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

**Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de
Dekkera contaminantes da fermentação alcoólica**

Maria Cristina Meneghin

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

**Piracicaba
2007**

Maria Cristina Meneghin
Biomédica

**Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera*
contaminantes da fermentação alcoólica**

Orientadora:
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
2007**

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

Meneghin, Maria Cristina

Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera* contaminantes da fermentação alcoólica / Maria Cristina Meneghin. - - Piracicaba, 2008.
85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Álcool 2. Fermentação alcoólica 3. Leveduras 4. Vinho I. Título

CDD 660.62

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

Aos meus pais
José Carlos e Maria Beatriz,
que venceram na vida e são os meus guias,
pelo apoio, compreensão, paciência
e incentivo ao aprendizado,

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Demonstro aqui meus sinceros agradecimentos às pessoas que, sem o apoio, compreensão, orientação e ajuda prestados, não seria possível a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me concedido saúde, inteligência, força e esperança em todos os momentos;

À Prof^a Dr^a Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar), pela orientação, compreensão, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Jorge Horii (ESALQ/USP), pela colaboração e carinho;

À minha família, em especial meu pai, José Carlos Meneghin, pelas sábias e valiosas sugestões, e minha mãe Maria Beatriz Marretto Meneghin, pelo companheirismo e paciência;

À minha tia, amiga e colega de trabalho, Prof^a Silvana Perissatto Meneghin (UFSCar), pelo incentivo e oportunidade;

Às minhas amigas Sílvia Nalli, Fernanda Maróstica, Caroline Gualdini e Lariana Carrocini, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, em especial à Marina Torrezan, que além de amiga, é irmã, confidente, companheira de estudos e de profissão;

Ao querido Danilo Cassimiro de Oliveira, pelo companheirismo, amor, paciência e apoio ímpar;

Aos colegas do LAMAM (UFSCar), pela colaboração, convivência, sugestões e amizade;

À técnica do LAMAM (UFSCar), Lúcia T. Picollo Silva, pela colaboração, carinho e amizade;

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

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

em especial a Gislaine, Regina, e Bia, pelo convívio harmonioso e afetuoso que me proporcionaram.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos (05/53401-6) e apoio à pesquisa (05/04011-0).

"É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida."

(Bob Marley)

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Revisão de literatura.....	13
2.2 Material e métodos.....	20
2.2.1 Isolamento e seleção de linhagens de leveduras.....	20
2.2.2 Caracterização bioquímica/fisiológica das leveduras.....	21
2.2.2.1 Produção de ácido.....	21
2.2.2.2 Formação de esporos sexuais.....	21
2.2.2.3 Formação de pseudomicélio.....	22
2.2.2.4 Crescimento em extrato de malte.....	22
2.2.2.5 Crescimento em ágar malte.....	23
2.2.2.6 Assimilação de compostos de carbono.....	23
2.2.2.7 Assimilação de compostos de nitrogênio.....	24
2.2.2.8 Crescimento a 37 °C.....	24
2.2.2.9 Crescimento a 50 % glicose-ágar extrato de levedura.....	24
2.2.2.10 Fermentação	25
2.2.3 Caracterização molecular.....	25
2.2.3.1 Obtenção do DNA genômico.....	25
2.2.3.2 PCR.....	28
2.2.3.3 Purificação de produto PCR.....	29
2.2.3.4 Sequenciamento da região ITS do rDNA.....	30
2.2.4 Ensaio <i>killer</i>	30
2.2.5 Ensaio fermentativos.....	32
2.2.5.1 Material biológico.....	32
2.2.5.2 Meios de cultura.....	32
2.2.5.3 Propagação de células para obtenção do inóculo.....	32
2.2.5.4 Teste fermentativo.....	33
2.2.5.4.1 Plaqueamento em meios WLN e WLD.....	34

2.2.5.4.2 Contagem e viabilidade celular.....	34
2.2.5.4.3 pH.....	34
2.2.5.4.4 °Brix.....	34
2.2.5.4.5 Açúcares redutores totais (ART).....	35
2.2.5.4.6 Álcool.....	36
2.2.5.4.7 Cálculo de eficiência fermentativa.....	37
2.2.6 Meios e soluções utilizados para cultivos e ensaios.....	37
2.3 Resultados e discussão.....	42
2.3.1 Identificação e caracterização das linhagens de leveduras.....	42
2.3.2 Ensaios fermentativos.....	56
3 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	81

RESUMO

Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera* contaminantes da fermentação alcoólica

As leveduras *Dekkera/Brettanomyces* estão envolvidas na deterioração de vinhos após o término das fermentações alcoólicas e maloláticas, tendo se apresentado como agente contaminante de processos contínuos de produção de etanol industrial. São caracterizadas pela morfologia celular típica (células alongadas e ogivais), alta produção de ácido e crescimento lento, porém de difícil identificação. Embora muitos trabalhos já tenham sido publicados acerca do seu papel na fermentação do vinho, pouco se conhece sobre o seu comportamento no processo de fermentação para produção de álcool combustível. Desta forma, este trabalho objetivou selecionar, identificar e caracterizar linhagens de *Dekkera* e *Brettanomyces* isoladas de processos fermentativos, através de testes de taxonomia clássica, moleculares (PCR e sequenciamento) e de biotipagem através do sistema *killer*, visando a avaliação de fermentações mistas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*, a última em níveis de contaminação variando de 10^1 a 10^3 células/mL, em meio de caldo de cana, em processo de fermentação em batelada com reciclo celular (14 ciclos de 12 horas) para produção de etanol. Os testes morfológicos e fisiológicos/bioquímicos de oito linhagens selecionadas pela alta produtividade de ácido a partir da glicose e morfologia celular característica, apontaram os gêneros *Dekkera* ou *Brettanomyces*, sem possibilidade de identificação em nível de espécie devido à ambigüidade dos resultados dos testes fisiológicos. O sequenciamento da região ITS (*Internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal confirmou somente três linhagens como *Dekkera bruxellensis*, sendo as demais predominantemente pertencentes à espécie *Pichia guilliermondii*. O tamanho da região ITS, incluindo o gene 5,8S, variou de 400 500 pb entre as três linhagens. A utilização do sistema *killer* como método de biotipagem para leveduras *Dekkera* mostrou-se inviável devido ao fenótipo predominantemente neutro apresentado pelas linhagens. Somente a levedura *killer* CCA510 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou atividade inibitória contra as três linhagens de *D. bruxellensis*. Os ensaios fermentativos realizados com a linhagem de *D. bruxellensis* (CCA059) em fermentações puras e mistas com *S. cerevisiae* (CCA193, PE-02), mostraram que a levedura contaminante foi capaz de crescer em meio de caldo de cana, independentemente do tamanho do seu inóculo inicial (10^1 a 10^3 células/mL), impactando negativamente a fermentação etanólica, causando a diminuição da viabilidade de *S. cerevisiae*, diminuindo o pH do meio, decréscimo na produção de etanol e eficiência fermentativa, possivelmente devido à produção de ácido acético a partir do ART do meio de fermentação. Extrapolando-se os resultados obtidos em escala de laboratório para a escala industrial de uma destilaria de médio porte, a contaminação por *Dekkera bruxellensis* acarretaria uma perda de 6 milhões a 15 milhões de litros de álcool na safra, que deixariam de ser produzidos, dependendo do nível de contaminação.

Palavras-chave: *Dekkera bruxellensis*; levedura contaminante; fermentação alcoólica.

ABSTRACT

Characterization and fermentative behavior of *Dekkera* strains contaminating alcoholic fermentation

Dekkera/Brettanomyces yeasts are found to be either contaminants in wine after completion of alcoholic and malolactic fermentations and in continuous fermentations for fuel alcohol production. They are characterized by typical cell morphology (elongated and ogival cells), high acid production and slow growth, however not easily identified. Although their role in wine fermentations is well-defined, a little is known about their behavior during fermentation for ethanol production. This work aimed the screening, identification and characterization of *Dekkera* and *Brettanomyces* strains isolated from fermentative processes, through classical taxonomic tests, molecular analysis (PCR and DNA sequencing) and biotyping by killer system. Following fermentation essays were carried out to evaluate mixed fermentations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera bruxellensis*, the last one in contamination levels varying from 10^1 to 10^3 cells/mL, in sugar cane medium, using batch fermentation process with cell recycle (fourteen 12-hour cycles) for fuel ethanol production. Morphological and physiological/biochemical tests involving eight strains selected for their high acid production from glucose and typical cell morphology, pointed out to the genera *Dekkera* or *Brettanomyces*, without possibility of species identification due to the variability and ambiguity of physiological tests. DNA sequencing of the ITS (*Internal transcribed spacer*) region belonging to ribosomal DNA confirmed only three strains as *Dekkera bruxellensis*, the others were predominantly *Pichia guilliermondii*. The ITS region, including the 5,8S gene, varied from 400 to 500 bp among the three strains. The use of killer system as a biotyping method for *Dekkera* strains might not be applied because the strains were predominantly neutral to killer toxins. Only the killer strain CCA510 (*Kluyveromyces marxianus*) showed to have inhibitory activity against the strains of *D. bruxellensis*. The fermentative essays using a strain of *D. bruxellensis* (CCA059) in mixed and pure fermentations with *S. cerevisiae* (CCA193, PE-02), have shown that the contaminant yeast was able to grow in sugar cane juice, regardless of the initial inoculum size (10^1 to 10^3 cells/mL), impairing the bioethanol fermentation, causing diminished *S. cerevisiae* viability, pH decrease, lower ethanol production and fermentative efficiency, mainly due to the acetic acid production from reducing sugar present in fermentation medium. Extrapolation of the results obtained in laboratory scale to industrial scale in a medium-sized distillery, have revealed that contamination by *Dekkera bruxellensis* would result in a alcohol loss of 6 millions to 15 millions of liters, which would not be produced, depending on the contamination level.

Key words: *Dekkera bruxellensis*, contaminant yeast, alcoholic fermentation

1 INTRODUÇÃO

As leveduras *Brettanomyces/Dekkera* estão envolvidas na deterioração da cerveja e vinho, com a produção de compostos secundários (CHATONNET et al., 1992, 1995; EDLIN et al., 1995; DIAS et al., 2003). Em vinho, estas leveduras crescem tipicamente em baixos números depois do término da fermentação alcoólica e malolática, durante o envelhecimento em barris, tanques e garrafas. Os aromas característicos dos metabólitos produzidos são descritos como de plástico queimado, fumaça, suor de cavalo, couro, lã molhada e de rato (HERESZTYN, 1986; CHATONNET et al., 1992; IBEAS et al., 1996).

O gênero *Brettanomyces* já era conhecido desde 1904, mas somente em 1940 teve sua morfologia e fisiologia descritas. A forte produção de ácido, crescimento lento em extrato de malte e frequência de células ogivais possibilitou seu enquadramento em um grupo específico, sendo que a forma anamórfica do gênero *Dekkera* é o gênero *Brettanomyces*. Na reprodução sexuada, os ascos são evanescentes e possuem um a quatro ascósporos, em formato de chapéu ou esférico com borda tangencial.

Estudos moleculares das espécies dentro deste gênero se baseiam no genoma mitocondrial e nos genes do DNA ribossomal (HOEBEN; CLARK-WALKER, 1986; MOLINA et al., 1993; CAI et al., 1996; EGLI; HENICK-KLLING, 2001).

A importância enológica das leveduras *Dekkera/Brettanomyces* repousa no potencial que possuem as espécies representantes desse gênero em deteriorar vinhos já elaborados. Possuem características metabólicas diferentes daquelas apresentadas por *Saccharomyces cerevisiae*, contribuindo para seu comportamento não competitivo, durante o processo de fermentação, mas bastante oportunista, permitindo que as demais leveduras atuem no processo fermentativo. Após essa fase, entram lenta e progressivamente em atividade, causando sérios danos ao vinho. Devido ao metabolismo, estes microrganismos podem provocar aumento da acidez volátil e a formação do 4-etil-fenol no vinho (SILVA et al., 2005), levando à depreciação do produto final. A ação deteriorante dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces* é de efeito retardado (SILVA, 2003).

Silva (1994) documentou a ocorrência de uma severa contaminação por levedura selvagem no processo contínuo de produção de etanol industrial, demonstrando-se a não estabilidade do fermento inicial que foi praticamente substituído por *Dekkera bruxellensis*. Vários estudos foram conduzidos em fermentação de mosto de milho para produção de álcool, mas pouco se conhece sobre seu papel na fermentação do caldo de cana.

Outro ponto importante se refere à caracterização e identificação destas leveduras contaminantes. A identificação baseada em características morfológicas e fisiológicas geralmente é demorada e os resultados incertos, sendo o advento de técnicas moleculares um importante passo na caracterização destes microrganismos, tornando os testes mais rápidos e precisos.

A intervenção de leveduras *killer* produtoras de toxinas capazes de combater as atividades destas leveduras indesejáveis aparenta ser uma abordagem interessante, visto que quando estabelecida, esta levedura é de difícil remoção.

Desta maneira, devido ao importante papel que as leveduras dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces* exercem nos processos fermentativos (vinho e álcool) como contaminantes e a pouca informação que se tem sobre isso especialmente quanto à fermentação etanólica, esse trabalho se propõe a:

- caracterizar linhagens de *Dekkera/Brettanomyces* isoladas de processos fermentativos diversos utilizando-se testes fisiológicos/bioquímicos, moleculares e de suscetibilidade às toxinas *killer*;
- avaliar o crescimento e o comportamento fermentativo dessas linhagens em condições de fermentação.

Espera-se com os resultados poder contribuir para o entendimento do papel que as leveduras *Dekkera/Brettanomyces* têm no processo de fermentação alcoólica, uma vez que é freqüente a sua detecção, geralmente associada com prejuízos à indústria.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

As leveduras estão presentes em vários ambientes e são usadas para a elaboração de vinhos, cervejas e etanol através de processos fermentativos. A fermentação consiste num processo químico decorrente da atividade desses microrganismos, agindo sobre diversos substratos orgânicos de forma a alterá-los e originar a formação de outras substâncias em qualidade e quantidade variáveis de acordo com a seleção das leveduras utilizadas (SILVA, 1994).

