



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015005368-1 A2

(22) Data do Depósito: 11/03/2015

(43) Data da Publicação: 18/10/2016



(54) Título: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTURA SÓLIDO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E PROCESSO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA NO REFERIDO MEIO

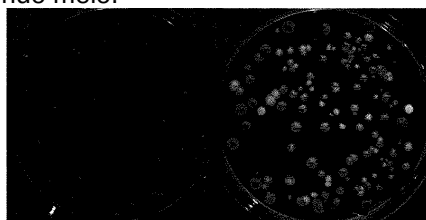
(51) Int. Cl.: C12N 1/16

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO. CGC/CPF: 33975333847, CECILIA LALUCE. CGC/CPF: 01190865815, ANGELA CAPECE, PATRIZIA ROMANO

(74) Procurador(es): FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTURA SÓLIDO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E PROCESSO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA NO REFERIDO MEIO. A presente invenção se refere a uma composição de meio de cultura sólido contendo corantes específicos que permitem identificar leveduras inoculadas (starters) durante o processo de fermentação de vinho com base na diferença entre a coloração de colônias de leveduras. O meio de cultura proposto na presente invenção permite identificar diferenças entre a coloração das colônias dos inóculos starters. Uma vez que leveduras distintas ensaiadas (gêneros e espécies) apresentam colorações diferentes no meio proposto, tal técnica pode ser aplicada para detectar tanto a presença quanto a proporção de diferentes leveduras inoculadas durante o processo fermentativo. Além disso, a presente invenção adicionalmente propõe sua utilização nos diversos setores industriais de fermentação (biocombustíveis, cerveja e vinho) e um processo para a preparação de tal meio de cultura sólido, bem como um processo para identificação das linhagens de levedura no referido meio.



**COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTURA SÓLIDO, PROCESSO PARA
PREPARAÇÃO DO MESMO E PROCESSO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS
LINHAGENS DE LEVEDURA NO REFERIDO MEIO**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo da Micologia, mais especificamente na área dos processos fermentativos, e descreve uma composição de meio de cultura sólido, um processo para preparação do referido meio de cultura sólido, bem como um processo para identificação das linhagens de levedura no referido meio de cultura sólido.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Atualmente, o monitoramento da dinâmica populacional de leveduras em processos fermentativos é realizado por empresas terceirizadas através de técnicas moleculares de identificação, tais como cariotipagem, análise de restrição do polimorfismo de fragmentos de DNA mitocondrial (mtDNA RFLP), PCR *fingerprinting*, PCR em tempo real e PCR de sequências interdelta. Estas técnicas apresentam alto poder discriminatório e reprodutibilidade, porém trata-se de um procedimento que requer mão de obra especializada e de custo elevado. Meios sólidos contendo corante, tais como o WL-Nutrient (*Wallerstein Laboratory Nutrient*) é o recomendado para o controle populacional de leveduras em fermentações industriais. Usualmente, amostras coletadas de reatores industriais são plaqueadas neste meio, o qual permite visualizar o crescimento de leveduras e bactérias presentes no processo. No entanto, a diferenciação entre a coloração das colônias não é satisfatória, fazendo-se necessário o uso de técnicas moleculares para uma caracterização definitiva entre as

mesmas.

[003] As técnicas moleculares exigem equipamentos e reagentes sofisticados, os quais são usualmente importados, tendo como resultado análises de custo elevado. Nos processos fermentativos, as técnicas moleculares de identificação são aplicadas para identificar e monitorar a permanência das leveduras selecionadas como inóculo *starter*. As técnicas moleculares de identificação vêm ganhando espaço nas análises no âmbito de obter resultados mais precisos, porém, o seu elevado custo agregado à mão de obra especializada impedem a sua implantação nos laboratórios de microbiologia industriais. Assim, o desenvolvimento de técnicas simples para identificar leveduras em processos fermentativos foi o alvo principal da presente invenção com o objetivo de garantir acessibilidade da metodologia nos diferentes setores de fermentações industriais. A elaboração de um meio de cultura contendo corantes permitiu através de plaqueamentos quantificar a proporção, bem como a permanência e dominância de leveduras durante o processo de fermentação de mosto natural de uva. As vantagens observadas na sua utilização foram: fácil manipulação; custo acessível; redução na geração de resíduos; tempo de análise reduzido; análise quantitativa e qualitativa; e redução em análises moleculares de identificação.

