submetido a uma voltagem de 80V e corrente de 120 mA, por 90 minutos (fonte EPS301 –

Amersham Biotech). A visualização do DNA foi feita em transiluminador de UV e as imagens registradas em câmera digital.

A partir do gradiente de temperatura realizou-se então o PCR das amostras, utilizando-se a reação de amplificação com volume de 10 μ L (Tabela 5) no PCR teste e com volume de 25 μ L (Tabela 6) nas amostras que apresentaram bandas no PCR anterior.

Tabela 5 - Componentes da reação PCR teste

Reagentes	Quantidade para 1 reação (μ L)
Go taq Green Master Mix	5
<i>Primer ITS-1</i>	0,5
<i>Primer ITS-4</i>	0,5
Água Milli-Q	1
DNA (120-150 ng)	3
Total	10

Tabela 6 - Componentes da reação PCR posterior

Reagentes	Quantidade para 1 reação (μ L)
Go taq Colorless	12,5
<i>Primer ITS-1</i>	0,75
<i>Primer ITS-4</i>	0,75
Água Milli-Q	8
DNA (120-150 ng)	3
Total	25

2.2.1.3 Purificação e seqüenciamento

Os produtos PCR foram purificados e enviados à MacroGen-Coréia (<http://dna.macrogen.com/eng/>) para seqüenciamento da região ITS. As seqüências (*forward* e *reverse*) foram analisadas através do programa BlastN para identificação das mesmas junto ao banco de dados do Genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

2.2.2 Linhagens de leveduras selecionadas

Foram selecionadas 22 linhagens de *S. cerevisiae*, sendo 11 apresentando colônias rugosas e 11 colônias mucosas (Tabela 7, Quadro 1).

Tabela 7 - Linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas para os testes nas tabelas

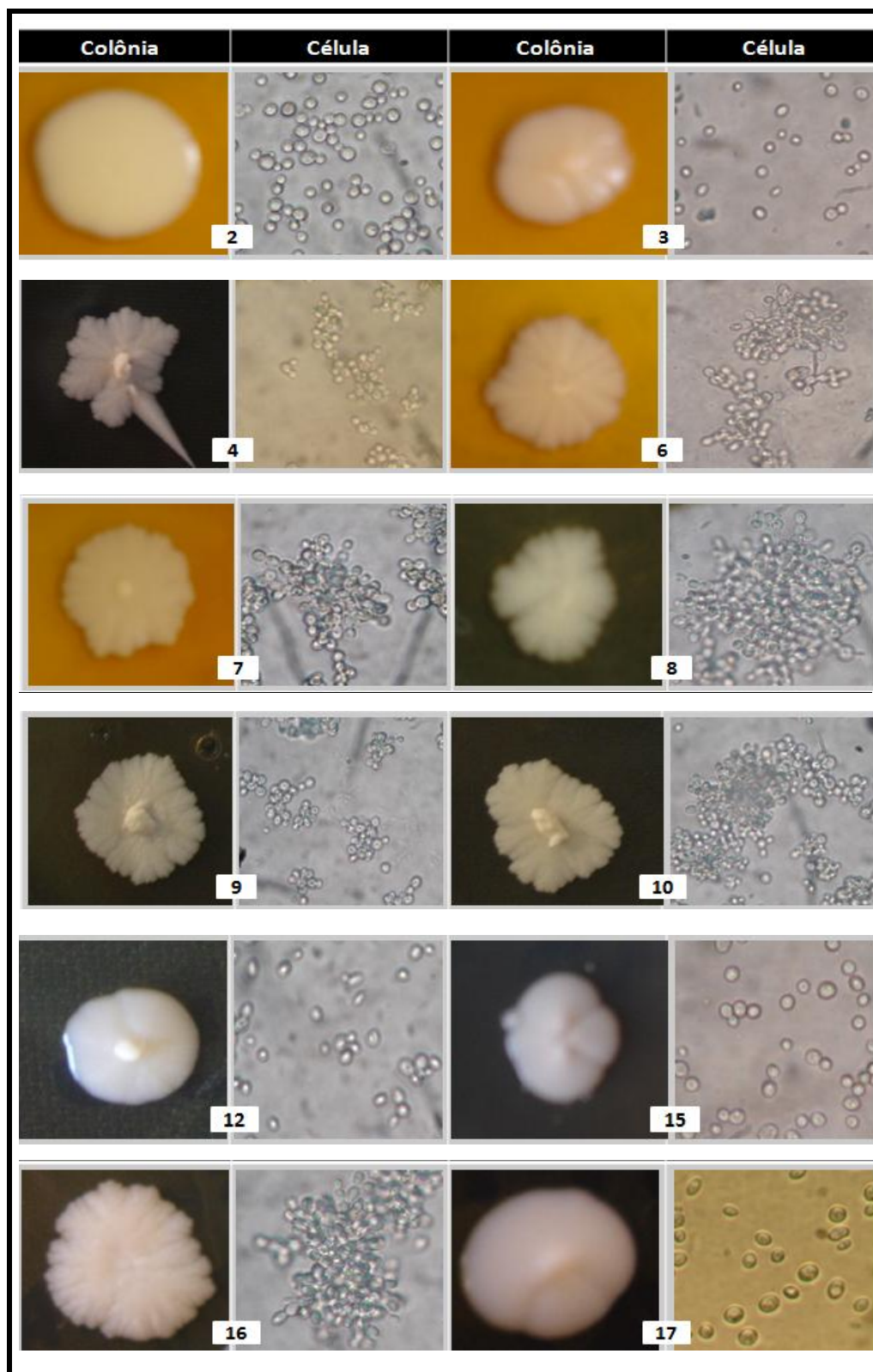
Código	Local de isolamento	Código de isolamento	Morfologia da colônia
2	Usina Santa Adélia	VF4	Mucosa
3	Usina Santa Adélia	VF5	Mucosa
4	Usina Santa Adélia	VF6	Rugosa
6	Usina Santa Adélia	VF8	Rugosa
7	Usina Santa Adélia	VF9	Rugosa
8	Usina Santa Adélia	VF10	Rugosa
9	Usina Santa Lúcia	45	Rugosa
10	Usina Santa Lúcia	47	Rugosa
12	Usina Santa Lúcia	51	Mucosa
15	Usina Santa Lúcia	2	Mucosa
16	Usina Diamante	385	Rugosa
17	Usina da Pedra	PE-02	Mucosa
18	Usina Santa Lúcia	FM	Mucosa
19	**	URC	Rugosa
33	Usina Santa Adélia	A1	Mucosa
35	Usina Santa Adélia	M1	Rugosa
36	Usina Santa Adélia	M2	Mucosa
37	Usina VO Catanduva	CAT1	Mucosa
38	Usina Barra Grande	BG1	Mucosa
39	Usina Santa Adélia	SA1	Mucosa
47	Usina Santa Adélia	VF1	Mucosa
52	Usina Santa Adélia	SA9-1 RUGOSA	Rugosa

**Cedida pela UNESP-Rio Claro (Profa. Dejanira F. Angelis)

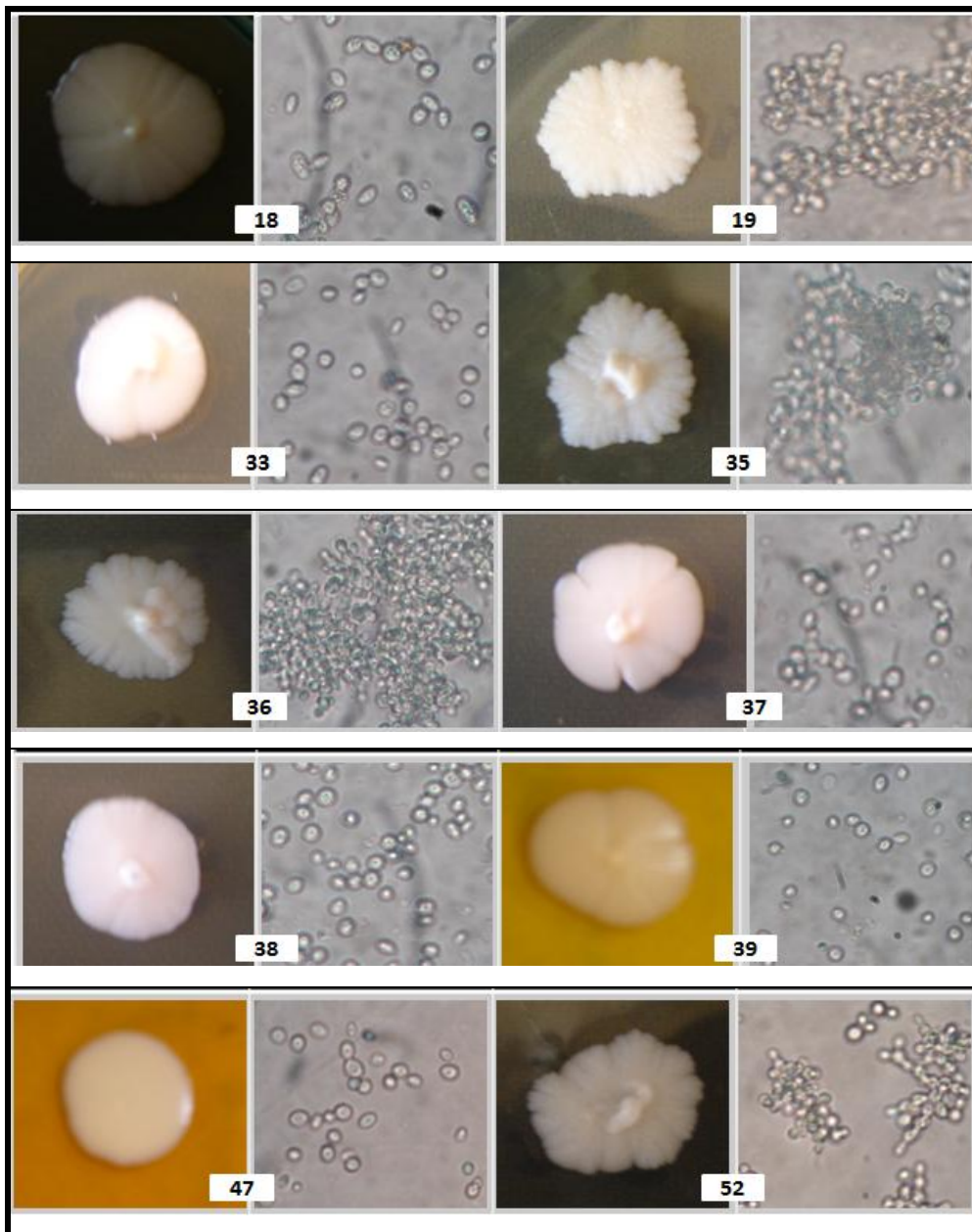
2.2.3 Armazenamento das linhagens de leveduras

As leveduras foram armazenadas de três formas: em *slants*, nitrogênio líquido e em água.

Para o preparo dos *slants*, em tubos de falcon de 15 mL estéreis verteu-se YEPD e estes foram deixados inclinados até endurecimento do meio. Em seguida, a levedura foi inoculada e incubada a 30°C por 48h, sendo os tubos armazenados em geladeira.



Quadro 1- Morfologia da colônia (desenvolvida em placas contendo YEPD) e das células das linhagens de leveduras selecionadas (imagem ao microscópio em aumento de 400X) (continua)



Quadro 1- Morfologia da colônia (desenvolvida em placas contendo YEPD) e das células das linhagens de leveduras selecionadas (imagem ao microscópio em aumento de 400X) (continuação)

Para armazenamento em nitrogênio líquido, em um falcon de 15 mL estéril colocou-se 3 mL de YEPD líquido e um palito estéril, que foi previamente colocado em contato com a levedura. O tubo falcon foi colocado na incubadora a 28°C e 240 rpm, por cerca de 18 horas. Após esse processo, transferiu-se o material para um eppendorf e centrifugou-se, sendo o sobrenadante descartado.

Preparou-se uma solução de YEPD líquido + 15% de glicerol (v/v) e em cada eppendorf acrescentou-se 1.000 µL. Em seguida, o eppendorf foi colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a – 80°C.

Para o armazenamento em água destilada, após crescimento em YEPD, a colônia de cada amostra de levedura foi transferida para um eppendorf contendo água destilada esterilizada. Em seguida armazenou-se em temperatura ambiente (MARIANO, 2006).

Antes da realização de qualquer teste, as leveduras foram reativadas em placas com YEPD sólido e incubadas a 30°C por 48 h.

2.2.4 Caracterização morfo-fisiológica das linhagens de leveduras

2.2.4.1 Crescimento Invasivo

As linhagens de leveduras foram ensaiadas quanto à invasividade em meio sólido. As células foram semeadas em placas de Petri contendo YEPD e mantidas a 30°C por 3 dias, e a temperatura ambiente por mais 2 dias. As placas foram fotografadas e em seguida, a superfície do ágar foi lavada com água para retirada das colônias. As placas foram fotografadas novamente, para verificação da presença das “marcas” da colônia no ágar (sinal de invasividade no meio de cultura). Foram feitos cortes transversais no meio de cultura, paralelamente às “marcas” para visualização das estruturas filamentosas ao microscópio.