O gênero *Brettanomyces* já era conhecido desde 1904, segundo Smith et al. (1990), quando Claussen conseguiu isolar esta levedura a partir de cerveja inglesa no final da fermentação. O nome *Brettanomyces* é uma alusão ao termo *British*, devido ao uso de espécies deste gênero na elaboração de cerveja de aroma forte (FRANSON, 2001). Só em 1940 Custer revelou os detalhes desta levedura e descreveu sua morfologia e fisiologia. O vigor na formação de ácido acético, o crescimento lento em ágar malte ou extrato de malte, o curto período de sobrevivência, a frequência de células ogivais e a ausência de ascósporos, permitiram agrupar os integrantes deste gênero em quatro espécies e duas variedades (linhagens).

van der Walt e van Kerken (1958), ao estudar a ocorrência de *Brettanomyces*, citam a presença de outros gêneros de leveduras, com exceção de *Dekkera*. Isto se deve ao fato de, naquela época, se pensar que o gênero *Brettanomyces* não possuía a forma perfeita, ou seja, não formava ascósporos. No entanto, van der Walt e van Kerken (1960), apud van der Walt (1964), mostraram a formação destas estruturas (ascósporos) em algumas leveduras classificadas como *Brettanomyces*. van der Walt (1964), com esta descoberta, transferiu as linhagens ascosporógenas para o gênero teleomórfico *Dekkera*, criando assim outro gênero.

Em 1964, van der Walt propôs o nome *Dekkera* para o novo gênero e reportou duas espécies, *D. bruxellensis* e *D. intermedia*. Barnett et al (1990) reconheceu quatro espécies de *Dekkera*, *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *D. custersiana* e *D. naardensis* e agrupou a forma não-esporulada de *Brettanomyces* em quatro espécies sinônimas.

Brettanomyces, a forma anamórfica do gênero *Dekkera*, inclui cinco espécies. *B. nanus* foi adicionado às quatro espécies reconhecidas (*B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus* e *B. naardenensis*), com base na homologia de sequência do DNA ribossomal (HOEBEN; CLARK-WALKER, 1986; BOEKHOUT et al, 1994).

As leveduras *Brettanomyces/Dekkera* não são freqüentemente incluídas entre os gêneros encontrados na superfície de uvas, mas são facilmente encontradas em vinícolas e destilarias e seu potencial deteriorante pode ser identificado próximo a todas as áreas de produção vinícola do mundo (FUGESLSANG, 1997). A alteração de vinhos ocorre tipicamente por leveduras *Brettanomyces/Dekkera* durante o envelhecimento do mesmo em barris ou tanques (CHATONNET et al., 1995).

As leveduras *Brettanomyces/Dekkera* estão envolvidas na deterioração da cerveja e vinho, com a produção de compostos secundários (CHATONNET et al., 1992, 1995; DIAS et al., 2003; EDLIN et al., 1995). Estas leveduras produzem grandes concentrações de ácidos voláteis, compostos fenólicos, sendo o 4-etil-fenol, um éster que contribui na composição de sabor e aroma dos vinhos, o mais proeminente. Em baixas concentrações, estes compostos podem acrescentar complexidade ao vinho, porém, acima de 620 µg/L este metabólito é considerado prejudicial, e estas leveduras passam a desempenhar o papel de deteriorantes (CHATONNET, et al. 1995).

Os aromas característicos dos metabólitos produzidos são descritos como de plástico queimado, fumaça, suor de cavalo, couro, lã molhada e de rato (CHATONNET et al., 1992; HERESZTYN, 1986; IBEAS et al., 1996).

O gênero *Dekkera* apresenta, ao microscópio, células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais, podendo ser também cilíndricas ou alongadas. A reprodução vegetativa se dá por brotamento e exibe pseudomicélio. Na reprodução sexuada, os ascos são evanescentes e possuem um a quatro ascósporos, em formato de chapéu ou esférico com borda tangencial. Como características gerais podem ainda ser citadas: curta duração de vida em placas, aroma característico, forte produção de ácido acético a partir da glicose e exigência de fonte externa de vitaminas (BARNETT et al., 1990; KREGER VAN-RIJ, 1984).

Por serem oportunistas e apresentarem um caráter não competitivo, estes gêneros permitem que as demais leveduras atuem no processo fermentativo. Após esta

fase, entram lenta e progressivamente em atividade, causando sérios danos ao vinho. Devido ao seu metabolismo, estes microrganismos podem provocar aumento da acidez volátil e a formação do 4-etil-fenol no vinho (SILVA et al., 2005), levando à depreciação do produto final. A ação deteriorante dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces* é de efeito retardado (SILVA, 2003).

Os problemas que mais acometem os vinhos quando contaminados por essas leveduras são de fácil detecção, como a turvação e formação de névoa, a formação de filme e ainda, atenuação, visto que as leveduras selvagens podem crescer à custa de fontes de carbono que normalmente *S. cerevisiae* não utiliza, aumentando o teor etanólico e formando aromas indesejáveis (SILVA, 2003).

Embora os relatos sobre os efeitos da contaminação por leveduras *Dekkera/Brettanomyces* sejam predominantemente em vinhos, elas têm sido isoladas de outras fermentações. Silva (1994) documentou a ocorrência de uma severa contaminação por levedura selvagem no processo contínuo de produção de etanol industrial, demonstrando a não estabilidade do fermento inicial, o qual foi praticamente substituído por *Dekkera bruxellensis*. O poder competitivo dessa espécie em condições fermentativas foi de tal ordem que permitiu sua evolução populacional de aproximadamente 62% para 96% do número total de leveduras em 8 dias de operação.

Dentre as inúmeras espécies de leveduras existentes, aquelas da espécie *S. cerevisiae* são as mais usadas mundialmente quando se trata de processos fermentativos industriais. Sendo assim, suas aplicações nos processos de fermentação encontram-se bem estabelecidos. Porém outras espécies de leveduras têm sido identificadas na maioria destes processos fermentativos, ora agindo favoravelmente ao produto final, ora atuando como contaminante (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003).

Na produção do etanol combustível, a definição para a contaminação microbiana vem paralelamente ao rendimento e produtividade. O caldo da cana de açúcar é um substrato complexo, o qual permite o crescimento de diferentes leveduras e bactérias lácticas (SOUZA-LIBERAL et al., 2007).

No Brasil, o processo de fermentação para a produção de etanol combustível é uma atividade não estéril que usa caldo de cana como substrato com reciclo da

população da levedura fermentativa após centrifugação, durante todo o período da safra (WHEALS et al., 1999).

Durante a fermentação o fermento pode sofrer contaminação por outros microrganismos. Quando se trata de bactérias, a contaminação pode ser facilmente controlada utilizando-se agentes antibacterianos, como antibióticos. Já no caso das leveduras este controle fica mais difícil. As leveduras derivadas do gênero *Dekkera/Brettanomyces* são capazes de prejudicar o processo devido à produção significativa de ácido acético, que freqüentemente é considerado um inibidor de leveduras *S. cerevisiae*, levando a um decréscimo de viabilidade e atividade (DELIA et al., 2006). Além disso, a contaminação com estas leveduras implica numa mudança acentuada da população de levedura do mosto, causando prejuízo econômico, que pode vir a ser revertido, caso a contaminação seja detectada precocemente (SOUZA-LIBERAL, et al., 2005).

Leveduras *Dekkera/Brettanomyces* têm sido relatadas como responsáveis por vários episódios de contaminação em processos fermentativos em destilarias de países da América do Norte como Estados Unidos e Canadá (ABBOTT et al., 2005; GUERRA, 1998 apud OLIVA-NETO, 2004), além de destilarias da Europa (CIANI et al., 2003; MINIAC, 1989) e ainda em diversas destilarias estudadas por Basílio et al. (2005) na América do Sul, porém em poucos casos foi utilizado caldo de cana como substrato para fermentação.

Análises fisiológicas de isolados desta espécie mostraram que as leveduras do gênero *Brettanomyces* apresentam uma reduzida capacidade fermentativa em relação à levedura do processo *S. cerevisiae*. Estas características fazem com que destilarias contaminadas com estas leveduras apresentem tanto queda no rendimento de etanol quanto aumento no tempo de fermentação (ARAÚJO et al., 2005).

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido detectada como a principal levedura contaminante em diversos processos fermentativos, dentre eles o de produção de etanol combustível, apresentando uma surpreendente capacidade de crescimento e adaptação naqueles substratos. Apesar da grande importância desta levedura *Dekkera bruxellensis* como contaminante de vários processos fermentativos, pouco se sabe sobre suas características genéticas, e poucos trabalhos relatam a diversidade genética

desta levedura. Souza-Liberal et al. (2007) verificaram que a dinâmica de crescimento da população de *Dekkera/Brettanomyces* pode aumentar mais rapidamente que a de *S. cerevisiae* em sistemas contínuos industriais, pelo fato de possuir esta capacidade de se adaptar ao substrato. Normalmente não é o que ocorre com as leveduras *Dekkera/Brettanomyces*, visto que possuem taxa de crescimento mais lenta que a de *S. cerevisiae* quando ensaiada em meio rico e suplementado (ABBOTT et al., 2005; CIANI et al., 2003).

A exploração das leveduras *killer* como produtoras de micocinas capazes de combater a atividade dessas leveduras indesejáveis parece ser uma abordagem interessante. Comitini et al. (2004) descreveram duas toxinas de leveduras *killer* ativas contra *Dekkera/Brettanomyces*, isoladas de *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii*. O efeito fungicida exercido por essas leveduras foi estável por pelo menos 10 dias em vinho. No entanto, Tosta (2004), testando 4 linhagens de *Dekkera sp.* isoladas de processo fermentativo para produção de etanol, mostrou que nenhuma das 29 leveduras *killer* testadas teve atividade contra as linhagens de *Dekkera*.

Tradicionalmente, a identificação e caracterização de espécies de leveduras são baseadas em sua morfologia e em especial, em suas habilidades fisiológicas (BARNETT et al., 1990; KREGER VAN-RIJ, 1984). Estas características são fortemente influenciadas pelas condições da cultura e muitas vezes os resultados são ambíguos e demorados, podendo chegar a três ou quatro semanas (EGLI et al., 1999; GUILLAMÓN et al., 1997).

Em contraste, o desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação de leveduras tem reduzido substancialmente o tempo de identificação com a análise direta do DNA; desta forma a identificação não varia com o estado fisiológico do organismo (EGLI et al., 1999).

Além disso, estas técnicas de biologia molecular proporcionam métodos alternativos e complementares, que estão cada vez mais se consolidando como uma importante ferramenta para resolver problemas industriais (GUILLAMÓN et al., 1998).

Uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular é a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a qual foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis possibilitando um verdadeiro salto científico na área da biologia molecular, dada a sua rapidez,

versatilidade e sensibilidade. Atualmente esta técnica possui diversas derivações, como é o caso do Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

A PCR consiste basicamente em amplificar milhões de cópias de um determinado trecho do DNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A amplificação por PCR de seqüências específicas para identificação de organismos tem se tornado comum devido à relativa manipulação fácil e à alta reprodutibilidade (GUILLAMÓN et al., 1998).

Entre essas técnicas moleculares, aquelas baseadas na análise de polimorfismo do DNA que codifica os genes ribossomais (5S; 5,8S; 18S e 26S) e as regiões não codificadoras IGS (*Internal intergenic spacer*) e ITS (*Internal transcribed spacers*) (Figura 1), são úteis para a detecção de muitas espécies de leveduras e outros fungos (BALEIRAS-COUTO et al., 1996; FERNANDEZ-ESPINAR et al., 2000).

O interesse nessas técnicas vem do fato de que esses genes evoluíram mostrando um baixo polimorfismo intraespecífico e alta variabilidade interespecífica, possibilitando assim o agrupamento em gêneros e espécie.

A região ITS pode incluir o gene 5,8S do DNA ribossomal (Figura 2). Geralmente os fragmentos amplificados pelos *primers* ITS-1 e ITS-4 têm tamanho entre 450 e 550 bp para as leveduras do gênero *Brettanomyces*, enquanto a maioria das outras leveduras de uva ou específicas para vinhos varia entre 600 e 900bp (EGLI et al., 1999).

Souza-Liberal et al. (2005) desenvolveram um procedimento para monitorar contaminações na fermentação alcoólica através da amplificação da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do DNA ribossomal, dentro de um prazo de oito horas após amostragem.

Figura 1 – DNA ribossomal nuclear mostrando as unidades repetidas e os sítios de restrição para as enzimas. *Legenda:* SSU = subunidade menor; LSU = subunidade maior (FONTE: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

Figura 2 – *Primers* da região ITS. *Legenda:* SSU = subunidade menor; LSU = subunidade maior (FONTE: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

Atualmente a grande dificuldade na implantação do monitoramento microbiológico através das técnicas moleculares está relacionada ao grande custo do processo e à necessidade de mão-de-obra qualificada (GUIDI, 2000).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Isolamento e seleção de linhagens de leveduras

Inicialmente foram avaliadas cerca de 250 linhagens de leveduras da coleção de culturas (código CCA) do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), Centro de Ciências Agrárias, UFSCar – *campus* de Araras, que se encontram armazenadas em meio YEPD a temperatura ambiente, sob óleo mineral.

As culturas foram reativadas em placas com meio YEPD, a 30 °C, sendo a seguir avaliadas a capacidade de produção de ácido a partir da glicose (item 2.1), e a morfologia celular ao microscópio óptico. Alta produção de ácido e presença de células ogivais/elípticas são características de leveduras dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces* (KREGER-VAN RIJ, 1984).

Foram também isoladas linhagens de leveduras da fermentação etanólica (vinho) da Usina Santa Lúcia, Araras/SP, assim como do fermento para produção de cachaça orgânica, da unidade experimental do Laboratório de Alimentos Orgânicos (LAO), Centro de Ciências Agrárias, UFSCar – *campus* de Araras, crescidas em meio WLD e que apresentaram halo amarelo, característico de produção de ácido.

Para fins comparativos, foi adquirida uma linhagem da Fundação André Toselo, Campinas – SP, catalogada sob código CCT2621 (DSM70001) como *Dekkera bruxelensis*.

Após a etapa de seleção, foram estudadas as linhagens constantes da Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens de leveduras selecionadas

Sigla *	Isolamento	Origem
CCA053	Vinho	Destilaria São Marino
CCA059	Água de diluição	Destilaria São Marino
CCA077	Fermento	Destilaria Álcoazul
CCA155	Vinho	Destilaria São Marino
CCT2621	desconhecida	DSM 70001
IF3	Vinho	Usina Santa Lúcia
IF4	Vinho	Usina Santa Lúcia
IF5	Fermento	CCA
IF6	Fermento	CCA

* CCA – Centro de Ciências Agrárias – UFSCar; CCT – Centro de Culturas Tropicais; IF = Isolado da Fermentação

2.2.2 Caracterização bioquímica/fisiológica das leveduras

Foram utilizados testes tradicionais para identificação de leveduras como: produção de esporos sexuais, formação de pseudomicélio, macro e micromorfologia, produção de ácido e fermentação/assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, conforme Kreger van-Rij (1984) e Barnett et al. (1990).