[004] Por esta razão, um novo meio diferencial, também baseado no uso de corantes, foi proposto visando melhorar o monitoramento da microbiota em fermentações para produção de vinho. Este novo meio de cultura mostrou um maior poder discriminatório entre as colônias de leveduras,

com base na coloração das mesmas. Também foi possível acompanhar tanto a permanência quanto a dominância de leveduras neste tipo de processo, através da contagem das colônias que mostraram colorações diferentes. O uso desta técnica de monitoramento foi validado utilizando análise molecular interdelta onde se correlacionou os diferentes fenótipos com os perfis de eletroforese. Por fim, o uso desta nova metodologia de monitoramento mostrou ser possível reduzir a demanda pelos métodos de análise moleculares de identificação induzindo maior autonomia industrial conferindo facilidade, simplicidade e economia na análise.

[005] Portanto, a inovação da presente invenção consiste em monitorar e identificar as leveduras utilizadas como inóculos *starters* durante o processo fermentativo. Trata-se de um plaqueamento em meio sólido contendo corantes capazes de diferenciar as leveduras com base na coloração das colônias, permitindo a visualização da permanência e dominância entre leveduras presentes no processo fermentativo.

ESTADO DA TÉCNICA

[006] Nos últimos anos, várias metodologias de tipagem baseados em polimorfismos de DNA têm sido desenvolvidos, os quais permitem a discriminação entre cepas de leveduras (SCHULLER *et al.*, 2004). Técnicas moleculares são exigidas para diagnosticar e caracterizar o comportamento dinâmico de leveduras durante a fermentação. Paralelamente, meios sólidos contendo corantes são utilizados frequentemente no monitoramento do processo fermentativo (PALMANN *et al.*, 2001). Além disso, os

corantes (verde de bromocresol, eosina, azul de tripano, rodamina-pink e floxina-B) e meios da genética clássica (identificam deficiência nutricional, esporulação e *mating-type*) podem ser usados como procedimentos rápidos para uma caracterização genômica preliminar (PALLMAN *et al.*, 2001). No entanto, não há relatos sobre a capacidade de monitoramento de leveduras utilizando apenas meios de cultura sem posterior análise de identificação molecular.

[007] O documento CN101397540 descreve um meio de cultura que é aplicável para a cultura de bactérias produtoras de estaurosporina. Tal meio de cultura, com um valor de pH de 7,0, compreende fontes de carbono, fontes de nitrogênio orgânico e sal inorgânico em que, o sal inorgânico compreende um sal de cálcio; as fontes de carbono são selecionadas a partir de dois ou mais de dois dos três grupos de componentes, isto é, A, B e C, em que, pelo menos, dois componentes são selecionados a partir de diferentes grupos, grupo A: glucose, grupo B: amidulina, milho amido e fécula de batata, e grupo C: aveia e maltodextrina; e/ou, as fontes de nitrogênio orgânico são selecionados a partir de bolo de soja em pó, extrato de levedura, creme de levedura e farinha de sumaúma; e/ou, o sal inorgânico é também adicionada com o sal de magnésio.

[008] O documento CN1309178 descreve um meio de cultura totalmente sintético preparado a partir dos dados medidos em linha de fontes de C, N, P e S em fermentador de múltiplos parâmetros totalmente automático FUS-50 (A) e o princípio do equilíbrio de metabólitos celulares através da otimização valor de pH, selecionando sistema tampão apropriado e adicionando sais inorgânicos C, N, P,

suficientes, vitaminas e promotor biológico. Pode expressar a proteína exógena e pode ser utilizado para a fermentação de agitação de levedura Pasteur-Pichia.