2.2.4.2 Capacidade fermentativa

A avaliação da capacidade fermentativa das linhagens com colônias rugosas e mucosas selecionadas foi realizada em meio de fermentação, em estufa a 30°C, em condições de semi-aerobiose (frascos tamponados com algodão), por 48 horas, retirando-se amostras de 15 mL a cada 12 horas. Foram analisados Brix por refratômetro de campo; pH em pH-metro digital (Corning); e teor alcoólico (g/100 mL), após destilação das amostras e leitura do teor alcoólico em densímetro digital Anton-Paar (DMA-45).

O inóculo de multiplicação foi preparado em duas fases de cultivos sucessivos. Na primeira fase, a de pré-inóculo, a levedura foi transferida para uma placa de Petri com meio de reativação YEPD e posteriormente incubada a 30°C por 48 horas.

Na segunda fase, para obtenção do inóculo, foram transferidas duas alçadas de células da placa de Petri para erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de multiplicação. Esses frascos foram mantidos em incubadora a 30° C, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas. Para cada linhagem foram utilizados 10 tubos falcons, a fim de se obter a quantidade de massa úmida necessária para a fermentação.

Em seguida, o material foi centrifugado por cinco minutos a 3400 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5 mL de meio de multiplicação. Este volume foi inoculado em erlenmeyers de 125 mL contendo 45 mL de meio de multiplicação, a 30°C e 160 rpm, também por 12 horas. Em seguida o volume do erlenmeyer foi transferido para tubos falcons de 50 mL autoclavados e tarados. Esses foram centrifugados a 3400 rpm por 5 minutos, novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. Após a última lavagem, os tubos foram pesados em balança analítica para estimativa do peso da massa úmida no total. Utilizou-se a proporção de 10 g de massa úmida/ litro de meio de fermentação, sendo necessários, portanto, 2 g de massa úmida/ frasco de fermentação, ou seja, 6 g de massa úmida (experimentos em triplicata). Essa quantidade de massa úmida foi ressuspensa em 120 mL de meio de fermentação em um erlenmeyer estéril e constituiu-se o inóculo da fermentação.

2.2.4.3 Floculação

O ensaio de floculação foi adaptado do trabalho de Wang et al. (2008).

Após o crescimento em meio de multiplicação, as células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm, 5 min), lavadas duas vezes com tampão citrato de sódio (50 mM; pH 3,0) contendo 5 mM EDTA, e mais duas vezes com água a 4°C. As células lavadas foram ressuspensas em água destilada a 4°C até atingir uma densidade óptica (a 600 nm) igual a 2,0. A floculação (sedimentação) das células foi determinada na ausência ou presença de solução de cloreto de cálcio a 10 mM. Após uma agitação vigorosa dos tubos, amostras foram retiradas da parte superior do tubo para determinação da densidade óptica a 600 nm no tempo 0 e após 10 minutos da suspensão ter sido colocada em repouso.

A porcentagem da floculação foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Floculação (\%)} = \frac{(A_0 - A_{10}) \times 100}{A_0}$$

onde,

A₀: absorvância medida no tempo 0

A₁₀: absorvância medida após 10 min

2.2.4.4 Fenótipo *killer*

As linhagens de leveduras selecionadas foram caracterizadas quanto à produção de atividade *killer* em meio YEPD-azul de metileno, a 30°C, conforme procedimento descrito em Meneghin (2007). As leveduras a serem testadas foram inoculadas sobre o meio de cultura inicialmente inoculado com as linhagens sensíveis CCA003 (*S. cerevisiae* NCYC1006) e CCA039 (*Torulopsis glabrata* ATCC15126). A atividade *killer* foi evidenciada pela presença de um halo de inibição e zona azul ao redor da colônia testada.

2.2.5 Caracterização das linhagens de leveduras quanto ao estresse

2.2.5.1 Resistência à temperatura

Foi retirada uma alçada de uma placa contendo YEPD e a levedura e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Esta suspensão foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer para determinação do número de células. Ajustou-se a suspensão para 1x10⁸ células/mL e desta foram retirados 10 µL, os quais foram cuidadosamente depositados na superfície do meio YEPD. As placas foram incubadas em estufa nas seguintes temperaturas: 30, 33, 36, 39 e 42°C por 4 dias.

2.2.5.2 Resistência ao pH

Foi retirada uma alçada de uma placa contendo YEPD e a levedura e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Esta suspensão foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer para determinação do número de células. Ajustou-se a suspensão para 1x10⁸ células/mL e desta foram retirados 10 µL que foram cuidadosamente depositados na superfície do meio YEPD ajustado para os

seguintes valores de pH: 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,75; 1,5; 1,25; 1,0, com solução de ácido clorídrico 6N ou solução de hidróxido de sódio 1N. Os meios acidificados foram autoclavados separando-se a solução nutritiva da solução aquosa de Agar, logo que saíram da autoclave os dois frascos foram juntados em um único e então os meios foram vertidos em placas de Petri. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 30°C por 7 dias.

2.2.5.3 Resistência ao etanol

Foi retirada uma alçada de uma placa contendo YEPD e a levedura e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Esta suspensão foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer para determinação do número de células. Ajustou-se a suspensão para 1×10^8 células/mL e desta foram retirados 10 μ L que foram cuidadosamente depositados na superfície do meio YEPD, adicionando-se etanol absoluto nas concentrações finais de 0; 3; 6; 9; 12; 12,5; 13; 13,5; 14; 14,5; 15; 18 e 21% (v/v). O etanol foi adicionado ao meio liquefeito e a temperatura de 50-55°C, vedando as placas com filme plástico. As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias.

2.2.5.4 Resistência à altas concentrações de glicose

Foi retirada uma alçada de uma placa contendo YEPD e a levedura e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Esta suspensão foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer para determinação do número de células. Ajustou-se a suspensão para 1×10^8 células/mL e desta foram retirados 10 μ L que foram cuidadosamente depositados na superfície do meio YEPD contendo glicose nas concentrações finais de 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500 g/L. As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias.

2.2.5.5 Resistência ao actidione

Foi retirada uma alçada de uma placa contendo YEPD e a levedura e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Esta suspensão foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer para determinação do número de células. Ajustou-se a suspensão para 1×10^8 células/mL e desta foram retirados 10 μ L

que foram cuidadosamente depositados na superfície do meio YEPD contendo actidione nas concentrações finais de 1; 2,5; 5;10 e 15 ppm . As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias.

2.2.6 Caracterização genética

Para a caracterização genética das linhagens de leveduras foi utilizada a técnica dos microssatélites, a qual foi realizada em parceria com a Dra. Débora Colombi (Programa de Pós Graduação em Genética – UNESP – Botucatu & Genotyping Biotecnologia).

A extração do DNA das leveduras foi realizada com resina comercial Chelex® Grade Molecular Biology Resin (Bio-Rad Laboratories). A resina Chelex foi preparada a 5% conforme instruções do fabricante (0,5 g para 10 mL de TE), distribuída em micro tubos e armazenada em geladeira (4° C). Uma colônia de levedura isolada em meio sólido foi coletada com um palito estéril, ou 200 µL de *pellet* de cultura líquida centrifugada e lavada com salina, foram transferidos para um micro tubo estéril contendo 300 µL da resina Chelex. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um vórtex por 15 s, centrifugadas a alta velocidade por 15 s e incubadas por 20 minutos à 95° C em termobloco *Thermomixer Compact* (Eppendorf, Alemanha). Após este período as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 15 s e centrifugadas à alta velocidade por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril e armazenado a -20° C.

Para a amplificação dos *loci* microssatélites foi utilizado um painel de 10 *primers* (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10) cedidos pela empresa Genotyping Biotecnologia Ltda (Botucatu-SP). As reações de PCR contendo 20 µL foram constituídas de 2 µL de DNA, 10 µL de Go Taq Green Master Mix 2X (Promega, USA), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*) específico para os loci microssatélite e água ultra pura estéril suficiente para completar 20 uL.

Os produtos de PCR para amplificação dos *loci* microssatélites foram analisados em aparelho de eletroforese capilar *QIAxcel* (Qiagen, Alemanha) onde foi utilizado o método AL320 com um tempo de injeção de 20 segundos. O marcador 15bp-5000bp foi usado como marcador padrão de alinhamento interno e o tamanho das bandas do produto de PCR foi determinado através do marcador FX 174 *Hae* III 72bp a 3 kb. O capilar utilizado foi o *QIAxcel DNA Screening Kit* e os dados foram visualizados

usando-se o software BioCalculator (versão 3). A árvore fenética foi construída usando o software População 1.2.31 pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

2.2.7 Efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras

Para este teste foram escolhidas duas linhagens, 17 (PE-02, colônia mucosa) e 52 (colônia rugosa). Após crescimento em placa com YEPD, colocou-se 2 alçadas da levedura em erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de multiplicação, no período de 12 a 14 horas (*overnight*) sob agitação de 160 rpm, a 30°C. Retirou-se uma amostra para o plaqueamento e em seguida foi feito tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 1,0; 1,5; e 2,0), com agitação de 160 rpm, a 30°C, por 2 horas. Após o tratamento, as células foram centrifugadas, descartando-se o sobrenadante e a massa de leveduras lavada duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, adicionou-se 50 mL do meio de multiplicação, porém antes da sua incubação, retirou-se uma amostra para o plaqueamento. Os frascos inoculados foram incubados por 36 horas. Foram assim retiradas amostras antes do tratamento ácido e 0, 18 e 36 horas após o tratamento ácido. As foram convenientemente diluídas em tubos com solução salina, sendo espalhados 100 µL de cada diluição em meio YEPD. As placas foram incubadas a 30°C por 48-72 horas. A seguir foram contadas as colônias, discriminando-se entre colônias mucosas e rugosas quando foi avaliada a cultura mista. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

2.2.8 Teste fermentativo com reciclo celular e tratamento do fermento

Foram utilizadas duas linhagens de leveduras, 17 (PE-02, mucosa) e 52 (rugosa) em culturas puras e mista, sendo 50% (v/v) de cada linhagem na cultura mista. As fermentações foram conduzidas da forma descrita no item 3.5.2, porém a cada 12 horas o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 3400 rpm por 5 minutos, sendo a massa celular tratada com solução de ácido sulfúrico, pH 1,5, por 2 horas, em agitador a 30°C. Após o tratamento ácido, as células foram lavadas duas vezes em água destilada e ressuspendidas em 40 mL de meio de fermentação, sendo a seguir adicionadas a 160 mL do mesmo meio. Foram realizados seis ciclos fermentativos de

12 horas cada, realizando-se o tratamento ácido do fermento a cada reciclo. No sobrenadante após cada ciclo de fermentativo, foi determinado o Brix por refratômetro de campo; pH em pH-metro digital (Corning); teor alcoólico (g/100 mL) após destilação das amostras e leitura do teor alcoólico em densímetro digital Anton-Paar DMA-45; plaqueamento em meio de cultura; e determinação dos açúcares redutores totais.

2.2.8.1 Plaqueamento

As amostras de 1 mL coletadas no início dos testes fermentativos e ao final de cada ciclo antes da centrifugação, foram convenientemente diluídas em tubos com solução salina, sendo espalhados 100 μ L de cada diluição em meio YEPD. As placas foram incubadas a 30°C por 48-72 horas. A seguir foram contadas as colônias, discriminando-se entre colônias mucosas e rugosas quando foi avaliada a cultura mista. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

2.2.8.2 Açúcares redutores totais (ART)

Pipetou-se 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizou-se. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionou-se 2,8 mL de NaOH 12N e completou-se o volume do balão até o menisco com água destilada. Retirou-se 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, e neste adicionou-se 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Homogeneizou-se por exatos 5 segundos em vortex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (Thermo[®] Biomate 3). O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado para calibrar o aparelho.

A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi obtida através de uma curva padrão de glicose, pesando-se 1,2 g de glicose previamente seca em dessecador de sílica gel por 7 dias e depois colocada em estufa a 70°C durante 2 horas e novamente

levada ao dessecador para ser resfriada. A glicose foi transferida cuidadosamente para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com água destilada. Alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mL desta solução foram transferidas com pipeta graduada de 10 mL, para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume também com água destilada. Cada mL dessas soluções, considerando-se a diluição, possuíam, respectivamente, 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84; 0,96; 1,08; 1,20 mg de glicose. Para a leitura da absorvância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorvância, efetuou-se a regressão linear e a correlação (R^2). O cálculo da quantidade de açúcares redutores totais foi realizado da seguinte forma:

$$\text{ART (mg/mL)} = \frac{A_{540\text{ nm}} + 0,0466 \times \text{diluição amostra}}{0,6464}$$

2.2.8.3 Teor alcoólico

Para a análise do teor alcoólico, procedeu-se a destilação de 10 mL das amostras centrifugadas em microdestilador TE-012 (Tecnal) e posteriormente determinou-se o teor alcoólico através da densidade alcoólica obtida em densímetro digital DMA-45 (Anton - Paar), conforme Amorim (1997). Os dados de densidade foram transformados em g de álcool/100mL, de acordo com as tabelas de conversão.