2.2.2.1 Produção de ácido

Para avaliar a habilidade de produzir ácido a partir de glicose, as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura carbonato de cálcio. Trata-se de um meio opaco, que se torna translúcido devido à ação do ácido, nos casos em que a levedura o produz. Uma escala de 0 (zero) a 3 (três) para a estimativa da produção quantitativa de ácido foi usada, na qual 0 (zero) significa produção nula; 1(um), produção fraca com fina camada translúcida; 2 (dois), produção mediana com cerca de metade do volume do meio translúcido; e 3 (três), produção forte com o volume total do meio translúcido.

2.2.2.2 Formação de esporos sexuais

A formação de esporos sexuais foi testada em três diferentes meios de cultura, sendo eles o Gorodkova, YM e Acetato, conforme sugerido por Barnett et al. (1990).

Após as linhagens serem inoculadas, as placas foram incubadas a 25°C durante 3 semanas, verificando-se a presença de esporos semanalmente. Para melhor visualização dos esporos, utilizou-se a coloração de esporos pelo método de Vitz. As células de leveduras foram fixadas em lâminas de vidro e coradas com solução de verde malaquita, que em seguida foram aquecidas em bico de Bunsen por 60 segundos. As lâminas foram submetidas à lavagem em água corrente e posterior coloração com solução de safranina por 30 segundos, seguida de nova lavagem em água corrente, conforme Prada e Castro (1995).

As linhagens foram analisadas em microscópio, com aumento entre 40 a 400 vezes e fotodocumentadas com câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

2.2.2.3 Formação de pseudomicélio

Para a verificação da formação de pseudomicélio, utilizou-se a técnica de microcultivo em lâminas com meio CMA – *Corn Meal Agar* (Difco). O aparato foi montado em placas de Petri contendo um suporte em forma de “V” e algodão com água destilada estéril para manter a umidade do sistema. As lâminas foram recobertas com o meio *Corn Meal Agar* estéril e após a solidificação do meio, as linhagens foram inoculadas em três linhas paralelas e cobertas com uma lamínula estéril, conforme Prada e Castro (1995). As placas permaneceram na incubadora por 7 a 10 dias a 25 °C, sendo posteriormente avaliadas ao microscópio, com aumento de 400 vezes e fotografadas em câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

2.2.2.4 Crescimento em extrato de malte

Para verificar a morfologia das células, formação de sedimento e aroma, o meio extrato de malte foi disposto em alíquotas de 5 mL em tubos de ensaio e posteriormente inoculado com as leveduras. Os tubos foram mantidos durante 5 dias a 28 °C e após as verificações da morfologia das células em microscópio óptico (400x), formação de sedimento e aroma característico, os tubos permaneceram a temperatura ambiente por mais 10 dias quando foram submetidos às mesmas análises novamente, sendo que ao final da análise microscópica, foram fotodocumentadas em câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

2.2.2.5 Crescimento em ágar malte

Para verificar a morfologia das colônias e crescimento lento, as leveduras foram incubadas em meio ágar malte durante 6 semanas a temperatura ambiente.

2.2.2.6 Assimilação de compostos de carbono

As leveduras foram cultivadas em meio YEPD a 28 °C por 5-7 dias, em placas. Foi feita uma suspensão celular em tubo de ensaio contendo 3 mL de água destilada estéril até densidade 2 pelo cartão de Wickerham, conforme procedimento adotado por Prada e Castro (1995).

O cartão de Wickerham é composto de três linhas pretas que servem de referência na estimativa da concentração celular da suspensão de células (Figura 3). A avaliação foi realizada de forma comparativa em uma escala de 0 a 3, onde 0 (zero) significa poucas células, com linhas pretas totalmente visíveis; 1 (um) significa densidade fraca, com linhas visíveis, porém embaçadas; 2 (dois) é igual à densidade média, com linhas embaçadas e difusas e, finalmente, 3 (três) significa densidade forte, onde não se podem ver as linhas pretas.

Figura 3 - Cartão de Wickerham. Escala de avaliação da concentração celular utilizada como inóculo nos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, onde: 0 = poucas células, 1 = densidade fraca, 2 = densidade média e 3 = densidade forte
FONTE: TOSTA (2004)

Para os testes de assimilação das diferentes fontes de carbono, foram preparadas soluções de etanol a 3% (v/v), d-rafinose a 10% (p/v), sacarose, d-galactose, d-xilose, d-celobiose, d-manitol, melibiose, d-glicose, maltose, ácido

succínico, ácido láctico, ácido cítrico, arabinose e inositol a 5% (p/v). Estas soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μ m de porosidade (KREGER VAN-RJI, 1984).

Para a montagem dos testes, foram adicionados aos tubos de ensaio, 2 mL de água destilada estéril, 0,25 mL do meio YNB – Yeast Nitrogen Base e 0,25 mL da solução estoque a ser testada como fonte de carbono. Os tubos foram inoculados com 50 μ L da suspensão de células com densidade 2 pelo cartão de Wickerham. Os tubos inoculados permaneceram na incubadora a 28 °C por 21 dias, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram densidade 2 ou 3, conforme avaliação com cartão de Wickerham.

2.2.2.7 Assimilação de compostos de nitrogênio

O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 2.2.2.6.

Para os testes de assimilação das diferentes fontes de nitrogênio, soluções de etilamina 0,64 % (v/v), lisina 0,56 % (p/v) e nitrato de potássio 0,78 % (p/v) foram utilizadas, após esterilização por filtração em membrana de 0,22 μ m de porosidade.

Foram adicionados aos tubos de ensaio, 2 mL de água destilada estéril, 0,25 mL do meio YCB - Yeast Carbon Base e 0,25 mL da solução estoque da fonte de nitrogênio. Estes tubos foram inoculados com 50 μ L de suspensão de células com densidade 2 através do cartão de Wickerham, conforme Prada e Castro (1995) e posteriormente incubados a 28 °C por 21 dias, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram densidade 2 ou 3 conforme avaliação com cartão de Wickerham.

2.2.2.8 Crescimento a 37 °C

Para o teste de crescimento a 37 °C, as linhagens foram inoculadas em meio MYPG e levadas a incubadora nesta temperatura por 5 – 7 dias.

2.2.2.9 Crescimento a 50 % glicose-ágar extrato de levedura

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio 50 % (p/p) glicose-ágar extrato de levedura, incubando-se a 25 °C durante 5 dias, e verificando-se a seguir se houve ou não crescimento da levedura neste meio.

2.2.2.10 Fermentação

Para o teste de fermentação, 5 mL de meio basal foram transferidos para tubos contendo tubos de Durham invertidos, sendo então autoclavados. O teste foi preparado adicionando-se ao tubo de ensaio 2,5 mL da solução fonte de carbono 6 % (glicose e galactose), previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ m de porosidade e inoculando-se 0,25 mL de suspensão de células com densidade 3, conforme o cartão de Wickerham. Os tubos foram incubados a 28 °C por 21 dias, sendo a leitura realizada observando-se a formação de gás contido no tubo de Durham. Os tubos com formação de gás foram considerados positivos para a fermentação da fonte em questão.

Para fazer a suspensão de células, utilizou-se células crescidas em YM ou ágar extrato de malte por 48 horas, transferindo a seguir para tubos contendo 4,5 mL de água destilada estéril.

2.2.3 Caracterização molecular

A caracterização molecular das leveduras foi feita por PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossomal incluindo o gene 5,8S, e pelo sequenciamento da referida região.

2.2.3.1 Obtenção do DNA genômico

Para obtenção do DNA genômico foi realizada uma adaptação do método executado por Gomes (1995). As linhagens foram incubadas sob agitação por 15 horas, a 30 °C, em 50 mL de meio YEPD líquido, sendo o material centrifugado a 4.000 G por 5 minutos em tubos falcon de 50 mL, e o sobrenadante descartado. A massa celular obtida foi transferida para um almofariz previamente esterilizado, onde foi adicionado aproximadamente 30 mL de nitrogênio líquido, sendo o material macerado com o auxílio de um pistilo, também estéril. Tanto o almofariz como o pistilo foram mantidos em gelo para evitar a rápida evaporação do nitrogênio líquido pelo aquecimento.

No próprio almofariz foram adicionados 3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8. Um volume de 1.200 μ L foram transferidos para dois tubos *ependorf* de 1,5 mL (600 μ L em cada) e adicionado de 75 μ L de solução SDS 10% mais 60 μ L de β -

mercaptoetanol (Sigma), sendo os tubos agitados lentamente até a solução tornar-se viscosa.

Para executar a desproteinização do material, adicionou-se o mesmo volume (735 μL) de clorofane aos tubos, os quais foram agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12.000 G por mais 10 minutos.

Após a centrifugação, a parte superior da solução foi transferida para novo tubo *ependorf* com o auxílio de uma micropipeta de 100 μL , sendo a parte inferior descartada. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo que na última repetição o clorofane foi substituído pela solução CIA.

Após a desproteinização, procedeu-se a precipitação dos ácidos nucleicos adicionando-se 5% do volume de acetato de sódio 3M e o dobro do volume de etanol absoluto resfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os tubos foram levados ao *freezer* também a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ onde permaneceram por 10 minutos, sendo então submetidos à centrifugação de 12.000 G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente evitando-se dispensar o *pellet* de ácidos nucleicos formado no fundo do tubo. Os tubos foram invertidos e deixados em temperatura ambiente para total evaporação do etanol remanescente.

O material foi então ressuspensionado em 400 μL de tampão TE 1X. A este material foram adicionados 15 μL de solução de RNase (10 mg/mL), incubando-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, para degradação do RNA.

Adicionou-se aos tubos o dobro do volume da solução CIA, sendo os mesmos agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12.000 G por mais 10 minutos. A porção superior foi então transferida para novo tubo *ependorf* com o auxílio de uma micropipeta de 100 μL .

Para nova separação dos ácidos nucleicos, repetiu-se o procedimento citado anteriormente, utilizando-se 5 % do volume de acetato de sódio 3 M e o dobro do volume de etanol absoluto resfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os tubos foram levados ao *freezer*, onde permaneceram por 10 minutos para a precipitação do DNA, sendo então submetidos à centrifugação de 12.000 G por 5 minutos, lavados com 50 μL de etanol 70 % e invertidos para a evaporação do etanol. O DNA foi então ressuspensionado em 50 μL de tampão TE 1X e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para estimativa da presença, quantidade e integridade do DNA, 2 μ L de amostra foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) em tampão TBE 1X, sendo o gel submetido a uma voltagem de 2,24 Volts/cm e corrente de 90 mA por 3 horas (fonte EPS301 - *Amersham biotech.*). A estimativa de concentração foi realizada comparativamente com a espessura e intensidade das bandas do marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen). O gel foi corado então com solução de brometo de etídio 0,3 ng/ μ L sendo a visualização do DNA feita em transiluminador de luz UV. As imagens foram fotodocumentadas em câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

Utilizou-se também o protocolo proposto por Vancetto et al. (2006), o qual consiste na lise celular por choque térmico.

Uma alçada da colônia de cada linhagem foi transferida para 10 mL de meio YEPD, onde permaneceu *overnight*, a 30 °C a 160 rpm. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 6 minutos, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 10 mL de água Milli-Q estéril, homogeneizou-se e transferiu-se 1,5 mL para um *eppendorf*. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão de extração (TE).

Deu-se início a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido (-196 °C) e bloco de aquecimento a 65 °C.

Para a desproteinização do material, adicionou-se 200 μ L de clorofane e agitou-se por 8 minutos. O tampão TE 1x foi acrescentado no volume de 200 μ L, o tubo agitado por 30 segundos e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo *eppendorf*.

Novamente adicionou-se 200 μ L de clorofane; agitou-se por 30 segundos e transferiu-se o sobrenadante para um novo *eppendorf*. Repetiu-se mais uma vez este procedimento, adicionando-se 500 μ L de CIA, agitando-se por 30 segundos e centrifugando-se o tubo a 13000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo *eppendorf* e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto gelado, o qual foi centrifugado a 13000 rpm por 3 minutos.

O material permaneceu estocado no *freezer overnight* e foi centrifugado a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspendido em 400 μ L de TE 1x.

Adicionou-se 3 μ L de RNase (10 mg/mL) para que ocorresse a degradação do RNA e incubou-se a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, acrescentou-se 10 μ L de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol gelado para que os ácidos nucléicos fossem precipitados. Agitou-se gentilmente e armazenou-se em *freezer* por 30 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm por 3 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* de ácido nucléico formado no fundo do tubo com etanol 70 %. Deixou-se secar por 5 minutos e o material foi ressuspendido em 50 μ L de TE 1x e armazenado em freezer a -20 °C.

A estimativa da presença, quantidade e integridade do DNA foram realizadas conforme descrito acima.

2.2.3.2 PCR

As leveduras foram caracterizadas por PCR utilizando-se os *primers* ITS-1 e ITS-4 (Tabela 2) para amplificação da região ITS do DNA ribossomal (WHITE et al., 1994), através de PCR colônia.

Tabela 2 - *Primers* (Invitrogen) utilizados nas reações PCR

Nome	Seqüência 5' → 3'	Orientação
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Forward
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse
pB2	AGAGTGAGGGGATAATGATTTAAGG	Forward

A reação de amplificação foi realizada em um volume de 20 μ L, contendo 2 μ L de tampão 10x, 0,6 μ L de cloreto de magnésio 50 mM, 1,6 μ L de cada dNTP 2,5 mM, 1 μ L de cada *primer* 100 μ M, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L), 8,8 μ L de água Milli-Q e aproximadamente 0,25 μ L de células crescidas recentemente, retiradas com o auxílio de um palito estéril.

Foi utilizado o termociclador modelo Primus 96 Plus (MWGAG *Biotech*) programado para um ciclo de 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, seguidos de 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos PCR obtidos (20 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v) dissolvida em tampão TBE 1X. O gel foi submetido a uma voltagem de 2,24 Volts/cm e corrente de 120 mA, por 90 minutos (fonte EPS301 – *Amersham Biotech*). O gel foi corado com solução de brometo de etídio 0,3 ng/µL sendo a visualização do DNA feita em transiluminador de luz UV e as imagens registradas em câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

Foi também realizada PCR com os *primers* pB2 e ITS-4 (Tabela 2) para amplificação de fragmento da região ITS de leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis* (EGLI; HENICK-KLING, 2001).