[009] O documento CN102786339 descreve um meio líquido adequado de matsutake pertencente ao setor da agricultura para produção de micélio de matsutake artificial para superar as desvantagens de baixo rendimento do meio de cultura líquido existente. Os efeitos positivos da invenção são: o meio ser selecionado em um conteúdo ótimo de amido solúvel para aumentar o volume unitário da biomassa do meio de cultura de micélio de matsutake. Os experimentos, produção de fermentação alcançou o nível mais alto de 22 g/L, meio de fermentação líquido visível adequado para a presente invenção.

[010] O documento CN102304479 descreve um meio de cultura adicionado com um hormônio vegetal, e aplicação do mesmo na fermentação de *Schizochytrium limacinum*. O meio de cultura compreende os seguintes componentes: uma fonte de carbono de glicose com uma concentração de 10 a 100 g/L; uma fonte de nitrogênio de um extrato de levedura com uma concentração de 10 a 80 g/L; água do mar que tem de 20% a 80% do volume total do meio de cultura; e um componente selecionado a partir de 6-benziladenina, furfuril aminopurina, giberelina, ácido indol butírico, ácido naftaleno acético, e heteroauxina. De acordo com a invenção, um hormônio vegetal com uma concentração adequada é adicionado ao meio de fermentação de *Schizochytrium limacinum*. Todas as citocininas de 6-benziladenina, furfuril aminopurina, giberelina, ácido indol butírico, ácido naftaleno acético, e heteroauxina ajudam a melhorar

substancialmente a velocidade de crescimento e o teor de DHA de *Schizochytrium limacinum*. Além disso, com a solução técnica proporcionada pela invenção, o custo da fermentação de *Schizochytrium limacinum* pode ser substancialmente reduzido, e a eficiência da fermentação pode ser melhorada, de modo que o desenvolvimento da indústria é favorecido.

[011] Conforme pode ser observado acima, os documentos citados como estado da técnica descrevem meios de cultura relacionados à seleção de leveduras para fermentação. No entanto, nenhum dos documentos apresenta composição química semelhante à presente invenção, composto de peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio heptahidratado, glicose, ágar, eosina amarelada e azul de tripano. Assim, constata-se que o presente pedido atende a todos os critérios legais de patenteabilidade, quais sejam: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção se refere a uma composição de meio de cultura sólido contendo corantes específicos que permitem identificar leveduras inoculadas (*starters*) durante o processo de fermentação de vinho com base na diferença entre a coloração de colônias de leveduras. Através do uso desta técnica, a verificação e quantificação de populações mistas de leveduras (contendo mais de uma linhagem de levedura) e de culturas puras ou simples (contendo apenas uma linhagem de levedura) tornam-se mais simples e rápidas. O meio de cultura proposto na presente invenção permite identificar diferenças entre a coloração das colônias dos inócuos *starters*. Uma vez que

leveduras distintas ensaiadas (gêneros e espécies) apresentam colorações diferentes no meio proposto, tal técnica pode ser aplicada para detectar tanto a presença quanto a proporção de diferentes leveduras inoculadas durante o processo fermentativo. O poder discriminatório da presente técnica pode ser comprovado em nível molecular utilizando-se análise interdelta (δ_2/δ_1), onde se comparam os perfis eletroforéticos das colônias obtidas por plaqueamento no meio proposto durante o processo de vinificação com os das leveduras utilizadas como inóculo *starter*. A comparação entre os perfis eletroforéticos resultou em bandas polimórficas idênticas. Sendo assim, a presente invenção trata de um método de grande potencialidade para o monitoramento de leveduras nos diferentes processos fermentativos com rendimento em custo e tempo de operação.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[013] A Figura 1 mostra o plaqueamento da cultura mista 63M:4LBI nos meios sólidos (1) proposto e (2) WL-Nutrient após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

[014] A Figura 2 mostra o plaqueamento da cultura mista 63M:PE-2 nos meios sólidos (1) proposto e (2) WL-Nutrient após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

[015] A Figura 3 mostra o plaqueamento da cultura mista PE-2:4LBI-3 nos meios sólidos (1) proposto e (2) WL-Nutrient após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