2.2.8.4 Cálculo de eficiência fermentativa

Para calcular a eficiência fermentativa utilizou-se a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (51,11 g de etanol/100 g de glicose) a seguir:

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \frac{\text{Etanol} / (\text{ART}_{\text{inicial}} - \text{ART}_{\text{final}})}{0,511} \times 100$$

Foram utilizados os dados de etanol, ART inicial e ART final em g/100 mL, para cada ciclo de cada fermentação.

2.2.9 Análise estatística

Os resultados dos testes fermentativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para os testes fermentativos descritos no item 2.2.4.2. (Capacidade fermentativa), foram analisados os efeitos principais “Tipo de colônia” e “Tempo” e suas interações para o parâmetro “Teor alcoólico”, conforme esquema descrito na Tabela 8.

Para os testes fermentativos descritos no item 2.2.7 (Efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras), foram analisados os efeitos principais “pH do tratamento ácido”, “Tempo” e “Tipo de colônia” e suas interações para o parâmetro “Número de UFC/mL” (resultados transformados em \log_{10}), conforme esquema descrito na Tabela 9.

Para os testes fermentativos descritos no item 2.2.8 (Teste fermentativo com reciclo celular e tratamento do fermento), foram analisados os efeitos principais “Tipo de cultura” e “Ciclo fermentativo” e suas interações para os parâmetros “Teor alcoólico”, “pH”, Eficiência fermentativa”, e “Teor de açúcar redutor residual” conforme esquema descrito na Tabela 10.

Tabela 8 - Esquema utilizado na análise de variância para os resultados obtidos quanto à capacidade fermentativa das linhagens de leveduras

Fonte de variação	Graus de Liberdade
Tipo de colônia	1
Tempo	3
Tipo de colônia X Tempo	3
Erro	256
Total	263

Tabela 9 - Esquema utilizado na análise de variância para os resultados obtidos quanto ao efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras

Fonte de variação	Graus de Liberdade
Valores de pH	2
Tipo de colônia	1
Tempo	3
Tipo de colônia X pH	2
Tipo de colônia X tempo	3
pH X tempo	6
Erro	54
Total	71

Tabela 10 - Esquema utilizado na análise de variância para os resultados obtidos quanto ao teste fermentativo com reciclo celular e tratamento do fermento

Fonte de variação	Graus de Liberdade
Tipo de cultura	2
Ciclos fermentativos	5
Tipo de cultura X ciclos	10
Erro	36
Total	53

2.2.10 Meios e soluções utilizados

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados por autoclavagem a 120°C, 1 atm, por 15 minutos, ou filtrados em membranas de 0,22 µm de porosidade, quando necessário.

- **Meio YEPD**

Composto de 1% de extrato de levedura (p/v), 2% de peptona (p/v), 2% de glicose (p/v). Para meio sólido, acrescentou-se 2% ágar (p/v).

- **Meio YEPD-Azul de Metileno**

Adicionou-se a solução de ácido cítrico 2% (p/v) à solução de K₂HPO₄ 7% (p/v),

em quantidade tal para obtenção do valor de pH desejado, monitorando por pH-metro. A seguir, adicionou-se e dissolveu-se os ingredientes do meio (peptona 2%; glicose 2%; extrato de levedura 1%) e o volume foi medido. Para obter o volume final desejado, o correspondente a 2% de ágar foi esterilizado em quantidades de água adequada, separadamente. Após autoclavagem, ainda quente, a solução de ágar foi misturada à solução tamponada, homogeneizada, o pH novamente medido para confirmar o valor 4,5 – 4,7 e foi adicionada solução de azul de metileno (1,5 g de azul de metileno em 100mL de água destilada estéril, assepticamente), na proporção de 2 mL por litro de meio, com a temperatura por volta de 50°C.

- **Meio de cultura com caldo de cana**

Foi utilizado caldo de cana clarificado da Usina São João, localizada no município de Araras, safra 2010/2011. O caldo foi submetido a diluição prévia, com água destilada a fim de se obter as concentrações desejadas de 4 e 16° Brix e acrescido de soluções de sais.

- **Meio de multiplicação**

Caldo de cana clarificado 4 °Brix acrescido de 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado para 5,5 – 6,0.

- **Meio de fermentação**

Caldo de cana clarificado 16 °Brix, acrescido de 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado a 4,5.

- **Solução de Sais**

Dissolveu-se 50 g de sulfato de amônio, 20 g de fosfato monobásico de potássio, 10 g de sulfato de magnésio, 1 g de sulfato de zinco e 1 g de sulfato de manganês em 500 mL de água destilada, completando-se o volume para 1000 mL.

- **Solução estoque de ADNS**

Pesou-se 5 gramas de ácido 3,5 dinitrosalicílico e dissolveu-se em 150 mL de água destilada a 45°C, sendo essa a solução A. Separadamente pesou-se 150g de tartarato de sódio e potássio e dissolveu-se em 100 mL de solução de NaOH 2N recém preparada a 40°C, sendo essa a solução B. Juntou-se ambas as soluções e completou-se o volume para 500 mL, sendo que ao final a mesma deve ser límpida e possuir cor alaranjada. Armazenou-se a solução em frasco escuro e envolto em papel alumínio por no máximo seis meses.

- **Solução salina**

Dissolveu-se 0,85 g de NaCl em 100 mL de água destilada.

- **Solução de ácido sulfúrico**

Para preparo dessa solução, em um 1 litro de água destilada, foi gotejado ácido sulfúrico concentrado até atingir pH desejado, no caso de 1,0; 1,5 e 2.

- **Solução básica (2N)**

Pesou-se 8 g de hidróxido de sódio e colocou-se em balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se água destilada até o menisco, agitando bem. A solução foi armazenada em frasco de plástico.

- **Solução básica (12N)**

Pesou-se 120 g de hidróxido de sódio e colocou-se em balão volumétrico de 250 mL, adicionando-se água destilada até o menisco e agitando com cuidado. Como a reação é exotérmica, há grande liberação de calor, portanto, deve-se esperar para completar o menisco, pois há redução do volume. A solução foi armazenada em frasco de plástico.

- **Tampão TE (Tris-EDTA)**

Este tampão foi preparado misturando-se 10 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5 com 2 mL de EDTA 0,5 M, completando-se o volume com água milli-Q para 1000 mL.

- **Tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) - 50x**

Foram misturados 242 g TRIS base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 ml de solução de EDTA dissódico (Na_2 EDTA) 0,5 M (pH 8,0) em água destilada até completar 1 litro de solução.

Para preparar solução a 0,5 M de Na_2 EDTA (pH 8.0) adicionou-se 186,1 g de etilenodiaminotetraacetato dissódico a 800 ml de água destilada. Agitou-se vigorosamente e o pH foi ajustado a 8,0 com hidróxido de sódio (aproximadamente 20 g de NaOH).

Observação: o sal dissódico do EDTA não irá permanecer em solução até o pH da solução ser ajustado a aproximadamente 8,0 pela adição de NaOH.

- **Tampão citrato de sódio (50 mM, pH 3,0) com EDTA (5 mM)**

Foram pesados 1,4705 g de citrato de sódio, adicionando-se à um frasco de vidro contendo 1 mL de solução de EDTA 0,5 M, sendo a seguir o volume completado para 100 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 3,0 com HCl concentrado. A solução foi filtrada para esterilização.

- **Solução de cloreto de cálcio (10 mM)**

Foram pesados 0,1471 g de cloreto de cálcio, adicionando-se 100 ml de água destilada.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação molecular das leveduras

As 52 linhagens de leveduras selecionadas para este trabalho foram isoladas das dornas das destilarias durante os processos fermentativos de produção de álcool combustível. Com a identificação molecular através do seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal, foi possível selecionar 22 linhagens pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, sendo as demais identificadas como *Candida* sp, *Pichia* sp e *Yarrowia lipolytica*.

Para a realização dos testes de caracterização e de fermentação, utilizou-se esse grupo de *S. cerevisiae*, sendo que 11 linhagens apresentavam colônias mucosas e células dispersas e 11 apresentavam colônias rugosas e células em cachos (Quadro 1).

2.3.2 Caracterização morfo-fisiológica das linhagens de leveduras

2.3.2.1 Crescimento invasivo

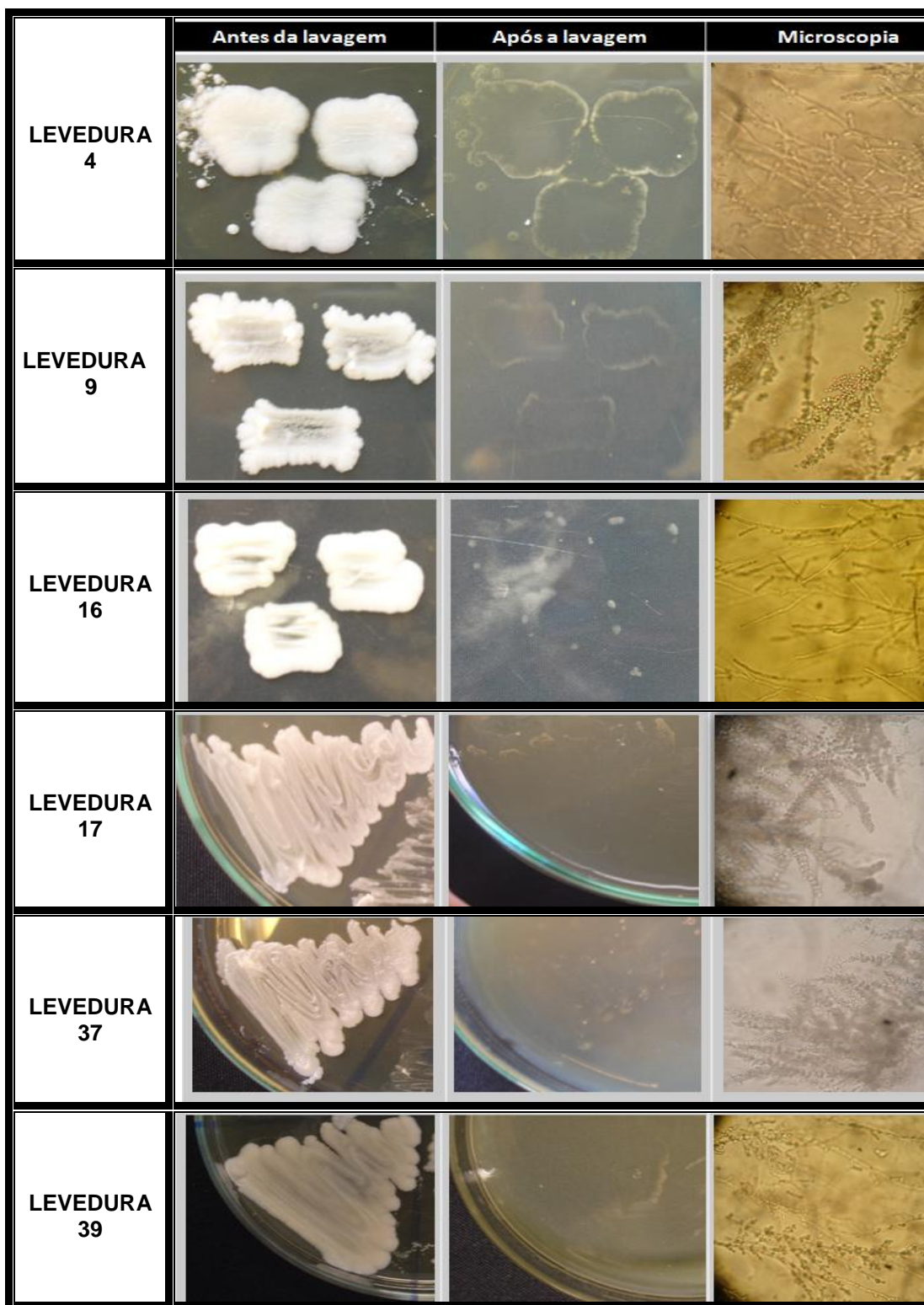
As 22 leveduras selecionadas foram testadas quanto à sua capacidade de crescer invasivamente em placas de Petri contendo YEPD sólido (Tabela 11, Quadro 2). Somente 6 linhagens apresentaram crescimento invasivo, sendo 3 mucosas e 3 rugosas. Essa característica permite que o microrganismo explore novos ambientes à procura de nutrientes e consiga fixar e persistir naqueles adequados ao seu desenvolvimento (CECCATO-ANTONINI, 2008). A mudança da forma arredondada ou oval, geralmente associada à *S. cerevisiae*, para a forma filamentosa é denominada de dimorfismo, caracterizado por formação de cadeias de células e/ou células alongadas. Os resultados obtidos mostraram que a invasividade não é uma característica inerente a determinado grupo, pois ambas (rugosas e mucosas) apresentam resultados positivos e negativos para esta característica. Segundo Kron e Gow (1995), a formação de cadeia de células alongadas ocorre devido à limitação de nutrientes no meio e pode ocorrer tanto em linhagens haplóides quanto diplóides, sendo a falta de glicose responsável por essa característica em linhagens haplóides.

Observando o Quadro 2 pode-se verificar que há linhagens que apresentam as “marcas” de invasividade mais acentuadas (como as linhagens 4 e 9, rugosas). As

linhagens diplóides são mais resistentes a lavagens vigorosas das células crescidas em superfícies como o ágar, resultando marcações mais profundas (FIGUEIREDO, 2008).