A reação de amplificação foi realizada em um volume de 100 µL, contendo 10 µL de tampão 10x, 3 µL de cloreto de magnésio 50 mM, 8 µL de cada dNTP 2,5 mM, 1 µL de cada *primer* 100 µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 1 µL de DNA genômico (100 ng) ou de produto PCR purificado e 51,75 µL de água Milli-Q.

Foi utilizado o termociclador modelo Primus 96 Plus (MWGAG *Biotech*) para a amplificação do DNA, com o programa de um ciclo de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, 55 a 65 °C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, seguidos de 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v) dissolvida em tampão TBE 1X, conforme descrito anteriormente.

2.2.3.3 Purificação de produto PCR

Para a purificação do produto PCR, foi realizado PCR colônia em triplicata, obtendo-se 60 µL de produto final e em seguida este volume foi utilizado no *kit* de purificação “DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Health Care).

Os produtos PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % (p/v) dissolvida em tampão TBE 1X, conforme descrito anteriormente.

2.2.3.4 Sequenciamento da região ITS do rDNA

O produto PCR purificado foi enviado ao IAC – Cordeirópolis/SP para sequenciamento da região ITS. A PCR utilizada constituiu-se de 2-3 µL do produto PCR, 0,5 µL do *primer* ITS-1 ou ITS-4 (5 pmoles/ µL), 0,4 µL do *kit* Big Dye Terminator (*Applied Biosystems*), 2 µL do tampão SM e água Milli-Q para completar 10 µL. O programa constituiu-se de 1 ciclo de 96 °C por 2 minutos; 25 ciclos de 45 segundos a 96 °C, 30 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C. Após a reação, o produto foi estocado sob refrigeração a 4 °C. Para precipitação, utilizou-se 80 µL de isopropanol 65 %, agitando-se suavemente e deixando em repouso na bancada por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 3000 rpm por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e a placa invertida por 1 minuto em papel absorvente para secagem. Foram adicionados 200 µL de etanol 60 %, centrifugando-se a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, procedeu-se a secagem e lavagem novamente. Em seguida, foi aplicado um pulso de centrifugação, deixando a placa secando na bancada ou fluxo laminar por 1 hora. Ressuspendeu-se em 10 µL de Hi-Di Formamida, procedendo-se a seguir a desnaturação da solução com DNA a 95 °C por 5 minutos, imediatamente imersa em gelo até o momento do sequenciamento, realizado em seqüenciado automático ABI3730 (*Applied Biosystems*).

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>).

2.2.4 Ensaio *killer*

As leveduras selecionadas foram avaliadas quanto à sensibilidade às toxinas *killer* produzidas por 15 linhagens do banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar – campus de Araras/SP (Tabela 3) com a finalidade de se obter o perfil *killer*.

Tabela 3 - Linhagens de leveduras com atividade *killer* utilizadas nos testes de sensibilidade contra as linhagens de leveduras selecionadas

Sigla *	Isolamento ou Características	Obtenção ou código ¹	Identificação ²
CCA008	desconhecida	YGSC-EUA	<i>S. cerevisiae</i>
CCA015	Fermentação	KD1-Fermentec	<i>S. cerevisiae</i>
CCA194	Padrão K4	NCYC388/CCT2369	<i>Candida glabrata</i>
CCA199	Padrão K8	NCYC435/CCT4373	<i>Hansenula anomala</i>
CCA231	desconhecida	Planalsucar	<i>S. cerevisiae</i>
CCA369	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA417	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA418	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA432	Melaço	Usina Santa Lucia	nd
CCA437	Melaço	Usina Santa Lucia	nd
CCA452	Mosto	Usina Santa Lucia	nd
CCA499	Vinho	Usina Santa Lucia	nd
CCA510	Vinho	Usina Santa Lucia	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
CCA542	Fermento	Usina São João	nd
CCA584	Mosto	Usina São João	nd

* CCA = Centro de Ciências Agrárias; ¹ NCYC = National Culture Yeast Collection; YGSC = Yeast Genetic Stock Cultures; CCT = Coleção de Culturas Tropicais; ATCC = American Type Culture Collection;

² nd: não determinada

Os testes de sensibilidade foram realizados em meio YEPD-azul de metileno, espalhando-se 0,1 mL de suspensão celular com o auxílio de uma alça de Drigalski. As linhagens produtoras de toxina *killer* foram inoculadas em pontos, utilizando-se palitos estéreis, sendo as placas levadas para incubadora a 25 °C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

A sensibilidade foi evidenciada pela presença de um halo de inibição ao redor da colônia da levedura *killer*, assim como pela formação de um círculo azul, formado por células mortas coradas pelo azul de metileno, ou seja, as linhagens que sofreram inibição do crescimento pela toxina foram consideradas positivas para a sensibilidade à mesma, mesmo que os halos tenham sido pequenos. Em caso de discrepância nos resultados das triplicatas, para cada levedura foram considerados os resultados com maior ocorrência.

As linhagens foram também avaliadas quanto à sua capacidade em expressar a atividade *killer* diante das linhagens sensíveis CCA003 (*S. cerevisiae*, NCYC1006) e

CCA039 (*Torulopsis glabrata*, ATCC15126), em meio YEPD-azul de metileno, espalhando-se 0,1 mL de suspensão celular das linhagens sensíveis e inoculando as linhagens selecionadas em pontos, utilizando-se palitos estéreis. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 7 dias e os testes foram realizados em triplicata.

2.2.5 Ensaios fermentativos

2.2.5.1 Material biológico

Foram utilizadas a linhagem *S. cerevisiae* CCA193 (PE-02, NCYC3233), isolada de processo fermentativo da Usina da Pedra, Serrana/SP (gentilmente cedida pela Fermentec – Piracicaba/SP), e a linhagem de *Dekkera bruxellensis* CCA059, isolada de água de diluição da Destilaria São Marino, Pirassununga/SP.

A partir destas culturas foram feitas repicagens em placas de Petri e tubos com meio YEPD, sendo mantidos a 4 °C.

2.2.5.2 Meios de cultura

Foi utilizado caldo de cana-de-açúcar obtido através de doação da Usina São João, localizada no município de Araras/SP, safra 2007/2008. O caldo clarificado da usina foi submetido à diluição prévia com água destilada a fim de se obter as concentrações desejadas de 4 e 12 °Brix e acrescido de solução de sais.

2.2.5.3 Propagação de células para obtenção do inóculo

O inóculo foi preparado em duas fases de cultivos sucessivos para cada levedura separadamente. Na primeira fase, a de pré-inóculo, transferiu-se a levedura para uma placa de Petri com meio de reativação YEPD e incubou-se a 30 °C por 48 horas. Na segunda fase, para obtenção do inóculo, foram transferidas duas alçadas do crescimento celular da placa de Petri para um tubo de ensaio contendo 20 mL de solução salina 0,85 %. Após homogeneização, transferiu-se 1 mL dessa suspensão para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio de multiplicação, mantendo-o em incubadora a 30 °C, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas. A massa celular obtida foi separada por centrifugação a uma rotação de 3400 rpm, durante 5 minutos.

As células oriundas da centrifugação foram incubadas novamente num novo meio de multiplicação e submetidas às mesmas condições de crescimento. Após centrifugação, a massa celular foi avaliada quanto ao número de células de leveduras/mL e convenientemente diluída para um volume de 40 mL com o meio de fermentação, conforme os tratamentos abaixo descritos.

2.2.5.4 Testes fermentativos

Os testes fermentativos foram realizados em condições de semi-aerobiose em Erlenmeyers de 500 mL (tamponados com algodão) com 160 mL de meio de fermentação acrescido de 40 mL do inóculo previamente preparado e diluído de forma a se obter números finais de células nos Erlenmeyers dos testes fermentativos, conforme os tratamentos a seguir:

F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*;

F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*;

F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*;

F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*;

F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*.

Os ensaios foram realizados em triplicata, mantidos em estufa a 30 °C durante 14 ciclos de 12 horas cada. Ao término de cada ciclo, coletou-se 2 mL do caldo fermentado para plaqueamento em meios WLN e/ou WLD e contagem de células em microscópio. O caldo fermentado foi centrifugado a 3400 rpm por 5 minutos, sendo a biomassa ressuspensa em 20 mL de solução salina a fim de se proceder a lavagem das células, e posteriormente foi centrifugada a 3400 rpm durante 5 minutos. A seguir, a biomassa foi ressuspensa em meio de fermentação, iniciando-se o segundo ciclo de fermentação, e assim sucessivamente até o último ciclo. Após a centrifugação, foram coletados 10 mL do sobrenadante para análises de pH e °Brix, 10 mL para análise de etanol e 15 mL para análise de açúcares redutores totais (ART).

2.2.5.4.1 Plaqueamento em meios WLN e WLD

As amostras de 2 mL coletadas ao final de cada ciclo, antes da centrifugação, foram convenientemente diluídas em tubos com solução salina, sendo espalhados 100 µL de cada diluição em meio WLN (de 5 tratamentos de fermentação) e meio WLD (de 4 tratamentos de fermentação, quando a linhagem *D. bruxellensis* estava presente). As placas com WLN foram incubadas a 30 °C por 48 horas e aquelas com WLD, por 7 dias a 30 °C. A seguir, foram contadas as colônias e os resultados expressos em UFC/mL.

Foram utilizadas diluições variando de 10^{-3} a 10^{-11} para os plaqueamentos em WLN, e direto (sem diluição) a 10^{-4} para os plaqueamentos em WLD, sempre utilizando no mínimo 3 diluições e em duplicata.

2.2.5.4.2 Contagem e viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através da contagem das células em microscópio utilizando-se câmara de Neubauer, com solução de azul de metileno - citrato de sódio como corante, segundo Lee et al. (1981). O cálculo da viabilidade foi feito da seguinte forma:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas}}{\text{n}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{n}^{\circ} \text{ células mortas}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.5.4.3 pH

O pH foi obtido com o auxílio de um pH-metro digital (Corning).

2.2.5.4.4 °Brix

O valor de Brix (°) foi obtido utilizando-se um refratômetro de campo.

2.2.5.4.5 Açúcares redutores totais (ART)

A quantidade de ART foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (ADNS), conforme Martelli e Panek (1968), no qual alíquotas de 10 mL das amostras previamente diluídas (quando necessário) foram colocadas em balão volumétrico de 100 mL, acrescido de 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2N para se obter hidrólise ácida através de aquecimento em banho-maria em temperatura de ebulição durante 5 minutos. Resfriou-se em água com gelo e adicionou-se 2,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N. Completou-se o volume do balão com água destilada e em seguida 1 mL da solução foi transferida para tubos de ensaio contendo 1 mL da solução estoque do reagente ADNS. Após homogeneização, os tubos foram aquecidos por 5 minutos em banho-maria em temperatura de ebulição e posteriormente resfriados em água corrente. Completou-se o volume para 10 mL com água destilada, homogeneizou-se 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 a 70 °C durante 2 horas e resfriada em dessecador de sílica gel, transferindo-a para um balão volumétrico de 200 mL e 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 para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume também com água destilada. Cada mL dessas soluções, considerando-se a diluição, possuíam, respectivamente, 0,012; 0,024; 0,036; 0,048; 0,060; 0,072; 0,084; 0,096; 0,108; 0,120 mg de glicose. Para a leitura da absorbância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorbância, efetuou-se a regressão linear e a correlação (R^2) entre tais valores (Figura 4).

Figura 4 - Curva padrão de glicose obtida através do método ADNS.

Para o cálculo do ART, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{ART (mg/mL)} = \frac{A_{540 \text{ nm}} + 0,0433 \times \text{diluição amostra}}{8,15} \quad (2)$$

2.2.5.4.6 Teor alcoólico

Para 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.

2.2.5.4.7 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:

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \frac{\text{Etanol} / (\text{ART}_{\text{inicial}} - \text{ART}_{\text{final}})}{0,511} \times 100 \quad (3)$$

Foram utilizados os dados de etanol, ART inicial e ART final em g/100 mL, para cada ciclo de cada fermentação, calculando-se ao final, a eficiência fermentativa média (dos 14 ciclos) para cada tratamento de fermentação.

2.2.6 Meios e soluções utilizados para cultivos e ensaios

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.

CIA

Solução obtida da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente.

Clorofane

Solução obtida da mistura de fenol saturado, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente.

Meio 50 % glicose – ágar extrato de levedura

Composto de 50 % (p/p) glicose e extrato de levedura dissolvidos em água destilada e acrescido de ágar 1,5 % (p/v).

Meio Acetato

Composto de acetato de sódio 0,4 % (p/v) dissolvido em água destilada, pH ajustado entre 6,5-7,0 e adicionado de 1,5 % de ágar (p/v), dissolvidos em água destilada.

Meio Basal

Composto de extrato de levedura 0,45 % (p/v) e peptona 0,75 % (p/v). Os reagentes foram dissolvidos em água destilada acrescentando-se o corante azul de bromotimol até coloração verde-garrafa.

Meio Carbonato de Cálcio

Dissolveu-se extrato de levedura 0,5 % (p/v), carbonato de cálcio 0,5 % (p/v), glicose 5 % (p/v) e ágar 2 % (p/v) em água destilada.

Meio Corn Meal Ágar

Dissolveu-se 1,7 g de meio Corn Meal Agar (Difco) em 80 mL de água destilada aquecida, completando-se o volume para 100 mL.

Meio de fermentação

Caldo de cana clarificado 12 °Brix, acrescido de 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado a 4,3.

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 Gorodkova

Composto de 0,1 % de d-glicose (p/v), 1 % de peptona (p/v), 0,5 % de cloreto de sódio (p/v), e 2 % de ágar (p/v), dissolvidos em água destilada.

Meio MYPG para ativação das leveduras

Composto de 0,3 % de extrato de malte (p/v), 0,3 % de extrato de levedura (p/v), 0,8 % de peptona (p/v), 1,0 % de glicose (p/v) e 2 % de ágar (p/v) dissolvidos em água destilada.

Meio Yeast Nitrogen Base

Dissolveu-se 6,7 g de Yeast Nitrogen Base – YNB (Difco) em 60 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

Meio Yeast Carbon Base

Dissolveu-se 11,7 g de Yeast Carbon Base – YCB (Difco) em 60 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

Meio YEPD

Composto de 1 % de extrato de levedura (p/v), 2 % de peptona (p/v), 2 % de glicose (p/v) e 2 % de ágar (p/v) dissolvidos em água destilada.