[016] A Figura 4 mostra o Plaqueamento da cultura

mista 63M:PE-2:4LBI nos meios sólidos (1) proposto e (2) WL-Nutrient após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

[017] A Figura 5 mostra o plaqueamento da fermentação natural (sem adição de leveduras) de mosto de uva nos meios sólidos (1) proposto e (2) WL-Nutrient após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção se refere a uma composição de meio de cultura sólido compreendendo:

- (1) 0,20 % (m/v) de peptona,
- (2) 0,15 % (m/v) de extrato de levedura,
- (3) 0,15 % (m/v) de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$),
- (4) 0,15 % (m/v) de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4),
- (5) 0,15 % (m/v) de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),
- (6) 2,00 % (m/v) de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$),
- (7) 2,00 % (m/v) de ágar,
- (8) 0,0012 % (m/v) de eosina amarelada ($\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$) e
- (9) 0,0015 % (m/v) de azul de tripano ($\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{S}_4$)

Preparação da solução estoque

[019] Foi preparada uma solução estoque 1000X concentrada para cada corante, ou seja, as concentrações das soluções estoques foram de 1,5 % (m/v) para o azul de tripano e de 1,2 % (m/v) para a eosina. Os volumes foram ajustados em balões volumétricos e a esterilização foi realizada através de filtração (0,22 µm de diâmetro). Os corantes foram estocados em frascos âmbar em geladeira a 4

°C. Para cada 100 ml de meio de cultura, foi adicionado 0,1 ml de cada corante.

Preparação do meio de cultura sólido

[020] Os reagentes (1) a (6) foram pesados e dissolvidos em água Milli-Q. O volume total desejado foi ajustado em proveta e transferido para um frasco shott e/ou erlenmeyer contendo o agar, onde foi esterelizado em autoclave por 20 min a 1 psi (6,89 KPa) de pressão. Após esterilização e esfriamento parcial, os corantes foram adicionados (soluções estoques previamente preparadas) com ponteiros estéreis ao meio de cultura e o meio foi homogeneizado e distribuído em placas de Petri. Após solidificação, o mesmo foi estocado em geladeira a 4 °C até a sua utilização.

Identificação das linhagens de levedura

1. Plaqueamento de culturas estoques de diferentes linhagens de leveduras *S. cerevisiae* no meio sólido para rastreamento de diferentes fenótipos. Foi utilizado um volume de 50 µl da suspensão celular contendo 1×10^3 cels/ml (contagem em câmara de Neubauer), o que corresponde aproximadamente 50 unidades formadoras de colônias (UFC/placa).

2. Fermentação em mosto de uva natural contendo inóculo puro (1 linhagem inoculada): plaqueamento no início, meio e fim da fermentação para rastreamento de alterações fenotípicas;

3. Fermentação em mosto de uva natural contendo inóculo misto (mais de 1 linhagem inoculada com proporção de 1:1): plaqueamento no início, meio e fim da fermentação para determinação da proporção das leveduras através de

contagem de colônias em placa (UFC);

4. Validação da metodologia utilizando análise molecular interdelta (combinação dos pares de primers delta2/delta12) através de comparação do perfil eletroforético das colônias da cultura estoque e fermentadas.

Resultados

[021] As Figuras 1 a 5 ilustram o plaqueamento realizado durante fermentações em mosto de uva natural. Três linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram escolhidas com base na distinção entre a coloração das suas colônias e quanto ao desempenho fermentativo. A Figura 1 ilustra o plaqueamento da fermentação mista entre as leveduras 63M e 4LBI. A Figura 2 ilustra o plaqueamento da fermentação mista entre as leveduras 63M e PE-2 (linhagem industrial para produção de etanol combustível). A Figura 3 ilustra o plaqueamento da fermentação mista entre as leveduras PE-2 e 4LBI e a Figura 4 ilustra o plaqueamento da fermentação mista entre as leveduras 63M, PE-2 e 4LBI. A Figura 5 ilustra o plaqueamento de uma fermentação natural (sem inoculação de linhagens *starters*) realizada pelas leveduras indígenas presentes no mosto de uva. O plaqueamento da fermentação natural revelou uma maior diversidade microbiana no meio proposto quando comparado ao meio WL-Nutrient. Os diferentes fenótipos obtidos (cor e morfologia das colônias) resultam numa análise de identificação molecular mais dirigida.