Tabela 11 - Crescimento invasivo em YEPD apresentado pelas linhagens de *S. cerevisiae*

Linhagem	Positivo	Negativo
2		x
3		x
4	x	
6		x
7		x
8		x
9	x	
10		x
12		x
15		x
16	x	
17	x	
18		x
19		x
33		x
35		x
36		x
37	x	
38		x
39	x	
47		x
52		x



Quadro 2 - Crescimento invasivo em YEPD. As linhagens foram crescidas em placas contendo YEPD por 3 dias a temperatura de 30°C e mais dois dias a temperatura ambiente (coluna à esquerda). Em seguida foram lavadas com água e fotografadas novamente (coluna do meio). Foram realizados cortes transversais na região das “marcas” no meio de cultura, os quais foram visualizados em microscópio (aumento 400X)

2.3.2.2 Capacidade fermentativa

A capacidade fermentativa foi avaliada por meio da diminuição dos valores de Brix e da produção de etanol em um único ciclo de fermentação de 48 horas (Tabela 12).

Analisando-se as 11 linhagens conjuntamente dentro de cada fenótipo de colônia, independentemente do tempo de fermentação, verificou-se que a produção de etanol é significativamente superior na fermentação com as colônias mucosas de *S. cerevisiae* (Figura 4). Pode-se observar que a produção de álcool em 12 horas e 24 horas foi maior para as linhagens mucosas quando comparadas com as rugosas, totalizando 16,6% e 33,3% a mais nos respectivos períodos. Porém no período de 36 a 48 horas, não houve diferença significativa entre os dois fenótipos de colônias (Figura 4). Isso demonstra que as leveduras rugosas possuem uma velocidade de fermentação mais lenta, especialmente no início do processo, o que não seria problema se o processo fermentativo durasse 48 horas, porém como os ciclos da fermentação alcoólica, de um modo geral, duram cerca de 8 horas, essas leveduras seriam prejudiciais, pois sobriaria açúcar no final do processo fermentativo, provocando diminuição do rendimento.

Tabela 12 - Teor alcoólico (g/100 mL) e variação de Brix ($^{\circ}$)* apresentado pelas colônias rugosas e mucosas de *S. cerevisiae* ao final de 48 horas de fermentação, em meio de caldo de cana 16 $^{\circ}$ Brix, pH 4,3 a 30 $^{\circ}$ C (n=3)

Colônias mucosas			Colônias rugosas		
Linhagem	Teor alcoólico (g/100 mL)	Variação de Brix ($^{\circ}$)	Linhagem	Teor alcoólico (g/100 mL)	Variação de Brix ($^{\circ}$)
2	5,75	10,0	4	5,02	10,0
3	5,85	9,6	6	5,25	8,0
12	5,43	9,3	7	6,61	9,7
15	6,26	10,1	8	6,49	10,5
17	6,11	9,3	9	5,83	9,0
18	4,98	9,4	10	6,37	10,2
33	7,09	10,4	16	4,86	9,3
37	5,36	9,9	19	5,54	10,6
38	5,04	10,0	35	4,81	9,6
39	5,91	10,0	36	4,85	9,5
47	3,75	10,9	52	5,68	10,0

* (Brix inicial – Brix final)

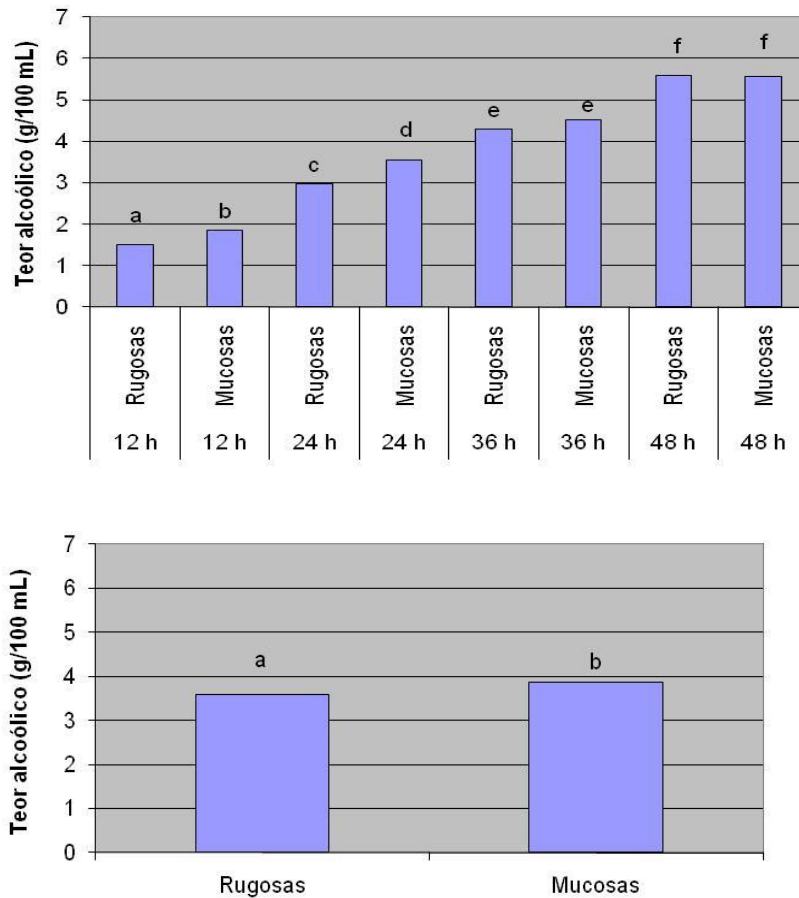


Figura 4 - Teor alcoólico (g/100 mL) apresentado pelas colônias rugosas e mucosas (total de 22 linhagens) de *S. cerevisiae*, em meio de caldo de cana 16° Brix, pH 4,3, durante 48 horas de fermentação a 30°C. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey (n=3)

2.3.2.3 Floculação

Todas as linhagens foram crescidas em meio YEPD e a análise da floculação celular foi determinada na presença ou ausência de Ca^{2+} (Figuras 5 e 6). Das 22 linhagens analisadas, 8 (linhagens 4, 8, 9, 10, 16, 19, 36 e 52) apresentaram uma taxa de floculação alta (> 50%) tanto na ausência quanto na presença de Ca^{2+} , sendo que 4 destas linhagens apresentaram taxa de floculação superior a 90% nestas condições (linhagens 8, 9, 16 e 52). Outro grupo (linhagens 7 e 35) apresentou uma taxa de floculação de 20 a 35% que incrementou significativamente (12% e 7% no caso da levedura 7 e 35, respectivamente) após a adição de Ca^{2+} , indicando neste caso, uma floculação cálcio-dependente. Finalmente, as linhagens restantes (total de 12)

apresentaram pouca ou praticamente nenhuma floculação (0-3%) tanto na presença como na ausência de Ca^{2+} (Figura 5).

Verificou-se assim que 10 dentre 11 leveduras rugosas apresentaram taxa de floculação expressiva. Somente a linhagem 6 não apresentou esta característica. Entre as mucosas, a floculação foi praticamente inexistente. Figueiredo (2008) analisou 17 linhagens selvagens isoladas de processos fermentativos e verificou que 8 apresentaram uma taxa de floculação alta, superior a 50%, independentemente do cálcio, sendo que 5 destas linhagens apresentaram taxa de floculação superior a 90% nestas condições.

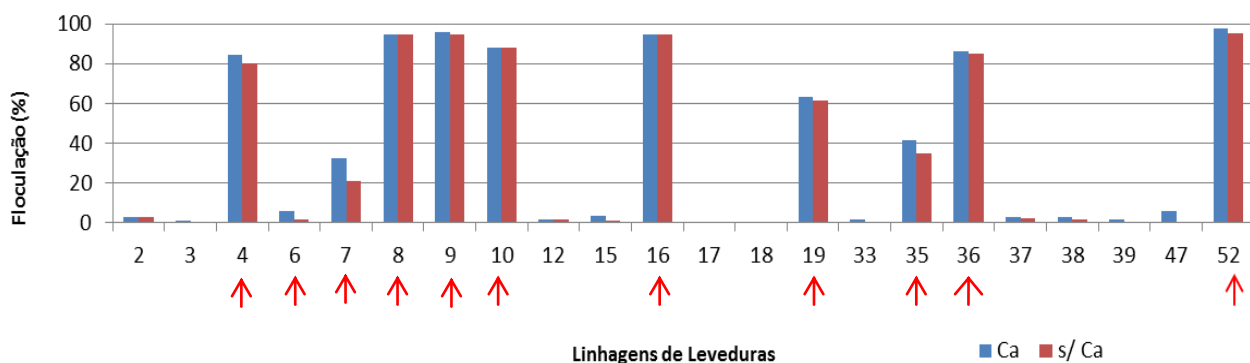


Figura 5 - Floculação (%) das linhagens de leveduras *S. cerevisiae* na presença (em azul) e ausência de cálcio (vermelho). As setas apontam as colônias rugosas

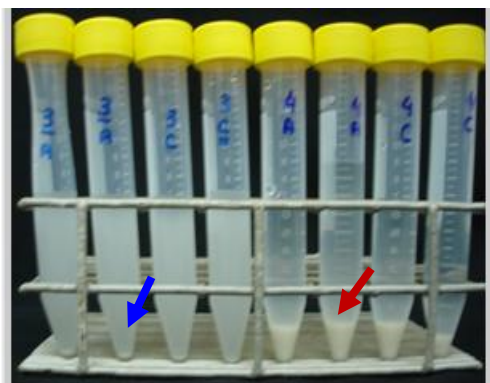


Figura 6 - Teste de floculação realizado com as linhagens na presença e ausência de cálcio. A seta em vermelho indica uma linhagem com alta floculação (linhagem 4, rugosa), enquanto a seta em azul indica uma linhagem com baixa floculação (linhagem 3, mucosa)

2.3.2.4 Fenótipo *killer*

As 22 leveduras estudadas neste trabalho foram avaliadas quanto à produção de toxinas *killer*, evidenciada pela presença de um halo de inibição do crescimento ao redor das leveduras estudadas. Porém nenhuma das linhagens (mucosas e rugosas) apresentou produção de toxina *killer*, sendo o resultado negativo tanto para a linhagem sensível CCA003 quanto para CCA039 (Figura 7). Trabalho de Ceccato-Antonini et al. (1999) mostrou que duas linhagens de *S. cerevisiae* com características de colônias rugosas e células em cachos, isoladas da fermentação etanólica, também mostraram reação neutra a linhagens *killer* padrões, em diferentes valores de pH.

Esse resultado é concordante com aqueles apresentados por Steckelberg e Andrietta (2011), que estudando 165 floculantes leveduras encontraram apenas 3% delas com atividade *killer*. Essas autoras creditaram este resultado às condições hostis encontradas nas dornas (pH, acidez, altos teores alcoólicos), o que prejudicaria a atividade da toxina. No entanto, Ceccato-Antonini et al. (2004) mostraram uma linhagem isolada de processo fermentativo com alta atividade *killer* contra outras leveduras isoladas da fermentação, além de exibir atividade *killer* ao longo dos ciclos fermentativos a despeito das condições desfavoráveis.

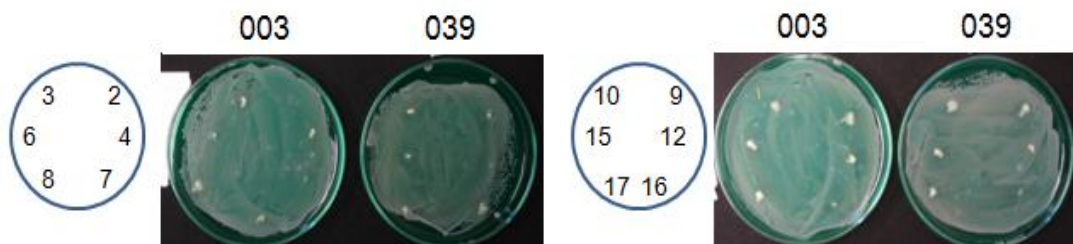


Figura 7 - Teste *killer* realizado com as linhagens de leveduras, em meio YEPD-azul de metileno, após 48 horas de incubação a 30°C, contra as linhagens sensíveis CCA003 e CCA039. À esquerda, o esquema mostra os códigos das linhagens inoculadas no meio de cultura

2.3.3 Caracterização das linhagens de leveduras quanto ao estresse

As 22 linhagens de leveduras foram submetidas à várias condições de estresse, como concentrações elevadas de etanol e açúcar, altas temperaturas, presença de actidione e baixos valores de pH, a fim de comparar o desempenho dos dois grupos estudados (rugosas e mucosas).

2.3.3.1 Resistência à temperatura

A Tabela 13 traz os resultados qualitativos quanto ao crescimento das linhagens em diferentes temperaturas de incubação (variando de 30 a 42°C). Todas as linhagens cresceram nas temperaturas de 30, 33, 36 e 39°C, mas nenhuma cresceu a 42°C.