Meio YEPD-azul de metileno para testes de atividade *killer*

Tamponou-se uma solução de ácido cítrico 2 % (p/v) com solução de fosfato hidrogenado de potássio (K_2HPO_4) 7 % (p/v) até pH 4,3. Adicionou-se 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose. Calculou-se um volume de água destilada igual a 2 % do volume total obtido para dissolver 20 g/L de ágar, o qual foi autoclavado. Após a autoclavagem a solução de nutrientes tamponada foi misturada com o ágar ainda quente e adicionou-se 2 mL/L de solução de azul de metileno (1,5 %). O pH permaneceu entre 4,5 e 4,7.

Meio YM

Composto de 0,3 % de extrato de malte (p/v), 0,3 % de extrato de levedura (p/v), 0,5 % de peptona, 1 % de d-glicose (p/v) e 2 % de ágar (p/v), dissolvidos em água destilada.

Meio WLN

Foram dissolvidos 80g do meio WL Nutrient Medium (Acumedia[®]) em 1000 mL de água destilada. Adicionou-se 1 mL de suspensão de ácido nalidíxico (Wintomylon, Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda) e 1 mL de ampicilina (0,005 ppm).

Meio WLD

Acrescentou-se 1 mL de uma solução 2 % de actidione para cada litro de meio WLN esterilizado e liquefeito, em temperatura ao redor de 55 °C (concentração final de 20 ppm de actidione).

RNAse

Esta solução foi preparada misturando-se 10 mg/mL de RNAse pancreática (RNAse A) em solução de Tris-HCl pH 7,5 e NaCl 15 mM. A solução foi aquecida a 98 °C por 15 minutos e estocada a -20 °C.

SDS 10 %

Pesou-se 10 g de SDS e dissolveu-se em 80 mL de água Milli-Q aquecida. Após resfriamento, completou-se o volume para 100 mL. Esta solução não foi esterilizada.

Solução de azul de metileno

Para o preparo desta solução dissolveu-se 1,5 g do corante azul de metileno em 100 mL de água destilada estéril.

Solução azul de metileno com citrato de sódio

Dissolveu-se 0,01 g de azul de metileno e 2,0 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Solução de safranina 0,5 %

Dissolveu-se 0,5 g de safranina em 50 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

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 salina

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

Solução de verde-malaquita 5 %

Dissolveu-se 5 g de corante verde-malaquita em 50 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

Tampão TBE 10X

Dissolveu-se 108 g de Trizma base e 55g de ácido bórico em 400 mL de EDTA 0,5M pH 8,0, sendo o volume completado para 1000mL com água Milli-Q e submetido a autoclavagem.

Tampão TE (Tris-EDTA) 10X

Misturou-se 10 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5 com 2 mL de EDTA 0,5 M, completando-se o volume com água Milli-Q para 1000 mL.

Tampão SM

Composto de 2,5 μ L de cloreto de magnésio 2 M, 200 μ L Tris-HCl 1 M pH 9,0, completando-se para 1 mL com água Milli-Q estéril.

Tris-HCl 1M pH 8

Dissolveu-se 121,10 g de Trizma-base em 800 ml de água Milli-Q, ajustando-se o pH para 8,0 com HCl e completando-se o volume para 1000 mL com água Milli-Q. Para concentrações menores, diluiu-se esta solução convenientemente em água Milli-Q estéril.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Identificação e caracterização das linhagens de leveduras

Das linhagens testadas da coleção de culturas do LAMAM, CCA-UFSCar, *campus* Araras, foram selecionadas 4 cepas (CCA053, CCA059, CCA077 e CCA155) que apresentaram produção significativa de ácido a partir da glicose, ou seja, intensidade 2 ou 3, e morfologia característica dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces*, cujas células apresentam-se freqüentemente ogivais (KREGER VAN-RJI, 1984). Estes critérios foram também utilizados para selecionar 4 linhagens de leveduras isoladas de meio WLD, a partir de amostras do vinho da Usina Santa Lúcia (IF3 e IF4) e do fermento utilizado para produção de cachaça orgânica (IF5 e IF6).

Desta forma, nove linhagens (incluindo a cepa CCT2621) foram utilizadas nos testes de identificação e caracterização das leveduras, incluindo testes taxonômicos clássicos e moleculares.

Os resultados da produção de ácido, formação de esporos, produção de pseudomicélio, crescimento a 37 °C, fermentação da glicose e galactose e crescimento em meio 50% glicose-ágar extrato de levedura encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização morfo-fisiológica das linhagens de leveduras selecionadas

Linhagem *	Crescimento a 37 °C	Fermentação da glicose	Fermentação da galactose	Produção de esporos	Produção de pseudomicélio	Produção de ácido	Crescimento em 50% glicose-ágar extrato de levedura
CCA022**	+	+	-	+	+	1	+
CCA053	+	+	+	-	+	2	-
CCA059	+	+	+	+	+	3	-
CCA077	+	+	+	+	+	3	-
CCA155	+	+	+	+	+	3	-
CCT2621	+	+	-	-	+	1	-
IF3	+	+	+	+	+	2	-
IF4	+	+	-	+	+	2	-
IF5	+	nd	nd	nd	+	2	-
IF6	+	nd	nd	nd	+	2	-

Legenda: (+): positivo (-): negativo nd: não determinado Intensidade: (0) = nula, (1) = fraca, (2) = média e (3) = forte * CCA – Centro de Ciências Agrárias – UFSCar; CCT – Centro de Culturas Tropicais; IF = Isolado da Fermentação; ** linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

A produção de ácido a partir da glicose variou quanto à intensidade, mas foi considerada positiva para todas as leveduras selecionadas, uma vez que todas as leveduras de interesse apresentaram intensidade de produção maior ou igual a 2. (Tabela 4, Figura 5). A linhagem CCA022 (*Saccharomyces cerevisiae*) foi utilizada como controle negativo, pois apresenta baixa produção de ácido. No entanto, a linhagem CCT2621, catalogada como *D. bruxellensis*, apresentou fraca produção de ácido a partir da glicose, característica marcante de leveduras dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces* (KREGER-VAN RIJ, 1984).

Figura 5 - Teste de produção de ácido por 7-10 dias, a 30 °C a partir da glicose em meio carbonato de cálcio pelas linhagens de leveduras. Os números em parênteses, após os códigos das culturas, referem-se à intensidade de produção de ácido, conforme Tabela 4

Em meio ágar malte, as colônias variaram quanto à cor, apresentando-se em tons creme à marrom claro e ocasionalmente uma coloração alaranjada. Tanto em ágar malte como em caldo extrato de malte o crescimento foi bastante lento. No caldo extrato de malte foi possível também observar a presença de células filamentosas, células freqüentemente ogivais ou elípticas e ocasionalmente esféricas (Figura 6). Após 10 dias de incubação a temperatura ambiente, observou-se formação de aromas característicos e o sedimento precipitado passou a ter aspecto mucóide.

A produção de pseudomicélio foi avaliada através de microcultivo em CMA – *Corn Meal Agar* (Figura 7), sendo que todas as linhagens testadas apresentaram produção de pseudomicélio.

Quanto à fermentação da glicose e galactose, todas as espécies de *Dekkera* fermentam a primeira enquanto que em relação à galactose, a fermentação é variável entre as espécies. Sendo assim, são consideradas *D. intermedia* aquelas que fermentam a galactose e *D. bruxellensis* aquelas que não fermentam a galactose (BARNETT et al., 1990).

Os resultados mostraram que as linhagens IF4 e CCT2621 não fermentam a galactose, enquanto as demais fermentam. No caso da glicose, todas apresentaram capacidade fermentativa (Tabela 4).

A produção de esporos sexuais foi avaliada em três diferentes meios (YM, Acetato e Gorodkova), e com exceção das linhagens CCA053 e CCT2621, foram observados esporos sexuais (ascósporos) em número de 1-2 por asco, conforme Figura 8.

Figura 6 - Morfologia celular das linhagens de leveduras em meio extrato de malte, por 7 dias, a 30 °C. As setas apontam a presença de células filamentosas. CCA022 é uma linhagem de *S. cerevisiae*

Figura 7 - Produção de pseudomicélio em meio CMA – *Corn Meal Agar*, pelas linhagens de leveduras selecionadas, em microcultivo, a 25 °C. CCA022 é uma linhagem de *S. cerevisiae*

Figura 8 - Formação de esporos sexuais pelas linhagens de leveduras em três diferentes meios de cultura (Acetato, YM e Gorodkowa). As setas apontam a presença do esporo corado em verde pelo método de Vitz

Quanto ao crescimento a 37 °C (Tabela 4), observa-se que todas as leveduras crescem a esta temperatura. O mesmo não ocorre quando se trata do meio de cultura composto por 50 % glicose-ágar extrato de levedura. Estes resultados corroboram a descrição de Kreger-van Rij (1984) para leveduras dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces*.

Os resultados obtidos nos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio podem ser observados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Testes de assimilação de fontes de carbono pelas linhagens de leveduras

Linhagem *	Fonte de carbono														
	Sacarose	Rafinose	Galactose	Xilose	Arabinose	Celobiose	Manitol	Melibiose	Glicose	Etanol	Maltose	Ac. Lático	Ac. Cítrico	Ac. Succínico	Inositol
CCA022 **	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CCA053	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
CCA059	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
CCA077	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
CCA155	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
CCT2621	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
IF3	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
IF4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
IF5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IF6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Legenda: nd: não determinado * CCA – Centro de Ciências Agrárias – UFSCar; CCT – Centro de Culturas Tropicais; IF = Isolado da Fermentação; ** linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

Segundo Barnett et al. (1990), as leveduras que não assimilam a celobiose são consideradas *D. bruxellensis* e as que assimilam celobiose são consideradas *D. intermedia*. Estes autores consideram as espécies *D. bruxellensis* e *D. intermedia* como duas espécies distintas, ao contrário de outros (EGLI; HENICK-KLING, 2001) que consideram as espécies como sinônimas. Em vista disto, a análise dos resultados não permite uma conclusão definitiva sobre a identificação das linhagens destas leveduras quanto à espécie, pois seus comportamentos diante da assimilação de compostos de carbono são muito variáveis.

Quanto à assimilação de fontes de nitrogênio (Tabela 6), os resultados obtidos atendem à descrição das leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces*, conforme Kreger-van Rij (1984). É esta característica distintiva que as leveduras *Dekkera/Brettanomyces* possuem que permite o isolamento destas linhagens em meios seletivos, como o meio ágar lisina. Em processos fermentativos onde *S. cerevisiae* é predominante em número, o isolamento destas leveduras contaminantes é possível no meio citado, uma vez que o desenvolvimento de *S. cerevisiae* é prejudicado devido à

incapacidade de assimilação da lisina (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 2000; CECCATO-ANTONINI; TOSTA, 2005).

Tabela 6 - Testes de assimilação de fontes de nitrogênio pelas linhagens de leveduras

Linhagem *	Fonte de Nitrogênio		
	Lisina	Etilamina	Nitrato
CCA022 **	-	-	-
CCA053	+	+	+
CCA059	+	+	+
CCA077	+	+	+
CCA155	+	+	+
CCT2621	+	+	+
IF3	+	+	+
IF4	+	+	+
IF5	nd	nd	nd
IF6	nd	nd	nd

Legenda: nd: não determinado * CCA – Centro de Ciências Agrárias – UFSCar; CCT – Centro de Culturas Tropicais; IF = Isolado da Fermentação; ** linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

Para complementar a identificação das linhagens, utilizou-se a técnica de PCR colônia seguida por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, sendo possível conhecer o tamanho da região ITS do DNA ribossomal de cada levedura isolada (Figura 9). A região ITS, incluindo o gene 5,8S do DNA ribossomal, amplificada pelos *primers* ITS-1 e ITS-4 (WHITE et al., 1994) apresenta tamanho entre 450 e 550 bp para as leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces*, enquanto para a maioria das outras leveduras da fermentação o tamanho varia entre 600 e 900 bp (EGLI et al., 1999).

Souza-Liberal et al. (2005) propuseram uma metodologia baseada no uso de *primers* que amplificam a região ITS1 – 5,8S – ITS2 para detectar a presença de leveduras não-*Sacharomyces cerevisiae* em vinhos da fermentação etanólica. Os autores se basearam no fato de que a região ITS com tamanho entre 400 a 700 bp pode caracterizar leveduras contaminantes, uma vez que *S. cerevisiae* apresenta região ITS por volta de 800-850 bp (EGLI et al., 1999).

Algumas outras leveduras, por exemplo, *Arxozyma telluris* e *Kluyveromyces bacillisporus*, também apresentam tamanho ITS nesta faixa, porém, nenhuma delas já foi isolada da fermentação etanólica (SILVA, 1994).

A Figura 9 mostra o gel de agarose com os produtos PCR da região ITS das nove leveduras, na faixa de 450 a 600 bp, com exceção da linhagem CCT2621 (por volta de 800 bp). Para fins de comparação, foram incluídas as linhagens CCA039 e CCA022, as quais mostraram ITS ligeiramente superior aquele de CCT2621. A região ITS da linhagem CCA022 de *S. cerevisiae* tem 841 bp, conforme Ceccato-Antonini et al. (2005) e a linhagem CCA 039 foi identificada como *Torulopsis glabrata*. Há registro de ITS de *D. anomala* por volta de 700 bp (SOUZA-LIBERAL et al., 2005).

Figura 9 - Gel de agarose (1,5%) com os produtos PCR amplificados da região ITS do rDNA, incluindo o gene 5,8S, das linhagens de leveduras. Os números e letras sobre os poços referem-se às linhagens, com exceção de M1 (marcador molecular 50 bp) e M2 (marcador molecular 100 bp)

Egli e Henick-Kling (2001) propuseram *primers* específicos para espécies de *Brettanomyces/Dekkera*, entre eles, o par pB2 e ITS-4, específico para *B. bruxellensis*, na região ITS. Foi realizada PCR com estes *primers* a partir de DNA genômico e de produto PCR da região ITS esperando-se obter um fragmento de 143 bp, mas mesmo trabalhando-se com produto PCR purificado e variando-se a temperatura de anelamento de 55 °C a 65 °C, não foram obtidas amplificações.

Com os resultados obtidos nos testes taxonômicos, a chave de identificação de Kreger-van Rij (1984) leva ao gênero *Dekkera*, especialmente pela forte produção de ácido e presença de ascósporos nas leveduras testadas, com exceção das linhagens CCA053 e CCT2621 (esporos não visualizados). Estas poderiam estar na fase anamórfica e, portanto, serem *Brettanomyces*.