Tabela 13 - Crescimento das leveduras em diferentes temperaturas de incubação

Linhagem	Temperatura				
	30°C	33°C	36°C	39°C	42°C
2	x	x	x	x	-
3	x	x	x	x	-
4	x	x	x	x	-
6	x	x	x	x	-
7	x	x	x	x	-
8	x	x	x	x	-
9	x	x	x	x	-
10	x	x	x	x	-
12	x	x	x	x	-
15	x	x	x	x	-
16	x	x	x	x	-
17	x	x	x	x	-
18	x	x	x	x	-
19	x	x	x	x	-
33	x	x	x	x	-
35	x	x	x	x	-
36	x	x	x	x	-
37	x	x	x	x	-
38	x	x	x	x	-
39	x	x	x	x	-
47	x	x	x	x	-
52	x	x	x	x	-

(x) = crescimento; (-) = sem crescimento

2.3.3.2 Resistência ao pH

Neste teste foi possível diferenciar o potencial de crescimento de cada linhagem em diferentes valores de pH, sendo que em pH 1,0 não ocorreu crescimento de nenhuma levedura. Já as linhagens 17 (mucosa), 33 (mucosa), 36 (rugosa) e 37 (mucosa) conseguiram se desenvolver em pH 1,25 e 1,5. Em meio com pH 1,75 e 2,0, todas as linhagens cresceram, assim como de 3,0 a 6,0 (Tabela 14).

Este resultado mostrou que as linhagens mucosas tiveram mais resistência à acidez do meio do que as linhagens rugosas, destacando-se no primeiro caso a levedura PE-02 (linhagem 17).

Tabela 14 - Crescimento das leveduras em diferentes valores de pH

Linhagem	pH									
	1,0	1,25	1,5	1,75	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	
2	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
3	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
4	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
6	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
7	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
8	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
9	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
10	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
12	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
15	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
16	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
17	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
18	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
19	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
33	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
35	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
36	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
37	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
38	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
39	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
47	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
52	-	-	-	X	X	X	X	X	X	

(x) = crescimento; (-) = sem crescimento

2.3.3.3 Resistência ao etanol

Analisando a Tabela 15 pode-se verificar que a concentração limitante de etanol foi 15%, onde nenhuma linhagem cresceu. Porém, quando se utilizou a concentração de 14,5%, 91,7 % das linhagens rugosas cresceram, mas apenas 36,4% das linhagens mucosas, o que indica que esse último grupo é bem menos resistente à elevadas

concentrações de etanol.

Tabela 15 - Crescimento das leveduras em diferentes concentrações de etanol

Linhagens	Concentrações (%)												
	0	3	6	9	12	12,5	13	13,5	14	14,5	15	18	21
2	X	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-
3	X	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-
4	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
6	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
7	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
8	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
9	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
16	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
18	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-
19	x	x	x	x	x	x	x	x		x	-	-	-
33	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
35	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
36	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
37	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
38	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-
39	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-
47	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-
52	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-

(x) = crescimento; (-) = sem crescimento

Outra observação importante foi que as colônias que se desenvolveram nos meios com elevada concentração de etanol apresentavam uma coloração opaca (o que não ocorreu quando inoculadas em YEPD sem álcool). Sendo assim, foram feitas lâminas e todas as linhagens tiveram suas células analisadas ao microscópio. Confirmou-se que as células das leveduras tiveram suas formas modificadas (Figura 8), passando de células redondas para células alongadas (início de filamentação). Esta

característica foi observada tanto em colônias rugosas quanto em colônias mucosas.

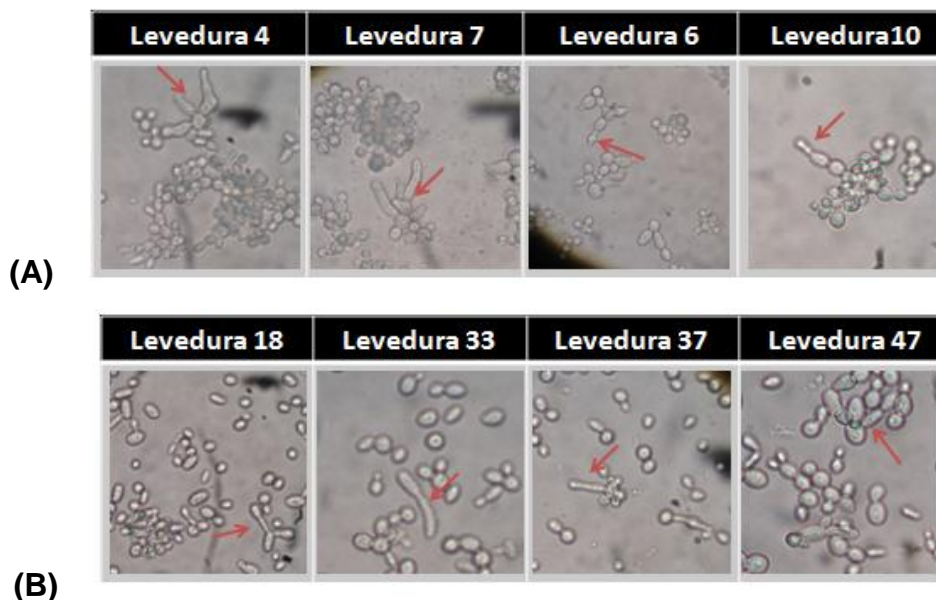


Figura 8 - Células de leveduras observadas ao microscópico (400X), após crescimento em meio YEPD com altas concentrações de etanol. (A) Células de linhagens rugosas. (B) Células de linhagens mucosas. As setas apontam as células com morfologia modificada, alongadas

2.3.3.4 Resistência à concentrações de glicose

As linhagens de leveduras foram testadas quanto à sua capacidade de crescer em meio com elevada concentração de açúcar. O resultado desse teste se encontra na Tabela 16 e pode-se observar que as linhagens 2 (mucosa), 4 (rugosa) e 18 (mucosa) foram as menos resistentes, pois não cresceram em meio com 400 g/L de açúcar. A linhagem 2 não apresentou crescimento mesmo em 300 g/L de açúcar. No entanto, verificou-se que seis linhagens (7, 8, 9, 10, 19 e 52) foram capazes de se desenvolver em meio com 500 g/L, sendo estas todas pertencente ao grupo das rugosas. Este resultado demonstrou a tolerância deste grupo de leveduras às altas concentrações de açúcar.

Tabela 16 - Crescimento das leveduras em diferentes concentrações de açúcar

Linhagem	Concentração de açúcar (g/L)						
	100	150	200	250	300	400	500
2	x	x	x	x	-	-	-
3	x	x	x	x	x	x	-
4	x	x	x	x	x	-	-
6	x	x	x	x	x	x	-
7	x	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x	x	x
9	x	x	x	x	x	x	x
10	x	x	x	x	x	x	x
12	x	x	x	x	x	x	-
15	x	x	x	x	x	x	-
16	x	x	x	x	x	x	-
17	x	x	x	x	x	x	-
18	x	x	x	x	x	-	-
19	x	x	x	x	x	x	x
33	x	x	x	x	x	x	-
35	x	x	x	x	x	x	-
36	x	x	x	x	x	x	-
37	x	x	x	x	x	x	-
38	x	x	x	x	x	x	-
39	x	x	x	x	x	x	-
47	x	x	x	x	x	x	-
52	x	x	x	x	x	x	x

(x) = crescimento; (-) = sem crescimento

2.3.3.5 Resistência ao actidione

A Tabela 17 traz os resultados qualitativos quanto ao crescimento das linhagens em diferentes concentrações de actidione (variando de 0 a 15 ppm). Nenhuma linhagem cresceu em meio com actidione, o que é uma característica da espécie *S. cerevisiae* (KREGGER-van RIJ, 1984). O teste foi realizado para confirmar se as colônias rugosas poderiam apresentar alguma diferença na resistência à este antifúngico.

Tabela 17 - Crescimento das leveduras em diferentes concentrações de actidione

Linhagens	Concentrações (ppm)					
	0	1	2,5	5	10	15
2	x	-	-	-	-	-
3	x	-	-	-	-	-
4	x	-	-	-	-	-
6	x	-	-	-	-	-
7	x	-	-	-	-	-
8	x	-	-	-	-	-
9	x	-	-	-	-	-
10	x	-	-	-	-	-
12	x	-	-	-	-	-
15	x	-	-	-	-	-
16	x	-	-	-	-	-
17	x	-	-	-	-	-
18	x	-	-	-	-	-
19	x	-	-	-	-	-
33	x	-	-	-	-	-
35	x	-	-	-	-	-
36	x	-	-	-	-	-
37	x	-	-	-	-	-
38	x	-	-	-	-	-
39	x	-	-	-	-	-
47	x	-	-	-	-	-
52	x	-	-	-	-	-

(x) = crescimento; (-) = sem crescimento

2.3.4 Caracterização genética

A análise genética, através dos loci microssatélites, revelou a presença de dois grupos principais relacionados geneticamente, sendo o primeiro ramo constituído principalmente de colônias rugosas (67%), contendo, no entanto, a linhagem PE-02 (linhagem 17), uma das mais importantes leveduras utilizadas industrialmente no Brasil na produção de etanol combustível. O outro grupo (com 3 sub-grupos) compreendeu principalmente colônias mucosas (Figura 9).

A árvore fenética foi então associada aos resultados de estresse e de floculação

para melhor visualização das diferenças entre as colônias mucosas e rugosas (Figura 10). No primeiro grupo, que compreende a maioria das rugosas e a PE-02, aparecem linhagens com alta taxa de floculação e tolerância às altas concentrações de açúcar e etanol. O segundo grupo (com 3 sub-grupos) apresentou somente 5 linhagens rugosas, mas somente duas delas com alta taxa de floculação (4 e 52) e duas com resistência às altas concentrações de açúcar (7 e 52). Entre as mucosas, predominantes neste grupo, poucas apresentaram resistência significativa às situações estressantes aqui estudadas.

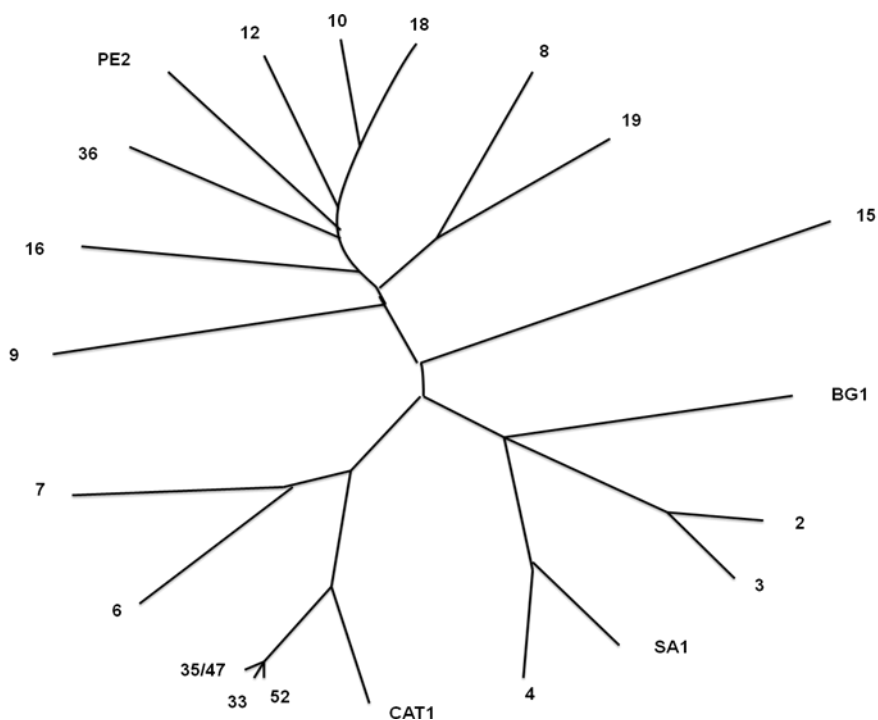


Figura 9 - Árvore fenética construída com os resultados da amplificação dos loci microssatélites, usando o software Population 1.2.31 através do método UPGMA. Nesta figura foram colocados os nomes originais das leveduras industriais selecionadas, como PE-02, CAT-1, SA-1 e BG-1, mas estas linhagens se referem aos códigos 17, 37, 38 e 39, respectivamente

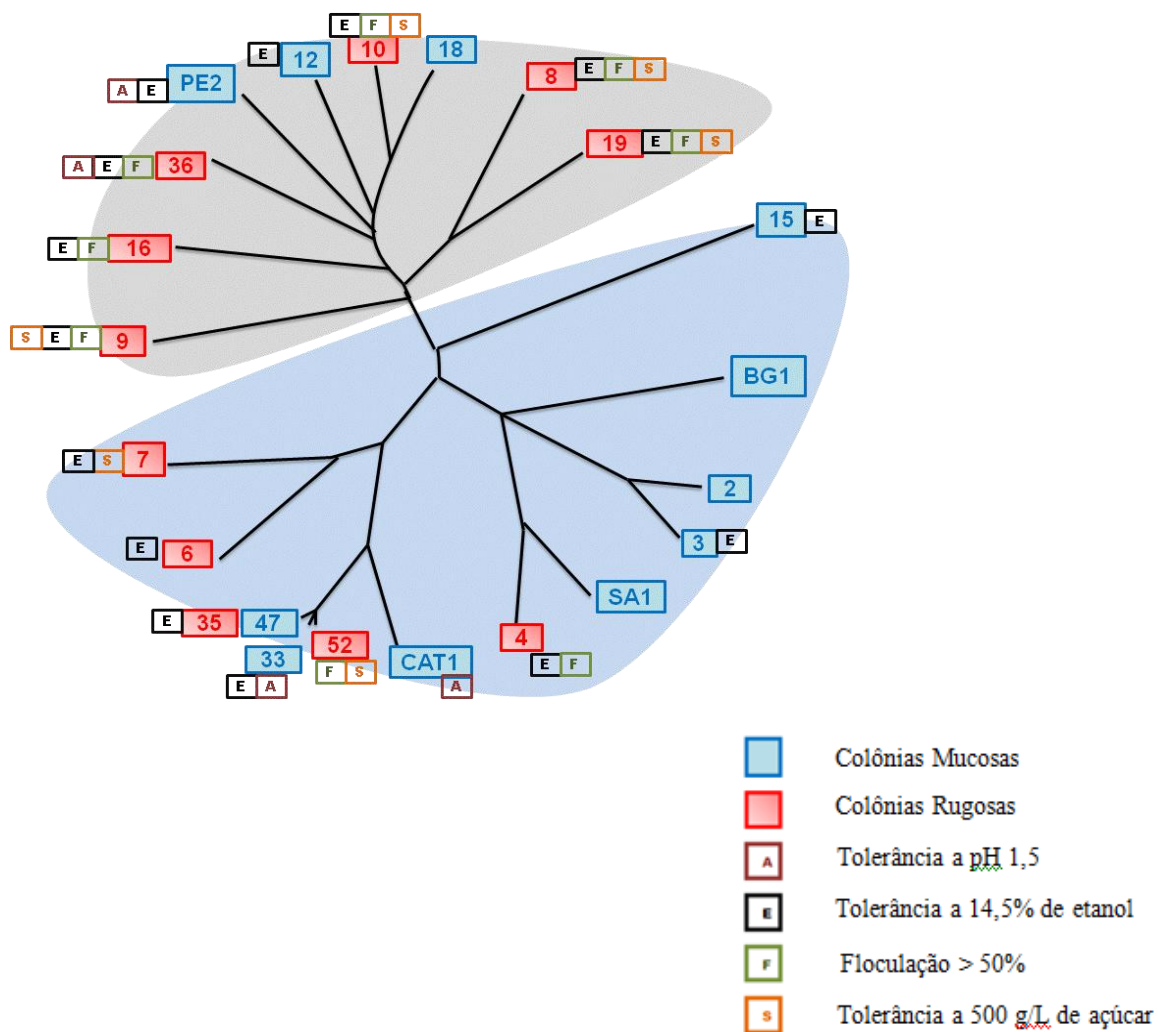


Figura 10 - Árvore fenética construída com os resultados da amplificação dos loci microssatélites, usando o software Population 1.2.31 através do método UPGMA e associada aos resultados de resistência aos estresses anteriormente descritos. Nesta figura foram colocados os nomes originais das leveduras industriais selecionadas, como PE-02, CAT-1, SA-1 e BG-1, mas estas linhagens se referem aos códigos 17, 37, 38 e 39, respectivamente

Nos últimos anos, a técnica de microssatélites, que utiliza seqüências (*primers*) curtas de até seis nucleotídeos, os quais são encontrados no genoma de vários microrganismos, foi relatada como muito útil para *S. cerevisiae* (BALEIRAS COUTO et al., 1996; PEREZ; GALLEG0 e HIDALGO, 2001). SCHULLER et al. (2004) realizaram um levantamento de métodos moleculares para identificação de leveduras, sendo a combinação de dois loci (SCaat1 e ScAAT3) geradores de maior polimorfismo (18 e 14 genótipos, respectivamente), resultando numa caracterização não equivocada de 23

cepas Comparada com outros métodos moleculares, a técnica dos microssatélites é uma ferramenta poderosa e promissora para o estudo de grande escala como a determinação da proximidade genética (estudos filogenéticos) e distribuição biogeográfica de cepas selvagens de *S. cerevisiae*, tendo como desvantagens maior custo em investimentos de equipamentos e pessoas qualificadas (SCHULLER et al., 2004).

Conterno et al. (2006) caracterizaram linhagens de *Brettanomyces bruxellensis* por seqüenciamento da região 26S do DNA ribossomal e por testes fisiológicos, verificando que várias características fisiológicas se apresentaram muito variáveis e não ficaram reunidas nos mesmos agrupamentos originados pela análise de DNA.

Os resultados dos microssatélites não demonstraram a presença de marcadores moleculares específicos que poderiam ser utilizados para discriminar as linhagens rugosas das mucosas, e assim verificar as características genéticas associadas ao tipo de colônia. A proximidade genética da linhagem selecionada PE-02 com leveduras de colônias rugosas pode sugerir uma origem comum ou ainda o fato das rugosas terem se originado da PE-02, que tem sido extensivamente utilizada em destilarias brasileiras. Este ponto merece uma investigação mais aprofundada que pode levar à conclusões importantes sobre o aparecimento e origem de colônias rugosas durante o processo fermentativo.

2.3.5 Efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras

Para este teste, foram selecionadas a levedura 17 (representante das linhagens com colônias mucosas, PE-02) e a levedura 52 (representante das linhagens com colônias rugosas). Estas linhagens foram escolhidas devido ao fato de uma delas ser uma linhagem industrial extensivamente utilizada nas destilarias brasileiras, caso da PE-02, e pelo fato da linhagem 52 estar em um grupo genético distinto da PE-02, apresentando alta taxa de floculação e resistência à alta concentração de açúcar. Além disto, esta linhagem não apresentou crescimento em meio com pH 1,5, o que se prestou ao objetivo de testar o efeito do tratamento ácido sobre as leveduras rugosas.

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que para todos os tratamentos, a linhagem 52 (colônia rugosa) foi bastante afetada, sendo o tratamento ácido mais

eficiente em valores de pH 1,0 e 1,5. No entanto, ocorreu uma recuperação da levedura tratada com ácido após incubação em meio de caldo de cana em 36 horas de cultivo, não alcançando, porém, os valores iniciais de células antes do tratamento ácido, com exceção do tratamento em pH 2,0. Nesta condição, ocorreu a recuperação total da levedura nesse período de tempo, ou seja, houve crescimento suficiente para igualar-se ao número inicial de colônias antes do tratamento ácido.

A linhagem PE-02 (colônia mucosa) não apresentou diminuição expressiva do crescimento após tratamento ácido, mantendo a estabilidade no número de colônias tanto em pH 1,0 quanto em pH 1,5 (apesar de apresentar diferença significativa a 5% em pH 1,0), apresentando ainda um aumento significativo em pH 2,0. Após 36 horas de incubação em meio de caldo de cana, as células tratadas com ácido sulfúrico haviam aumentado em número em relação ao valor inicial, antes do tratamento.

GOMES (1988) não observou nenhuma ação drástica sobre a viabilidade celular em experimentos de laboratório utilizando *S. cerevisiae* quando o leite da levedura foi tratado em três níveis de pH (2,0; 2,5; e 3,0) ajustados com ácido sulfúrico, obtendo maiores rendimentos em relação aos controles. Os resultados aqui apresentados mostraram que o tratamento ácido em pH 1,5 não afetou a levedura do processo, pois não houve redução do número de colônias após o tratamento e a levedura cresceu quando cultivada em seguida em meio de caldo de cana.

Estes resultados mostraram assim que o controle da contaminação por uma levedura rugosa (como a linhagem 52) poderia ser realizado com o abaixamento do pH (de 2,0, que é o comumente utilizado, para 1,5 por exemplo) na cuba de tratamento do fermento, sem que haja prejuízo à levedura do processo, no caso aqui estudado da PE-02. A recuperação da levedura rugosa após incubação em meio de caldo de cana ocorreu em um período mais longo de tempo que aquele em que é transcorrido um ciclo fermentativo, normalmente de 8 a 10 horas de fermentação, assegurando assim o controle do crescimento da levedura rugosa contaminante.

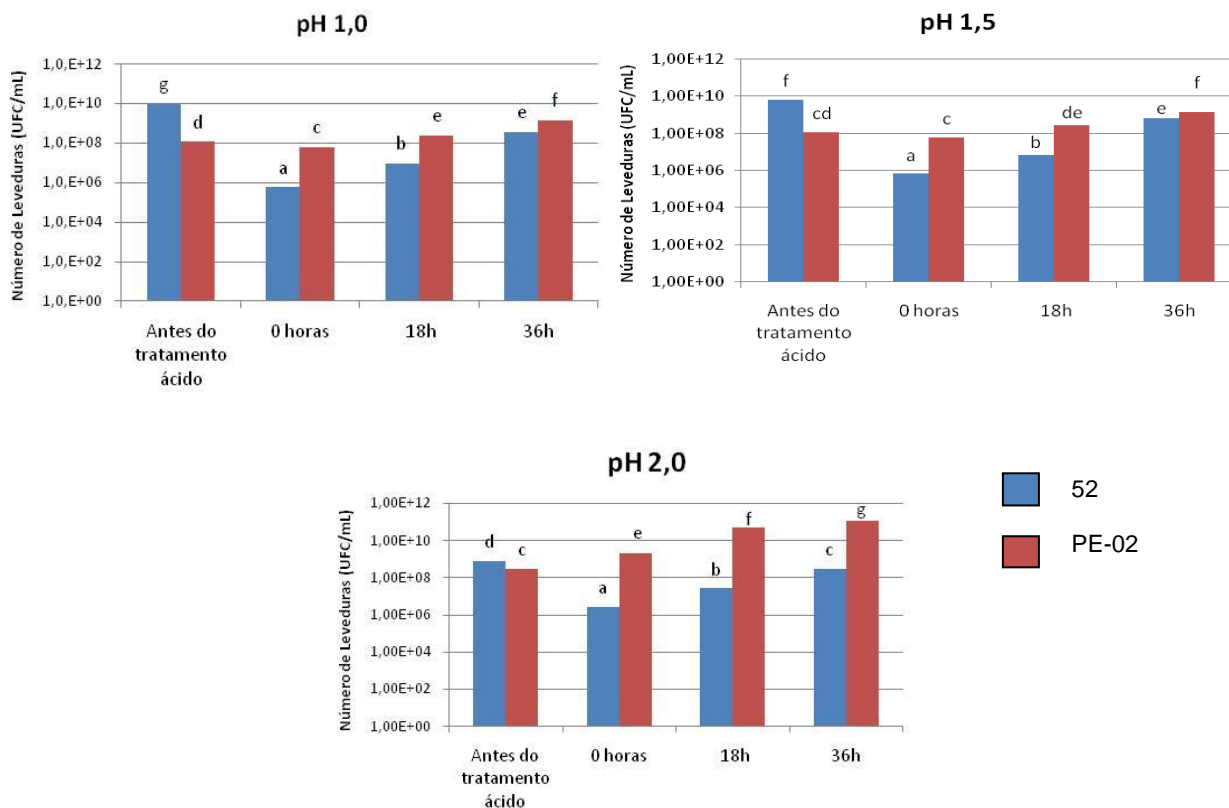


Figura 11 - Crescimento de duas linhagens de *S. cerevisiae* (52, rugosa; e PE-02, mucosa), submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico em diferentes valores de pH (1,0, 1,5 e 2,0), a 30°C, por 2 horas, a 160 rpm. A análise do número de colônias foi realizada antes do tratamento ácido, logo após o tratamento ácido (0 horas) e após 18 horas e 36 horas de incubação das células tratadas com ácido em meio de caldo de cana, a 30°C, 160 rpm

2.3.6 Teste fermentativo com reciclo celular e tratamento do fermento

Para este teste, foram selecionadas a levedura 17 (representante das linhagens com colônias mucosas, PE-02) e a levedura 52 (representante das linhagens com colônias rugosas) para a realização da fermentação com reciclo celular (seis ciclos de 12 horas e com tratamento ácido do fermento), cujos resultados encontram-se nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

A fermentação conduzida com a levedura rugosa apresentou menor produção de etanol, maior teor de açúcar redutor residual e eficiência fermentativa por volta de 60%. Quando se utilizou a cultura mista da levedura rugosa e da levedura mucosa, verificou-se uma produção de etanol superior à da fermentação com a cultura pura da rugosa, porém significativamente inferior à da fermentação com a cultura pura da colônia mucosa de *S. cerevisiae*. O mesmo foi observado com o açúcar redutor residual (Figura

13).

No entanto, a eficiência fermentativa da cultura mista foi similar à da fermentação com a PE-02, mas diferente da cultura pura da rugosa (Figura 13). Os resultados comprovaram aqueles anteriormente descritos para a fermentação em um único ciclo de 48 horas, onde as leveduras rugosas se equipararam em termos de produção de etanol à mucosa a partir de 36 horas de fermentação. Aqui se empregou o sistema de batelada com reciclo celular a cada 12 horas, tempo insuficiente para a levedura rugosa completar a fermentação e consumir todo o açúcar disponível.