Avançando na identificação em nível de espécie, os testes de fermentação podem diferenciar o gênero *Dekkera* em duas espécies, dependendo da fermentação da galactose positiva (*D. intermedia*) ou negativa (*D. bruxellensis*), para as linhagens CCA053, CCA059, CCA077, CCA155 e IF3; e CCT2621 e IF4, respectivamente (Tabela 5). Porém, quanto à assimilação de celobiose, *D. bruxellensis* apresenta resultado negativo enquanto *D. intermedia* é capaz de assimilar esta fonte de carbono. Neste caso, há um resultado discrepante para a linhagem IF4, que não fermenta galactose e assimila celobiose e, portanto não é possível dizer se se trata de *D. bruxellensis* ou *D. intermedia*.

Os outros resultados de assimilação de fontes de carbono ora encaixam a linhagem numa espécie ora caracterizam outra espécie, pondo em dúvida a confiabilidade dos resultados de identificação. A Tabela 7 traz uma compilação dos resultados esperados dos testes de fermentação e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio para as duas espécies de *Dekkera*, conforme Kreger-van Rij (1984), permitindo uma comparação mais facilitada com os resultados aqui obtidos (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 7 - Testes de fermentação e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio para as espécies de *Dekkera* (Compilada de KREGER-VAN RIJ, 1984)

Espécie	Fermentação		Assimilação															
	Glicose	Galactose	Sacarose	Rafinose	Galactose	Xilose	Arabinose	Celobiose	Manitol	Melibiose	Glicose	Etanol	Maltose	Ac. Lactico	Ac. Citrico	Ac. Succínico	Inositol	Nitrato
<i>Dekkera intermedia</i>	+	+	+	v	+	-	-	+	-	nd	nd	nd	+	nd	-	v	-	v
<i>Dekkera bruxellensis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	+	nd	-	v	-	v

Legenda: nd:não determinada; v: variável

Para as linhagens CCA053 e CCT2621 não se observou produção de esporos sexuais em três meios indutores de esporulação e assim, considerando-se a comparativamente baixa produção de ácido (fraca a média, Tabela 4) e o tamanho relativamente alto da região ITS da linhagem CCT2621 (Figura 9) duvidou-se até que estas linhagens possam ser mesmo *Brettanomyces*.

Desta forma, resultados mais consistentes e confiáveis poderiam ser obtidos com o sequenciamento da região ITS das leveduras selecionadas, já que a caracterização morfo-fisiológica das leveduras apresentou resultados contraditórios.

Observando-se a Tabela 8, verifica-se que somente três das 9 linhagens foram identificadas como *Dekkera*, todas da espécie *bruxellensis*. As demais leveduras isoladas dos processos fermentativos pertenceram predominantemente à espécie *Pichia guilliermondii*, inclusive a linhagem CCA053, anteriormente identificada por Tosta (2004) como *Dekkera intermedia*. Ambas as espécies (*D. bruxellensis* e *P. guilliermondii*) mostram perfis semelhantes relacionados à habilidade de produzir 4-etil-

fenol, o que dificulta sobremaneira a caracterização das culturas baseada exclusivamente em características fisiológicas/bioquímicas. No entanto, a nível molecular, as duas espécies se diferenciam quando se realiza a restrição com a enzima *Hinf1*, sendo que a espécie de *Dekkera* apresenta baixa variabilidade no DNA mitocondrial entre as espécies, enquanto *Pichia* apresenta alta variabilidade no DNA mitocondrial (MARTORELL et al., 2005).

Tabela 8 - Identificação das linhagens de leveduras selecionadas através do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal

Linhagem	Espécie	Tamanho da seqüência analisada (bp)
CCA053	<i>Pichia guilliermondii</i>	578
CCA059	<i>Dekkera bruxellensis</i>	432
CCA077	<i>Dekekra bruxellensis</i>	446
CCA155	<i>Dekkera bruxellensis</i>	435
CCT2621	<i>Saccharomyces boulardii</i>	785
IF3	<i>Pichia guilliermondii</i>	575
IF4	<i>Pichia farinosa</i>	478
IF5	<i>Pichia guilliermondii</i>	578
IF6	<i>Pichia guilliermondi</i>	576

Os resultados do sequenciamento também confirmaram que a linhagem CCT2621 não é uma levedura *Dekkera* e sim *Saccharomyces boulardii*, o que já se suspeitava pelo tamanho da região ITS. Mc Cullough et al. (1998) mostraram que leveduras da espécie *S. boulardii* são linhagens asporogências (não formadoras de esporos) de *S. cerevisiae*, não representativas de uma espécie distinta e separada e de difícil identificação por métodos clássicos de taxonomia.

A produção de ácido foi a característica mais decisiva e discriminatória para a identificação de linhagens de *Dekkera*, pois comparando-se com os resultados do sequenciamento, verifica-se que somente aquelas linhagens com forte produção de ácido (Figura 5) confirmaram ser do gênero *Dekkera*.

As seqüências obtidas para cada uma das linhagens estão nos Anexos. Os ensaios posteriores (atividade *killer*, perfil da sensibilidade às toxinas *killer* e testes fermentativos) serão realizados somente com as linhagens *Dekkera*.

O ensaio *killer* foi realizado com a finalidade de verificar se as linhagens de leveduras *Dekkera* selecionadas possuem este tipo de atividade (Tabela 9), assim como avaliar se cada um dos isolados possui sensibilidade diante das toxinas produzidas por leveduras *killer* (Tabela 10, Figura 10).

Tabela 9 - Ensaio *killer* das linhagens de *Dekkera bruxellensis* em meio YEPD-azul de metileno, a 25 °C, por 7 dias, contra as linhagens sensíveis CCA003 e CCA039

Linhagem	CCA003	CCA039
CCA059	-	-
CCA077	-	-
CCA155	-	-

(-) Não apresentou halo de inibição/zona azul

Tabela 10 - Sensibilidade das linhagens de *Dekkera bruxellensis* frente às leveduras *killer*

Linhagem	Leveduras <i>killer</i>														
	CCA008	CCA015	CCA194	CCA199	CCA231	CCA369	CCA417	CCA418	CCA499	CCA432	CCA437	CCA452	CCA510	CCA542	CCA584
CCA059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CCA077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CCA155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

As três leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis* não apresentaram atividade *killer* frente às duas linhagens sensíveis. Além disso, foram suscetíveis à toxina da levedura CCA510 (*Kluyveromyces marxianus*), apresentando-se neutras às 14 leveduras *killer* restantes (Tabelas 9 e 10; Figura 10). Comitini et al. (2004) mostraram que a toxina de *Kluyveromyces wickerhamii* foi a mais eficaz no controle do crescimento de leveduras *Dekkera*.

Figura 10 - Sensibilidade da levedura *Dekkera bruxellensis* (CCA155) à linhagem de *Kluyveromyces marxianus* (CCA510), verificada pela presença de um halo de inibição ao redor da colônia *killer* além da formação de uma zona azul ao redor da mesma, caracterizando a morte celular

Estes resultados inviabilizam a proposição de uma metodologia de biotipagem por atividade *killer* para leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces*, devido ao fato de serem predominantemente neutras. No entanto, estudos com um número maior e mais diversificado de linhagens podem trazer resultados mais discriminatórios. Tosta (2004) já havia verificado este resultado para as mesmas linhagens, porém optou-se por repetir os testes para confirmação. Naquele trabalho, o autor não detectou a sensibilidade das linhagens à linhagem *killer* CCA510, possivelmente pelo fato do tempo menos de incubação (3 dias) ao invés dos 7 dias aqui utilizados.

2.3.2 Ensaios fermentativos

Os ensaios fermentativos foram realizados com a finalidade de avaliar o comportamento da levedura *Dekkera bruxellensis* como contaminante no processo fermentativo. Para isso, foram planejados experimentos com um número grande de ciclos celulares (14), uma vez que a levedura contaminante tem crescimento lento.

Diferentes níveis de contaminação foram avaliados, sendo eles, 10^1 , 10^2 e 10^3 células/mL, mantendo-se a concentração do agente da fermentação (*S. cerevisiae*) estabelecido em 10^8 células/mL. Procedeu-se também um ensaio em condições idênticas, inoculando-se apenas a linhagem contaminante de *Dekkera bruxellensis* (CCA059) ao nível de 10^8 células/mL a fim de verificar seu comportamento ao longo dos 14 ciclos.

Resultados obtidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) no monitoramento microbiológico de destilarias por diversas safras, têm mostrado que a contaminação por leveduras selvagens (isolamentos em meios seletivos WLD e Agar – lisina) raramente excede 10^4 UFC/mL¹, motivo pela qual estabeleceu-se o limite de 10^3 células/mL de *D. bruxellensis* nos experimentos aqui realizados.

A linhagem CCA193 (PE-02) foi escolhida devido ao seu alto rendimento fermentativo e extensiva utilização industrial, enquanto a linhagem CCA059 por ser a linhagem que mais apresentou resultados concordantes aos padrões estabelecidos para *Dekkera bruxellensis* nas chaves de identificação clássicas.

Além das análises habituais para avaliação do processo fermentativo (viabilidade celular, pH, Brix, ART e etanol), decidiu-se acompanhar a evolução do crescimento das leveduras agente e contaminante (*S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, respectivamente) durante o processo, através de plaqueamento das amostras em meio de contagem geral, não seletivo (WLN) e em meio seletivo (WLD), no qual a levedura agente não se desenvolve devido à presença de actidione por não apresentar resistência, permitindo a avaliação do crescimento da contaminante, em diluições inferiores às aquelas utilizadas para o meio WLN.

Os resultados obtidos após plaqueamentos em meios WLN e WLD podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

¹ CECCATO-ANTONINI, S.R. CCA, UFSCar – *campus* de ARARAS/SP

Figura 11 - Número de leveduras (UFC/mL) crescidas em meio WLN durante o processo fermentativo com reciclo celular. *Legenda:* F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Figura 12 - Número de leveduras (UFC/mL) crescidas em meio WLD durante o processo fermentativo com reciclo celular (ciclos de 12 horas); *Legenda:* F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Como pode ser observado na Figura 11, o número total de leveduras (estimado em WLN) foi ligeiramente maior nos tratamentos onde não havia contaminação por *D. bruxellensis*, especialmente até o 9º ciclo. A partir daí, os valores foram similares.

Na fermentação pura com *D. bruxellensis*, a população de leveduras elevou-se de 10^8 para 10^{14} UFC/mL, enquanto nos tratamentos com somente *S. cerevisiae* ou com *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis*, a população total de levedura aumentou cerca de 100-1000 vezes. A Figura 12 permite avaliar o comportamento da levedura contaminante quando em associação com *S. cerevisiae*. O número de células aumentou ao longo dos ciclos passando de 10^1 para $7,8 \times 10^2$, de 10^2 para 3×10^3 e de 10^3 para 1×10^6 UFC/mL ao final do 14º ciclo, nos tratamentos onde foram inoculados 10^1 , 10^2 e 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*, respectivamente. Estes resultados comprovam que a levedura contaminante cresce lentamente no caldo de cana ao longo de 14 ciclos de fermentação, aumentando um ciclo logarítmico nos 2 primeiros casos e 3 ciclos no caso em que havia 10^3 células iniciais/mL de *D. bruxellensis*. No ensaio em que havia somente a linhagem de *D. bruxellensis* inoculada, houve aumento de seis ciclos logarítmicos, passando de 10^8 células/mL iniciais para 10^{14} células/mL ao final dos 14 ciclos fermentativos.

Estes resultados mostram o potencial de crescimento destas leveduras em condições de fermentação, em meio de caldo de cana, e que a evolução do crescimento depende do tamanho do inóculo inicial.

Abbott e Ingledew (2005) observaram que o crescimento de *Brettanomyces* foi limitado a aproximadamente 1 ciclo *log* independentemente do nível de inóculo inicial, que variou de 10^3 a 10^7 células/mL, em fermentações mistas com *S. cerevisiae* a partir de mosto de milho.

Na Figura 13, observa-se o crescimento celular das colônias de leveduras resistentes ao actidione, em meio WLD. A análise microscópica das colônias confirmou serem da contaminante *D. bruxellensis*, pela morfologia característica das células (alongadas, ogivais) e pela intensa produção de ácido, capaz de ocasionar mudança da cor do meio.

Figura 13 - Aspecto das placas contendo meio WLD, antes e após inoculação de amostras da fermentação mista *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis*, evidenciando a mudança de coloração do meio devido à produção de ácido pelas colônias de *D. bruxellensis*

Já a Figura 14 mostra a morfologia das células de leveduras coradas com azul de metileno em ensaio com inoculação conjunta de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, onde se observa a morfologia diferenciada da levedura *D. bruxellensis*.

Figura 14 - Morfologia das células de leveduras após coloração com azul de metileno sob microscópio óptico (aumento 400x) em ensaio com inoculação conjunta de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*. (1) células alongadas, características de *Dekkera*; (2) células esféricas, características de *S.cerevisiae*. A seta aponta uma célula morta (corada pelo azul de metileno)

Com relação aos números de viabilidade, no ensaio em que havia somente *S. cerevisiae*, a média da viabilidade foi de 96,9%, enquanto que nos ensaios em que havia 10^1 , 10^2 e 10^3 células/ mL de *Dekkera*, a viabilidade celular foi de 92,5%, 95,5% e de 87%, respectivamente, mostrando diminuição na viabilidade celular na presença da

levedura contaminante, especialmente após o 9º - 10º ciclo fermentativo. No ensaio com somente *D. bruxellensis*, a média da viabilidade foi de 94% (Figura 15).

Figura 15 - Viabilidade celular (%) das leveduras durante o processo fermentativo com reciclo celular (ciclos de 12 horas); *Legenda*: F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

A análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos (diferentes níveis de contaminação de *D. bruxellensis*), entre os ciclos fermentativos e interação tratamento x ciclo (Tabela 11), mostrando em linhas gerais, que nas fermentações mistas *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis*, observa-se queda na viabilidade celular à medida em que aumenta a concentração de *D. bruxellensis*, cujas médias são significativamente inferiores às fermentações puras com *S. cerevisiae* ou *D. bruxellensis*. Porém, na fermentação *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*, a viabilidade celular apresentou valor intermediário entre a fermentação pura com *D. bruxellensis* e a pura com *S. cerevisiae* (Tabela 12). De qualquer forma, é importante destacar que a presença da levedura contaminante prejudica a levedura *S. cerevisiae* de alguma maneira, pois embora não tenha se discriminado entre as leveduras durante

a contagem na câmara de Neubauer, a levedura *S. cerevisiae* sobrepuja em número nos tratamentos e, portanto, a perda da viabilidade deve ser provavelmente das células de *S. cerevisiae*.