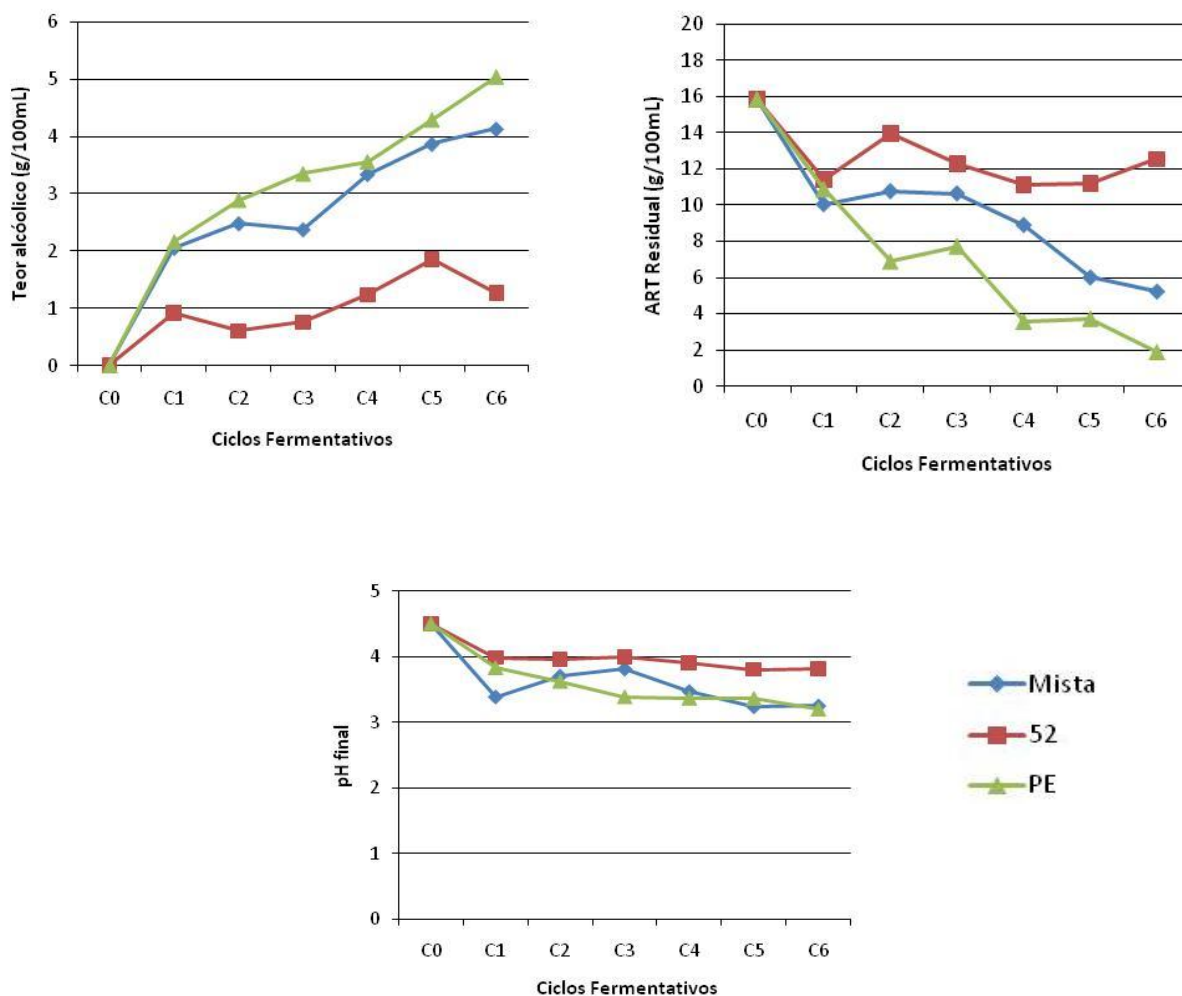


Figura 12 - Teor alcoólico (g/100 mL), pH final e ART residual (g/100 mL) apresentados pelas linhagens de colônia rugosa (52), de colônia mucosa (17, PE-02) e pela cultura mista (52 + PE-02) de *S. cerevisiae*, em meio de caldo de cana, 16° Brix, pH 4,3, durante seis ciclos fermentativos de 12 horas, com tratamento ácido do fermento (pH 1,5), a 30°C (n=3), 160 rpm de agitação

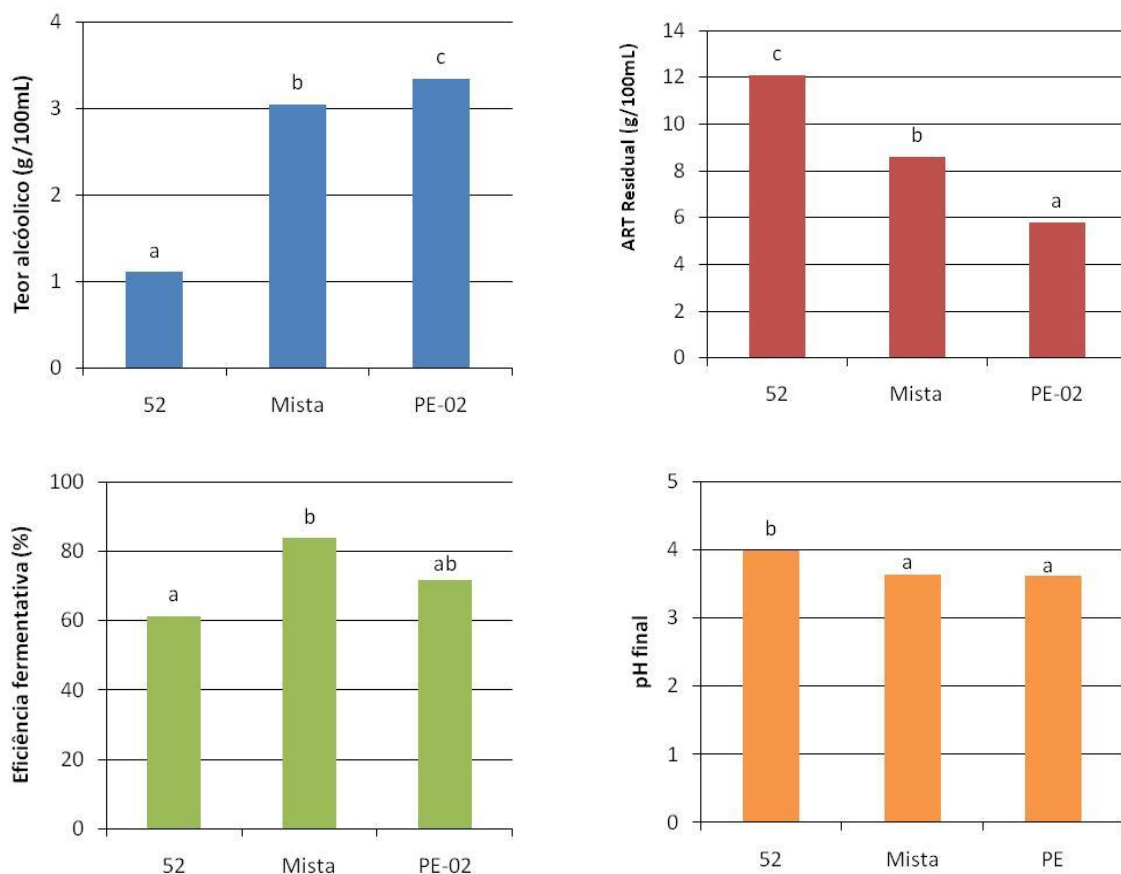


Figura 13 – Efeito do tipo de cultura (puras e mista das linhagens 52 – rugosa e PE-02 – mucosa) sobre o teor alcoólico, ART residual, pH e eficiência fermentativa em fermentações desenvolvidas em meio de caldo de cana, 16° Brix, pH 4,3, durante seis ciclos fermentativos de 12 horas, com tratamento ácido do fermento (pH 1,5), a 30°C, 160 rpm de agitação

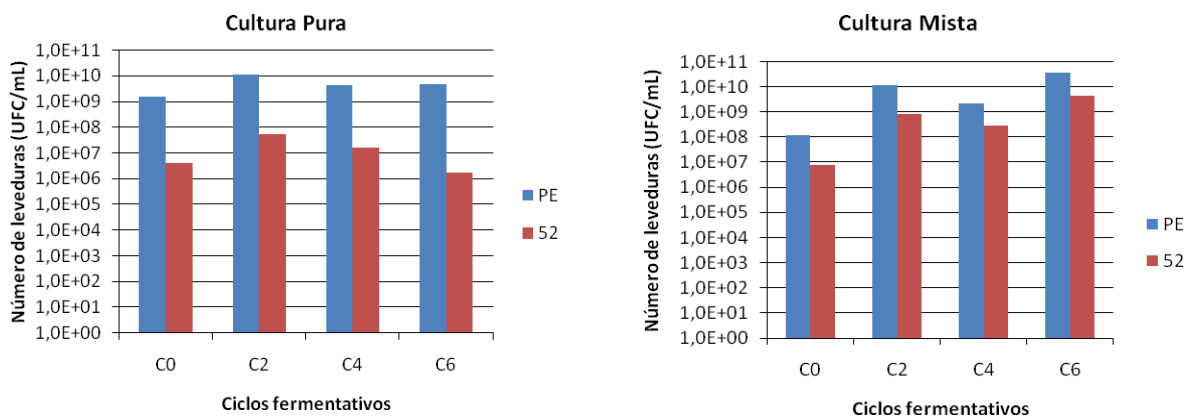


Figura 14 – Número de leveduras (UFC/mL) durante as fermentações desenvolvidas em meio de caldo de cana inoculado com as linhagens 52 e PE-02 em culturas puras e mista, 16° Brix, pH 4,3, durante seis ciclos fermentativos de 12 horas, com tratamento ácido do fermento (pH 1,5), a 30°C. As contagens foram realizadas em meio YEPD

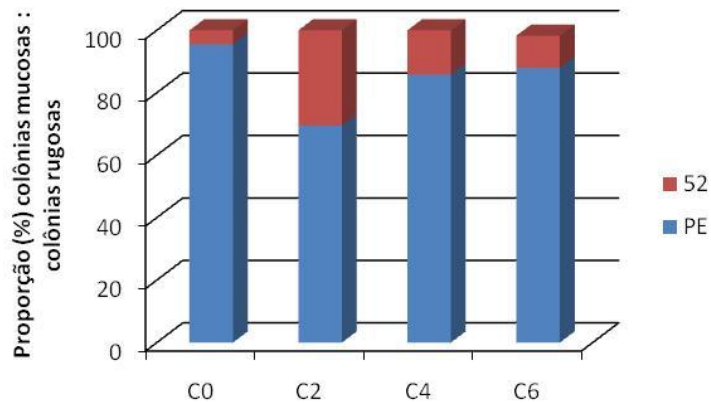


Figura 15 – Proporção de colônias (%) rugosas (linhagem 52) e mucosas (PE-02) durante as fermentações desenvolvidas em meio de caldo de cana, 16° Brix, pH 4,3, durante seis ciclos fermentativos de 12 horas, com tratamento ácido do fermento (pH 1,5), a 30°C, 160 rpm de agitação

O perfil apresentado pela levedura de colônia rugosa, como fermentação mais lenta, sobra de açúcar, e conseqüentemente baixa eficiência fermentativa, têm sido freqüentemente relatados em casos de contaminação por este biótipo de levedura (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 1996; FERMENTEC NEWS, 2005). A morfologia celular destas leveduras, com as células agrupadas em cachos ou flocos, dificulta o contato com o meio e os nutrientes, ocasionando uma fermentação mais lenta.

O pH final do meio de fermentação foi estatisticamente similar (e menor) nos tratamentos com a cultura mista e cultura pura de PE-02, e diferente estatisticamente da cultura pura da levedura rugosa. O pH menor nesses tratamentos reflete a fermentação mais eficiente.

Os experimentos aqui realizados mostram aspectos interessantes quando se avalia a fermentação conduzida com a cultura mista das leveduras rugosa e mucosa (linhagem 52 + PE-02) que merecem ser ressaltados. O inóculo foi preparado utilizando-se partes iguais em massa úmida das leveduras, ou seja, tanto a levedura rugosa quanto a mucosa foram inoculadas na fermentação na mesma concentração de massa (5 g/L cada, totalizando 10 g/L). O monitoramento do crescimento de ambas durante os ciclos fermentativos foi realizado por plaqueamento em meio YEPD, discriminando-se entre os dois fenótipos de colônias no momento da contagem das colônias desenvolvidas no meio de cultura. A Figura 14 traz os resultados da contagem

em placas para a PE-02 e a 52 em culturas puras, e para as duas em cultura mista. A PE-02 apresentou o mesmo perfil de crescimento na cultura pura quanto na mista, mas a linhagem 52 apresentou um perfil diferente nas duas culturas. O número inicial de colônias foi o mesmo nas duas fermentações, porém na cultura pura, houve um aumento até o 2º. ciclo fermentativo, porém a seguir o número de colônias apresentou uma tendência de decaimento. Na cultura mista, observou-se um aumento no número de colônias até o 2º. ciclo fermentativo, mas a seguir o número de colônias aumentou, estabilizando a seguir.