Tabela 11 - Análise de variância dos resultados de viabilidade celular (%)

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	2441	610	37,5*
Ciclo	13	1203	93	5,7*
Tratamento*Ciclo	52	1735	33	2,1*
Resíduo	140	2277	16	
Total	209	7655		

*significativo a 5%

Tabela 12 - Teste de *Tukey* dos resultados de viabilidade celular

Tratamentos	Médias (%)
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i>	96,7 a
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10 ¹ células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	92,5 c
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10 ² células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	95,5 ab
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10 ³ células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	87 d
10 ⁸ células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	93,5 bc

Obs.: Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (*Tukey* 5%)

O pH do meio de fermentação decaiu ao longo dos ciclos nas fermentações com *D. bruxellensis*, ao contrário da fermentação pura com *S. cerevisiae* (Figura 16). As análises estatísticas apontaram diferenças significativas entre os tratamentos, entre os ciclos fermentativos e interação ciclo x tratamento (Tabela 13). Os valores de pH diferiram significativamente entre si em todos os tratamentos (Tabela 14), observando-se uma queda nos valores com o aumento da contaminação por *D. bruxellensis*.

A diminuição do pH pode ser devida à elevada taxa de consumo do substrato (ART), resultando em maior quantidade de gás carbônico eliminado e, portanto, em aumento da acidez do meio. Isto resultaria em maior produção de álcool. Outra possibilidade é a produção de ácido acético pelas leveduras *Dekkera* (CIANI; FERRARO, 1997; ABBOTT et al., 2005; ABBOTT; INGLEDEW, 2005). Os autores têm enfatizado que estas leveduras produzem grandes quantidades de ácido acético especialmente quando a oxigenação é abundante, o que não ocorre durante a fermentação etanólica. A primeira possibilidade não se concretizou nos experimentos aqui realizados, como pode ser visto mais a frente, pois o teor alcoólico do vinho foi

menor em situação de contaminação por *Dekkera*. Desta forma, parece que a possibilidade de produção de ácido acético não pode ser descartada. Ciani et al. (2003) testaram diferentes condições de semi-aerobiose para a avaliação do crescimento e fermentação de linhagens de *Dekkera/Brettanomyces* e verificaram que condições de semi-aerobiose (frascos com tampão de algodão-lã, como aqueles aqui utilizados) afetaram negativamente a fermentação, com o aumento da produção de ácido acético, acetaldeído e etil-acetato.

Figura 16 - pH do meio de fermentação durante o processo fermentativo com reciclo celular (ciclos de 12 horas); pH inicial: 4,3. *Legenda:* F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Tabela 13 - Análise de variância dos valores de pH

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	9,69	2,42	118,82*
Ciclo	13	5,63	0,43	21,27*
Tratamento*Ciclo	52	16,066	0,309	15,16*
Erro	192	18,92	0,020	
Total	209	34,24		

*significativo a 5%

Tabela 14 - Teste de Tukey dos valores de pH

Tratamentos	Médias
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i>	3,14 b
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^1 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	2,97 c
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^2 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	3,19 b
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^3 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	2,78 d
10^8 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	3,42 a

Obs.: Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%)

Com relação ao Brix residual do meio de fermentação, foi possível observar que os três ensaios fermentativos com a presença da levedura contaminante não apresentaram diferenças entre si e em relação à fermentação somente com *S. cerevisiae* após o 6º ciclo fermentativo. Já na fermentação com *D. bruxellensis*, o decaimento do Brix foi lento ao longo dos 14 ciclos. Nas outras fermentações, com exceção daquela contaminada com 10^2 células de *D. bruxellensis*/mL, o Brix decaiu cerca de 50% logo ao final do primeiro ciclo (Figura 17).

Figura 17 - Brix residual (°) do meio de fermentação durante o processo fermentativo com reciclo celular (ciclos de 12 horas); Brix inicial: 12°. *Legenda:* F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Há diferenças significativas entre os tratamentos, entre os ciclos e interação ciclo x tratamento (Tabela 15), de forma que o menor Brix residual foi obtido na fermentação mista *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*, significativamente diferente da média na fermentação pura com *S. cerevisiae* e das demais. O maior teor residual foi observado na fermentação pura com *D. bruxellensis* (Tabela 16).

Estes resultados podem apontar novamente para as duas situações: independentemente da presença da contaminante e do seu crescimento no meio de cultura, o açúcar está sendo consumido e convertido em etanol, e assim, não haveria diferença na produção de etanol na presença da levedura contaminante; o açúcar estaria sendo consumido, porém, não convertido proporcionalmente em etanol, sendo utilizado como fonte de energia para o crescimento da levedura contaminante, e neste caso, a produção de etanol não seria a mesma nos três ensaios. Os resultados de pH final do meio de fermentação indicam uma acentuada acidificação do meio de fermentação quando a contaminante está presente concomitantemente à *S. cerevisiae*, podendo ser resultado da produção de álcool ou do crescimento da levedura *D. bruxellensis*. O crescimento da contaminante no meio de fermentação pode ser observado através dos plaqueamentos em meio WLD (Figura 12) e já foi descrito anteriormente.

Tabela 15 - Análise de variância dos valores de Brix residual

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	902.867	225.717	25213,0*
Ciclo	13	170.320	13.102	1463,5*
Tratamento*Ciclo	52	98,213	1,889	211,0*
Resíduo	140	1,253	0,009	
Total	209	1172.653		

*significativo a 5%

Tabela 16 - Teste de Tukey dos resultados de Brix residual

Tratamentos	Médias (°) Brix
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i>	4,8 d
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^1 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	4,9 c
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^2 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	5,6 b
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^3 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	4,6 e
10^8 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	10,1 a

Obs.: Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%)

Os resultados de açúcares redutores residuais totais (ART) residuais mostram mais claramente as diferenças entre os ensaios, pois na presença da contaminante *D. bruxellensis* independentemente do seu nível de contaminação (10^1 , 10^2 ou 10^3 células/mL), a quantidade de açúcar residual é menor nos 7 primeiros ciclos, quando comparado com o ensaio com somente *S. cerevisiae*. Após este período, não há diferenças marcantes entre os ensaios (Figura 18).

A quantidade de ART residual apresentou média de 3,43, 3,44 e 3,46 mg/mL nos ensaios em que a levedura contaminante *D. bruxellensis* estava presente nas concentrações de 10^1 , 10^2 ou 10^3 células/mL, respectivamente. Tal fato evidencia o consumo de ART pelas contaminantes não significativamente diferentes entre si; já no ensaio em que havia somente *S. cerevisiae*, a média dos 14 ciclos de ART apresentou-se em torno de 5 g/100mL de glicose, estatisticamente diferente das médias das fermentações mistas *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis* (Tabelas 17 e 18).

Figura 18 - ART residual (mg/mL) do meio de fermentação durante o processo fermentativo com reciclo celular (ciclos de 12 horas); ART inicial: 113 mg/mL. *Legenda:* F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Tabela 17 – Análise de variância dos valores de ART (mg/mL)

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	53220,86	13305,21	10392,57*
Ciclo	13	8689,37	668,41	522,09*
Tratamento*Ciclo	52	15922,61	306,20	239,17*
Resíduo	140	179,24	1,28	
Total	209	78012,08		

*significativo a 5%

Tabela 18 - Teste de *Tukey* dos resultados de ART

Tratamentos	Médias (mg/mL)
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i>	5,14 b
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10 ¹ células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	3,43 c
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10 ² células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	3,44 c
10 ⁸ células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10 ³ células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	3,46 c
10 ⁸ células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	43,66 a

Obs.: Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (*Tukey* 5%)

Quanto ao teor alcoólico do vinho, verificou-se um aumento gradativo ao longo dos ciclos para todas as fermentações (Figura 19). A análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos, entre os ciclos e interação ciclo x tratamento (Tabela 19), mostrando médias estatisticamente diferentes entre si nos tratamentos (Tabela 20). Com a contaminação por *D. bruxellensis*, o teor alcoólico decaiu 0,3 a 0,7 pontos percentuais. A fermentação pura com *D. bruxellensis* resultou em teor alcoólico irrisório (por volta de 1%).

Figura 19 - Teor alcoólico (g/100mL) do vinho do processo fermentativo com reciclo celular (ciclos de 12 horas); *Legenda*: F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Tabela 19 - Análise de variância do teor alcoólico (g/100mL)

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	413,702	103,425	1430,79*
Ciclo	13	73,673	5,667	78,40*
Tratamento*Ciclo	52	32,919	0,633	8,76*
Resíduo	140	10,120	0,072	
Total	209	530,414		

*significativo a 5%

Tabela 20 - Teste de *Tukey* dos resultados do teor alcoólico

Tratamentos	Médias (g/100 mL)
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i>	5,1 a
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^1 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	4,6 c
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^2 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	4,8 b
10^8 células/mL de <i>S. cerevisiae</i> + 10^3 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	4,4 d
10^8 células/mL de <i>D. bruxellensis</i>	1,3 e

Obs.: Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (*Tukey* 5%).

Avaliando-se os resultados do teor alcoólico em conjunto com os outros parâmetros analisados (viabilidade celular, crescimento em UFC/mL, pH, Brix residual e ART residual), algumas considerações podem ser feitas:

- a levedura *Dekkera bruxellensis* é capaz de crescimento em meio de fermentação à base de caldo de cana, independente do tamanho do seu inóculo inicial (10^1 a 10^3 células/mL), com ART por volta de 11% e condições de semi-aerobiose (frascos tamponados com algodão, sem agitação);

- em sistema de fermentação em batelada com reciclo celular, a contaminação por *D. bruxellensis* na concentração de 10^1 a 10^3 células/mL é capaz de impactar negativamente a fermentação etanólica, causando diminuição da viabilidade de *S. cerevisiae*, diminuição do pH do meio e decréscimo na produção de etanol, provavelmente pela produção de ácido acético às custas do ART do meio.

O decréscimo na produção de etanol encontrado por Abbott e Ingledew (2005) se deveu à possível metabolização do álcool pelas leveduras *Brettanomyces* para a produção de ácido acético. Porém, estes autores não detectaram crescimento expressivo (cerca de 1 ciclo *log*) como aquele apresentado pela espécie *D. bruxellensis* na fermentação mista com *S. cerevisiae* do caldo de cana (2 a 3 ciclos *log*). Assim, reforça-se a idéia de que a produção de ácido deve estar relacionada com consumo direto de ART e crescimento, “desviando” o açúcar que iria para a produção de etanol.

Vários autores têm apontado algumas questões como restritivas à concepção da importância destas leveduras no processo fermentativo para produção de álcool combustível, embora os resultados sejam a partir de mosto de milho (*whole corn mash*):

- incapacidade de produção de ácido acético em condições de baixa aeração e altas concentrações de glicose (ABBOTT et al., 2005);

- leveduras *Dekkera/Brettanomyces* somente crescem mais rapidamente que *S. cerevisiae* em concentrações de ácido acético acima de 0,45%, prejudicial a *S. cerevisiae* (ABBOTT et al., 2005);

- a levedura *S. cerevisiae* é capaz de metabolizar ácido acético, assim como espécies de *Brettanomyces* (ABBOTT; INGLEDREW, 2005).

A aeração parece ser o fator chave para a produção de ácido acético pelas leveduras *Dekkera/Brettanomyces*, e desta forma os autores não estão convencidos do

papel destas leveduras na fermentação, ainda mais pela incapacidade de competir com *S. cerevisiae* baseada nas suas taxas de crescimento lentas.

Porém, os resultados aqui apresentados revelam outros aspectos. Os resultados discrepantes aqui obtidos podem estar relacionados ao tipo de substrato utilizado, sendo o caldo de cana mais facilmente metabolizável que o mosto de milho; a utilização de um sistema de fermentação com reciclo celular durante um tempo mais longo (7 dias ou 14 ciclos de 12 horas) para permitir competitividade com *S. cerevisiae*, uma vez que as leveduras *Dekkera* tem crescimento mais lento; a utilização de uma linhagem isolada do processo fermentativo, portanto, mais adaptada às condições do processo; e emprego de ensaios com fermentações mistas (*S.cerevisiae* + *D. bruxellensis*), ao invés das fermentações puras utilizadas por alguns autores.

A Figura 20 traz os resultados da eficiência fermentativa média (%), baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac, onde 1 g de açúcar consumido rende 0,511 g de álcool. Houve uma queda acentuada na eficiência, confirmando o desvio do açúcar para produção de outros metabólitos que não o álcool. A levedura *S. cerevisiae* utilizada (PE-02, CCA193) apresentou uma boa eficiência fermentativa, por volta de 92%.

Figura 20 - Eficiência fermentativa média (%), baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac, apresentada pelas fermentações puras e mistas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em meio de caldo de cana. *Legenda:* F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Para avaliar o real impacto da contaminação por *D. bruxellensis* no processo de fermentação etanólica, realizou-se uma extrapolação com os dados obtidos junto a uma destilaria de médio porte², cuja capacidade de moagem foi de 2.500.000 toneladas de cana na safra 2007/2008, com 191.499.000 Kg de ART dirigidos à produção de etanol. Para cada fermentação realizada, foram calculados o volume total de álcool produzido e a quantidade total de ART disponibilizado, somando-se os valores a cada ciclo fermentativo, na hipótese de que 7 dias de fermentação (14 ciclos de 12 horas) possam representar uma safra. Os dados obtidos quanto ao volume de álcool produzido (em m³) estão representados na Figura 21, a qual mostra também o volume de álcool que deixou de ser produzido devido à contaminação por *D. bruxellensis*, variando de cerca de 6 milhões a 15 milhões de litros numa safra.

² USINA ZANIN AÇÚCAR E ÁLCOOL LTDA, Araraquara/SP

Figura 21 - Volume de álcool produzido (m^3) durante as fermentações puras e mistas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, em meio de caldo de cana, extrapolando-se os resultados obtidos em escala de laboratório para os números de ART da cana de uma destilaria de médio porte. O volume de álcool que deixou de ser produzido nas fermentações com *D. bruxellensis* está destacado em vermelho e expresso em números sobre as barras. **Legenda:** F1: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; F2: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^1 células/mL de *D. bruxellensis*; F3: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*; F4: 10^8 células/mL de *S. cerevisiae* + 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*; F5: 10^8 células/mL de *D. bruxellensis*

Considerando-se a média do preço do álcool durante a safra 2007/2008 (abril a novembro) foi de R\$ 0,67 por litro³, calcula-se que com a quantidade de álcool que na safra deixaria de ser produzida, a usina sofreria um prejuízo de cerca de R\$ 4 a 10 milhões dependendo do grau de contaminação com *Dekkera bruxellensis*.

Ainda que se considere a pequena escala de realização dos experimentos e o controle do processo no laboratório (temperatura, assepsia, etc.) em comparação com as condições industriais, o volume de álcool (em potencial) “produzido” pela levedura *S. cerevisiae* CCA193 (PE-02) foi de cerca de $108.000 m^3$, enquanto na destilaria anteriormente referida, a produção de álcool girou em torno de $110.000 m^3$, o que torna mais confiável os resultados da extrapolação.

³ Cepea-ESALQ/USP

De uma forma geral, constatou-se que na fermentação com 10^2 células/mL de *D. bruxellensis*, os resultados foram sempre mais favoráveis que a 10^1 e 10^3 células/mL de *D. bruxellensis*, embora sempre críticos. Esse “desvio” de tendência pode ser resultado do acaso ou estar relacionado a algum fator intrínseco da levedura. Estudos adicionais são necessários para verificar esta questão da concentração do inóculo e outras levantadas no texto, destacando-se como essencial a quantificação de ácido acético no meio de fermentação.

3 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível concluir que:

- a taxonomia clássica não é uma ferramenta confiável para identificação de leveduras do gênero *Dekkera*, visto que os resultados são ambíguos e variáveis;
- a amplificação e sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal são importantes ferramentas para identificação e caracterização de leveduras *Dekkera*, com tamanhos variando entre 400 e 600 bp;
- as leveduras do gênero *Pichia* (especialmente *Pichia guilliermondii*) podem ser facilmente confundidas com algumas espécies do gênero *Dekkera* pela alta produção de ácido e tamanho da região ITS do rDNA, podendo ser diferenciadas pelo sequenciamento desta região;
- os ensaios de sensibilidade às toxinas *killer* mostraram que é inviável o uso deste método para biotipagem de leveduras do gênero *Dekkera* uma vez que as linhagens analisadas apresentaram-se predominantemente neutras às toxinas;
- em condições de fermentação em batelada com reciclo celular, a levedura *Dekkera bruxellensis* foi capaz de crescimento em meio de caldo de cana,

independentemente do tamanho do seu inóculo inicial (10^1 a 10^3 células/mL), impactando negativamente a fermentação etanólica, causando a diminuição da viabilidade de *S. cerevisiae*, diminuição do pH do meio e decréscimo na produção de etanol e eficiência fermentativa, possivelmente devido à produção de ácido acético a partir do ART do meio de fermentação;

- extrapolando-se os resultados obtidos em escala de laboratório para a escala industrial de uma destilaria de médio porte, a contaminação por *Dekkera bruxellensis* acarretaria numa perda de 6 milhões a 15 milhões de litros de álcool na safra, que deixariam de ser produzidos, dependendo do nível de contaminação.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D.A.; INGLEDEW, W.M. The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.69, p.16-21, 2005.
- ABBOTT, D.A.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.66, p.641-647, 2005.
- ARAÚJO, P.R.L.; BASÍLIO, A.C.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS Jr, M.A.; MORAIS, J.O.F. Informações sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife. 2005.
- AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/Cordenadoria Regional Sul, 1997.
- BALEIRAS-COUTO, M.M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS, J.H.J.; VOSSEN, J.M.B.M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.62, p.41-46, 1996.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 811p.
- BASÍLIO, A.C.M.; PINHEIRO, W.; BRASILEIRO, B. MORAIS Jr, M.A.; SIMÕES, D.A. Utilização do padrão de amplificação com marcador (GTG)₅ para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife. 2005.
- BOEKHOUT, T.; KURTZMAN, C.P.; O'DONNELL, K.; SMITH, M.T. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.781-786, 1994.
- CAI, J.; ROBERTS, I.N.; COLLINS, M.D. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.542-549, 1996.

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, 2000.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D. Eficiência de meios seletivos no monitoramento de leveduras na fermentação alcoólica atestada por PCR. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife. 2005.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SUDBERY, P.E.; WHIGTMAN, R. Molecular characterization of three haploid industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their responses to medium stress. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife. 2005.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. The influence of *Dekkera/Brettanomyces* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.46, p.463-468, 1995.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.60, p.165-178, 1992.

CIANI, M. FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.75, p.489-495, 1997.

CIANI, M.; MACCARELLI, F.; FATICHENTI, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.19, p.419-422, 2003.

COMITINI, F.; INGENIIS, J.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.238, p.235-240, 2004.

DELIA, M.L.; PHOWCHINDA, O.; ALFENORE, S.; STEHAIANO, P. ***Brettanomyces* as a polluting yeast in alcoholic fermentations**: study of its relations to *Saccharomyces*. Disponível em: <<http://202.28.17.1/article/atc42/atc00259.html>> Acesso em: 20 jun. 2006.

DIAS, L.; DIAS, S.; SANCHO, T.; STENDER, H.; QUEROL, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiology**, London, v.20, p.567-574, 2003.

EDLIN, D.A.N.; NARBAD, A.; DICKINSON, J.R.; LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.125, p.311-316, 1995.

EGLI, C.M.; HENICK-KLING, T. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.52, n.3, p.241-247, 2001.

EGLI, C.M.; MITRAKUL, C. ; HENICK-KLING, T. Molecular identification of *Brettanomyces* yeasts. In: INTERNATIONAL ENOLOGY SYMPOSIUM. 12., 1999, Montreal. **Proceedings...** Montreal, 1999. p. 201-217.
FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; QUEROL, A.; BARRIO, E, RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.78, p. 87-97, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

FRANSON, P. **The threat of Brett**. Vineyard & Winery Management, New York, v.27, n.5, 2001. Disponível em: <http://www.vwm-online.com/magazine/archive/2001/vol27_No5/Brett.htm> Acesso em: 08 maio 2002.

FUGELSANG, K.C. Yeasts and molds. In:_____. **Wine microbiology**. New York: Chapman & Hall ed., 1997, 245p.

GUIDI, R. H., **Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares para estirpes de leveduras contaminantes da fermentação etanólica**. 2000. 99p. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

GUILLAMÓN, J.M; SANCHEZ, I.; HUERTA, T. Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.147, p.267-272, 1997.

GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.168, p.387-392, 1998.

HERESZTYN, T. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.146, p.96-98, 1986.

HOEBEN, P.; CLARK-WALKER, G.D. An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera/Brettanomyces* and *Eeeniella* genera. **Current Genetics**, Berlin, v.10, p.371-379, 1986.

IBEAS, J.; LOZANO, J.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.62, p.998-1003, 1996.

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

LEE, S.S; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p.641-649.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.86, p.23-50, 2003.

MARTELLI, H.L.; PANEK, A.D. Dosagem de glicídeos redutores pelo ácido 3,5 dinitrosalicílico. **Bioquímica experimental**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1968.

MARTORELL, P.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; LOUREIRO, V.; QUEROL, A. Molecular typing of the yeasts species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 79-84, 2006.

Mc CULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; Mc CUSKER, J.H.; STEVENS, D.A. Appecies identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. Inval.) **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.9, p.2613-2617, 1998.

MINIAC, M. de. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces*. **Industries Agricoles et Alimentaires**, Paris, v.106, p.559-563, 1989.

MOLINA, F.I.; SHEN, P.; JONG, S.C. Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.32-35, 1993.

OLIVA-NETO, P.; FERREIRA, M.A.; YOKOYA, F. Screening for yeast antibacterial properties from na ethanol distillery. **Bioresource Technology**, Essex, v. 92, p.1-6, 2004.

PRADA, G.M.M.; CASTRO, M.M.S. **Usinas de açúcar e álcool: estudos das leveduras e dos fatores que afetam a fermentação**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1995. 49p.

SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação.** 1994. 145p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1994.

SILVA, G.A. ***Dekkera/Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos – características, problemas e identificação.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 62p.

SILVA, L.R.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M.; TRUJILLO, M.E.; Velásquez, E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. **Food Chemistry**, Barking, v.89, p.185-189, 2005.

SMITH, M.T.; YAMAZAKI, M.; POOT, G.A. *Dekkera, Brettanomyces* and *Eeniella*: electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology. **Yeast**, v.6, p.299-310, 1990.

SOUZA-LIBERAL, A.T.; da SILVA FILHO, E.A; de MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; de MORAIS Jr, M.A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.40, p.19-23, 2005.

SOUZA-LIBERAL, A.T.; BASÍLICO, A.C.M.; do MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B.T.V.; da SILVA FILHO, E.A.; de MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; de MORAIS Jr, M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, p.538-547, 2007.

TOSTA, C.D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema *killer*.** 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VANCETTO, G.T.; ROSA, M.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Thermal shock replacing glass beads for cell lysis in yeast genomic DNA extraction. In GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY MEETING. 1. 2006, Princeton, EUA. **Program and abstracts...**2006. p.213.

van der WALT, J.P. *Dekkera*, a new genus of *Saccharomycetaceae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.30, p.273-280, 1964.

van der WALT, J.P.; KERKEN, A.E. van The wine yeasts of the cape: part I: a taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.24, p.239-252, 1958.

_____. The wine yeasts of the cape: part IV: ascospore formation in the genus *Brettanomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.26, p.292-296, 1960.

WHEALS, E.A.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel etanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.17, p.482-487, 1999.

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.

ANEXOS

Sequências (5' → 3') da região ITS do r DNA, incluindo o gene 5,8S das linhagens de leveduras estudadas.

CCT2621 – forward

GAAAGTAGAAATTTTGAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTA
CTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGC
GGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTG
TGCTTTTGTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCAT
ATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCCAGAGGTAACAAAC
ACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGA
AATTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCAGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTC
ATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAA
ATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT
GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT
TATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATG
TTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAAGGTAGGAGTACCCGCTGACCT

CCA053 –forward

TAATCGAATTGCAGCGCTTACTGCGCGGCGAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTTG
ATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAACA
AAACACAATTTAATTATTTTTATTGATAGTCAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTC
TGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGT
TTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGAACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCAT
GGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACTCGTT
GAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAACCAAAC
AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAGCCG
CGGAGAGAATTA

CCA059 – forward

AGGGTGCTCTTATGACGTGCAGACACGTGGATGATGAATAGTGGAATACATTAAAT
 TTATTTAGTTTAGTCAAGAAAGAAATTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCT
 CGCGTCCATGAAGAACGCAACGAATTGCGATACTTAATGGGAATTGCAGATTTTCG
 TGAATCATCCAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAAGGCATGC
 CTGTTTGAACGTCATTTCTTCTCACTTTTCAAGTGGGTATGAGATTACACGGAGGTGT
 TTTCTTCCAAGGAAAGACAGGGGAGTTGAGGAATAATGATTCAAGGGTTCGGCCGT
 TCATTAATTTTTTCTCCCCCTCCCTCAAGTTTGACCTCCAATCAGGTAGGAGGAC
 CCGCTGAACTTAAGCATATCAAAATCAGAGGAAAAT

CCA077 – forward

CAATGCTGGACTTAGCCGTGCAGACACGTGGATGGAGAAGGAGAAAAGAAAATAC
 ATTAAATTTTAGTTTAGTCAAGAAAGAAATTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTG
 GTTCTCGCGTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGAT
 TTTCTGTAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGG
 CATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCACTTTTTTTTTTAGTGTTATGAAATTAC
 ACGAGGGGGTTTTCTTCAAAGGGGAAAACAAGGGCAGTTAGGGAATGATGATTAA
 GGTTCGGCCGTTTATTATTTCTTTATTACCCGTAATTAACAAGTTTGACCTCAAATC
 AGGGAGGAGGACCCGCTGAACTTATGCCTATCAATAACCGAAAGAAAAA

CCA155 – forward

TTGGCGGAGTTTTATGCCGTGCAGACACGTGGATGAGGAATAGTGAGATACATTA
 AATTTATTTAGTTTAGTCAAGAAAGAAATTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGT
 TCTCGCGTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTT
 TCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGGTATTCCGGAAGGG
 CATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCACTTTTCAAGTGGTTATGAGATTACACGGA
 GGTGTTTTCTTCAAAGGAAAGACAGGGGAGTTGAGGAATAATGATTCAAGGTTTCG
 GCCGTTTATTAATTTTTTCTCCCCCATCCATCAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGG
 AGGACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

IF3 – forward

GAATTCGTATTGCAGCGCTTACTGCGCGGCGATAACCTTACACACAGTGTCTTTTT
 GATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAC
 AAAACACAATTTAATTATTTTTATTGATAGTCAAATTTTGAATTAATCTTCAAACTTT
 CAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
 TAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCT
 CTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGG
 TTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGAACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCA
 TGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACTCGT
 TGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAACCAAA
 CAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAACC
 GGGAGGAG

IF4 – forward

CAAATTAAGCTAGATGCATTACACTTGATAGTACTGATATTCTCGCAAGAGCATAAA
 CAACAAAACTATTACAACCATGTCAACTAAGATTAATGTTAAACTTTCAACAACGG
 ATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAT
 TTGCATTTTTTCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCTTTGGTATTC
 CAGAGAGCATGTCTGTTTGAGCGTCGTTTCCTTCTCAAACGCAAGTTTGGTGTGG
 GCGGTGCGTGAGCTAGCCTGAAATAATGGTTGTGGAGGCGCTGTATTGTCTTCTGT
 AAAGTTTGTACTAGGAATAATACTTACTGGAGCAGGACCAAGGCTACACAGTGCT
 GCCACTGAATTTATCAAGCTCGACCTCAAATCAGACAAGAGTACCCGCTGAACTTA
 AGCATATCAATAAGCGGGAGGAAAAA

IF5 – forward

CGATCGTTTGCAGCGCTTACTGCGCGGCGAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTTGA
 TACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAACAA
 AACACAATTTAATTATTTTTATTGATAGTCAAATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCA
 ACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGCGATAAG
 TAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCT
 CTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGG
 TTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGAACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCA
 TGGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACTCGT
 TGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAACCAAA
 CAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGC
 CGGGAGAGAAA

IF6 – forward

CAAATACTTTTGCAGCGCTTACTGCGCGGGCGAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTTG
ATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAACA
AAACACAATTTAATTATTTTTATTGATAGTCAAATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTC
TGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGT
TTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGAACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCAT
GGGTAGTACTGGATAGTGCTGTGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTT
GAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAACCAAAC
AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAGGC
CGGGAGGAA