Embora a quantidade de massa celular inoculada na fermentação fosse a mesma para as duas leveduras na cultura mista, a proporção do número de colônias mostra uma relação de aproximadamente menor que 1:10, para rugosas:mucosas, no início da fermentação. Isto provavelmente se deve à característica das células das leveduras rugosas, que se apresentam em cachos (flocos) com muitas células. Cada cacho deve originar uma colônia no meio de cultura, de forma que para uma mesma massa de células, a levedura rugosa deve apresentar um número de colônias menor que a apresentada pela levedura mucosa. Este resultado pode levar a uma má interpretação dos resultados de monitoramento na destilaria, pois através do plaqueamento pode ser observado um número (proporção) baixo de rugosas, mas a massa correspondente de células em cachos nas dornas pode ser grande. Uma alta quantidade de massa nas dornas leva à flotação das células devido ao gás carbônico que fica aprisionado, formação de espuma (*scum*), extravasamento das dornas com perda de açúcar e álcool, com conseqüente queda na eficiência fermentativa (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 2000).

Outra questão refere-se ao maior crescimento das leveduras rugosas na cultura mista que na cultura pura ao longo dos ciclos fermentativos. O consumo de açúcar foi menor e mais lento na cultura mista em comparação com a cultura pura da PE-02, indicando um efeito da contaminação com a rugosa. Esta pode estar utilizando o açúcar para produção de biomassa, e realmente o teor alcoólico do vinho foi menor também no mesmo período de tempo. Mas porque este comportamento de crescimento não ocorreu na cultura pura pode ser devido ao fato da presença da levedura mucosa, mais eficiente na hidrólise da sacarose, liberando açúcares redutores como glicose e

frutose que seriam mais prontamente utilizados pela levedura rugosa e em uma velocidade mais lenta.

Há de se considerar também o efeito do tratamento ácido (em pH 1,5) sobre a *performance* das leveduras. Embora não se tenha realizado a fermentação com reciclo celular sem tratamento ácido ou com tratamento em pH superior (por exemplo, 2,0, como comumente empregado na indústria), os resultados descritos no item anterior mostraram que a levedura rugosa foi afetada pelo tratamento ácido em pH 1,5, o que não ocorreu com a PE-02. Considerando-se isto, poderia se esperar um crescimento muito maior da levedura rugosa se o tratamento ácido não fosse realizado ou o fosse em condições menos estressantes. O tratamento ácido utilizado provavelmente diminuiu o ritmo de crescimento da levedura rugosa, de forma que o impacto da contaminação sobre a eficiência fermentativa não foi significativo, comparando-se com a PE-02. Outros níveis de contaminação da levedura rugosa poderiam ser testados para verificar se este resultado ainda se manteria.

É geralmente aceito que a fermentação alcoólica é um processo bem conhecido e dominado. No entanto, pouco se conhece ainda sobre a resposta das leveduras às condições estressantes adotadas pelas destilarias brasileiras, que simplesmente não ocorrem em outros processos fermentativos (AMORIM et al., 2011). Se para a levedura do processo ainda há muito que se pesquisar, no campo das leveduras contaminantes certamente a carência é muito maior.

3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os testes de caracterização morfo-fisiológica das linhagens de *S. cerevisiae* com colônias mucosas e rugosas mostraram que a invasividade em meio YEPD Agar ocorreu em baixa frequência dentre as 22 leveduras testadas; dez dentre onze leveduras rugosas apresentaram taxa de floculação expressiva, e entre as mucosas a floculação foi praticamente inexistente; nenhuma das linhagens (mucosas e rugosas) apresentou produção de toxina *killer*; as linhagens com colônias rugosas apresentaram capacidade fermentativa significativamente inferior às linhagens com colônias mucosas de *S. cerevisiae*, em sistema de batelada com ciclo único de 48 horas em meio de caldo de cana, demonstrando velocidade mais lenta de fermentação;

- quanto à resistência ao estresse por temperatura, pH, etanol e concentração de açúcar, as linhagens mucosas tiveram maior resistência à acidez do meio, enquanto as linhagens rugosas foram mais resistentes às concentrações elevadas de etanol e açúcar. Quanto ao crescimento na presença de actidione, nenhuma levedura se desenvolveu em concentração superior a 1 ppm;

- a análise genética, através dos loci microssatélites, revelou a presença de dois grupos principais relacionados geneticamente, sendo o primeiro ramo constituído principalmente de colônias rugosas (67%), contendo, no entanto, a linhagem PE-02; o outro grupo (com três subgrupos) compreendeu principalmente colônias mucosas. No primeiro grupo, aparecem linhagens com alta taxa de floculação e tolerância às altas concentrações de açúcar e etanol. O segundo grupo apresentou somente cinco linhagens rugosas, mas somente duas delas com alta taxa de floculação e duas com resistência às altas concentrações de açúcar. Entre as mucosas, predominantes neste grupo, poucas apresentaram resistência significativa às situações estressantes aqui estudadas;

- quanto ao efeito do tratamento ácido sobre o crescimento das leveduras, os resultados mostraram que a levedura com colônia rugosa (linhagem 52) foi bastante afetada em valores de pH 1,0 e 1,5, enquanto a levedura com colônia mucosa (PE-02) não

apresentou diminuição no crescimento após tratamento nestes valores de pH. Ambas as leveduras apresentaram recuperação no crescimento quando inoculadas em meio de caldo de cana após o tratamento ácido, mas a levedura rugosa não igualou o crescimento em 36 horas de incubação àquele apresentado antes do tratamento ácido;

- a fermentação em sistema de batelada com reciclo celular e tratamento ácido conduzido em pH 1,5, teve efeito sobre o crescimento da levedura rugosa (linhagem 52) quando em cultura mista com a levedura mucosa (PE-02), não resultando em prejuízo à eficiência fermentativa, quando comparada com a cultura pura da PE-02. Em cultura pura da levedura rugosa, houve menor produção de etanol, maior sobra de açúcar redutor total e eficiência fermentativa por volta de 60%, demonstrando o baixo rendimento fermentativo destas leveduras;

- o conhecimento das respostas das leveduras rugosas às situações estressantes pode ajudar a manejar a fermentação alcoólica para minimizar o efeito da levedura contaminante.

REFERÊNCIAS

AGROSOFT BRASIL. **Descoberto o agente de contaminação industrial nas destilarias de cana-de-açúcar.** Agrosoft Brasil, 26 ago. 2008. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/agropag/102125.htm> Acesso em: 18 abril 2010.

ALCOOBRÁS. **Guerra contra as bactérias.** ALCOOBRAS, São Paulo, n.91, 2005. Disponível em: <http://www.editoravalete.com.br/site_alcoobras/edições/ed_91_2.htm> Acesso em: 04 maio 2011.

ALQUATI, P.H. **Caracterização e controle de microrganismos contaminantes em microdestilaria de álcool.** 1990. Trabalho de Graduação - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1990.

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB – Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.3, n.1, p. 42-49, 1984.

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica.** Araras: IAA/Cordenadoria Regional Sul, 1997.

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

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Evolution of ethanol production in Brazil. In: *Distilled Spirits - Tradition and Innovation*, 2004, Nottingham. **Distilled Spirits - Tradition and Innovation.** Nottingham, UK : Nottingham University Press, v. 1. p. 143-148, 2004.

AMORIM, H.V; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **STAB Álcool & Açúcar**, Piracicaba, v.2, n.5, p. 12-18, 1982.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n.1299, p.195-200, 2007.

BALEIRAS COUTO, M.M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H. HUISINTVELD, J.H.J.; VAN DER VOSSSEN, J. Evaluation of molecular typing techniques to assaying genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p.41, 1996.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V; OLIVEIRA, A.J. Leveduras selecionadas: permanência no processo industrial monitorada pela técnica da cariotipagem. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n.16, p.1-51, 1996.

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

BATISTA, A.S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses**. 2001. 94p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) –Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 88, p.746-755, 1999.

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **STAB Álcool & Açúcar**, Piracicaba, v.3, n.9, p.10-13, 1983.

CALLEJA, G.B. On the nature of the forces involved in the sex directed flocculation of a fission yeast. **Canadian journal of Microbiology**, Ottawa, v. 20, p. 797-802, 1974.

CARIOCA, J.O.B.; ARORA, H.L. **Biomassa**: fundamentos e aplicações tecnológicas, Ceará: Ed. Fortaleza, 1984.644p.

CARVALHEIRO, F., ROSEIRO, J.C.; GIRIO, F.M. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on threulose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, London, v. 16, p. 543-550, 1999.

CASTRO, M.M.S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica**: diversidade taxonômica e metabólica. 1995. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimento) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

CECCATO-ANTONINI, S.R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Kew, v.30, n.7, p.1151-1161, 2008.

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

CECCATO-ANTONINI, S.R.; CREMONINI, L.C.M.; REGENFUSS, C. Killer character of yeast isolated from ethanolic fermentations. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.3, p. 631-635, 1999.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processos de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 6., 1996, Maceio. **Anais...Maceió**: STAB, 1996. p. 23-29.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C. Monitoramento microbiológico da fermentação etanólica: uma experiência. **Jornal Cana**, Ribeirão Preto, p.25-26, jan/2000.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, D.F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.18, p. 40-46, 1998.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; TOSTA, C.D.; SILVA, A.C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.1, p.13-23, 2004.

CONTERNO, L.; JOSEPH, L.C.M.; ARVIK, T.J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L.F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Geneva, v. 57, n.2, p.139-147, 2006.

ESSER, K., HINRICHS, J., KUES, U. Genetic control of flocculation of yeast with respect to application in biotechnology. **Flocculation in biotechnology and separation systems**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.383-398.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 469-486, 2000.

FERMENTEC NEWS. 02/2005. Disponível em:
<http://www.fermentec.com/br/news/Fermentec%20News%2002%20-%202005.pdf>.
Acesso em: 08 agosto 2011.

FERREIRA, L.V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. 2002. 266p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção de álcool**: fermentação alcoólica. Rio de Janeiro, 2008. 73 p. (apostila)

FIGUEIREDO, C.M. **Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**. 2008. 71p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Campinas. 1989. 388 p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989.

GOMES, E. **Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica.** 1988. 206 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

JAKOBSEN, B.K.; PELHAM, H.R.B. A conserved heptapeptide restrains the activity of yeast heat shock transcription factor. **The EMBO Journal**, London, v. 10, p. 369-375, 1991.

JIN, Y.L.; SPEERS, R.A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, Ottawa, v. 31, n. 6 – 7, p. 421 – 440, 1998.

KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology Therapeutic**, New York, v. 80, p.183-201, 1998.

KREGGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study.** 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.

KRON, S.J.; GOW, N.A. Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. **Current Opinion Cell Biology**, Philadelphia, v.7, p. 845-855, 1995.

LIMA, U.A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P.; SOUZA, L.G. de. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.83, n.4, p.21-27, 1974.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1986. v. 1. 285p.

LIMA, U.A., BASSO, L.C., AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. p. 1-40.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 63-68, 2001.

LOPES, C.H. **Tecnologia de produção de açúcar.** São Carlos: UFSCar, 2009. p. 215.

MAIA, A.B.R.A. **Fundamentos de fermentação alcoólica.** 1989. 129p. (Apostila do curso de Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.

MARIANO, P.L.S. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica.** 2006. 117p. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) –Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Piracicaba, 2006.

MENEGHIN, M.C. **Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera* contaminantes da fermentação alcoólica.** 2007. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MENEGHIN, S.P.; REIS, F.C.; ALMEIDA, P.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 337-343, 2008.

NEDER, R.N. **Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana: posição sistemática e valor industrial.** 1957. 79p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1957.

OLIVEIRA, M.C.F.L. de; PAGNOCCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-alcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988. São Lourenço. **Anais...**São Lourenço: SBM, 1988. p.78-81.

RUIS, H.; SCHULLER, C.S. Stress signalling in yeast. **Bioassays**, Bethesda, v. 17/11, p.959-65, 1995.

SCHULLER, D.; VALERO, E.; DEQUIN, S; CASAL, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.9, n. 231, p.19-26, 2004.

SILVA FILHO, E.A.; MEOL, H.F.; ANTUNES, D.F.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JR., M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.32, p.481-486, 2005.

SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*.** 2009. 155p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantan-Instituto de Pesquisas Tecnológicas , São Paulo, 2009.

STEWART, G.G.; RUSSEL, I. Centenary review: one hundred years research and development in the brewing industry. **Journal Institute of Brewing**, London, v.81, p. 248-257, 1975.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** 2001. 202p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) -, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M.G.S. Caracterização do fator killer para linhagens floculantes de *Saccharomyces sensu stricto* isoladas de processos brasileiros de produção de bioetanol. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18. 2011. Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: SINAFERM, 2011. 1 CD-ROM.

STROPPA, C.T.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S. **Caracterização das Leveduras Floculantes Selecionadas em Reator Tipo Torre em uma Unidade de Fermentação Alcoólica.** In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 14., 2003. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SINAFERM, 2003. 107p.

SWAN, T.M.; WATSON, K. Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.169, p. 191-197.

WANG, F.-Z.; SHEN, W.; RAO, Z.-M.; FANG H.-Y.; ZHAN X.-B. & ZHUGE J. Construction of a flocculating yeast for fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, v.37, p.97-102, 2008.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND; D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications.** New York: Academic Press, 1994. p. 315-321.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n.1, p.12-16, 1991.