[022] O meio industrial WL-Nutrient foi utilizado como referência no presente pedido, pois é o mais utilizado no controle de processos fermentativos de produção de

cerveja e vinho. Os resultados obtidos revelaram maior seletividade quando as leveduras foram plaqueadas no meio proposto, permitindo com maior clareza visualizar os diferentes fenótipos (cor das colônias) e assim identificar e determinar a proporção das mesmas. Por outro lado, o meio WL-Nutrient não exibiu distinção entre as leveduras fazendo-se necessária análise molecular de identificação.

Avanço Técnico

[023] No âmbito de tornar as técnicas de identificação e monitoramento de leveduras no processo fermentativo mais simples e acessível, o desenvolvimento de um meio sólido baseado no uso de corantes mostrou ter potencialidade para ser utilizado como via de identificação permitindo detectar as leveduras inoculadas (*starters*) durante o processo de fermentação de vinho. Foi possível visualizar e quantificar a presença de inóculos mistos (contendo mais de uma linhagem de levedura) e de inóculos simples (contendo apenas uma linhagem de levedura) com base nas diferentes colorações das colônias de leveduras. A eficácia da técnica proposta na presente invenção foi constatada através de plaqueamento preliminar das culturas estoques utilizadas como inóculo em mosto de vinho. Como resultado, verificou-se a ocorrência de diferentes colônias baseadas na sua pigmentação. Uma vez que leveduras distintas (gênero e espécie) apresentam coloração diferente no meio proposto, esta técnica pode ser aplicada para detectar permanência e proporção de diferentes leveduras durante o processo fermentativo. A eficiência desta técnica foi comprovada em nível molecular usando-se análise interdelta ($\Delta\Delta/\Delta\Delta$) na qual os isolados obtidos

durante o processo de vinificação apresentaram perfil eletroforético idêntico aos das culturas estoques.

[024] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de meio de cultura sólido **caracterizado** pelo fato de compreender:

- 0,20 % (m/v) de peptona (1);
- 0,15 % (m/v) de extrato de levedura (2);
- 0,15 % (m/v) de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (3);
- 0,15 % (m/v) de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (4);
- 0,15 % (m/v) de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (5);
- 2,00 % (m/v) de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (6);
- 2,00 % (m/v) de ágar (7);
- 0,0012 % (m/v) de eosina amarelada ($\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$) (8); e
- 0,0015 % (m/v) de azul de tripano ($\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{S}_4$) (9).

2. Processo para preparação do meio de cultura sólido conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

- pesagem e dissolução dos reagentes (1) a (6) em água Milli-Q;
- ajuste do volume total desejado e transferência para um frasco shott e/ou erlenmeyer contendo o agar;
- esterilização em autoclave por 20 minutos a 1 psi (6,89 KPa) de pressão;
- adição dos corantes eosina amarelada e azul de tripano;
- homogeneização e distribuição em placas de petri;
- estocagem em geladeira a 4°C.

3. Processo para identificação das linhagens de levedura no meio de cultura sólido conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender as

etapas de:

- plaqueamento de culturas estoques de diferentes linhagens de levedura *S. cerevisiae* no meio de cultura sólido para rastreamento de diferentes fenótipos;
- fermentação em mosto de uva natural contendo inóculo puro;
- fermentação em mosto de uva natural contendo inóculo misto;
- validação da metodologia empregada.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de para o plaqueamento é utilizado um volume de 50 µl da suspensão celular contendo 1×10^3 cels/ml, correspondendo a 50 unidades formadoras de colônias (UFC/placa).

5. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato do inóculo puro conter um linhagem inoculada.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato do inóculo misto conter mais de uma linhagem inoculada com proporção de 1:1.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato da validação da metodologia utilizar análise molecular interdelta através da comparação do perfil eletroforético das colônias da cultura estoque e fermentadas.

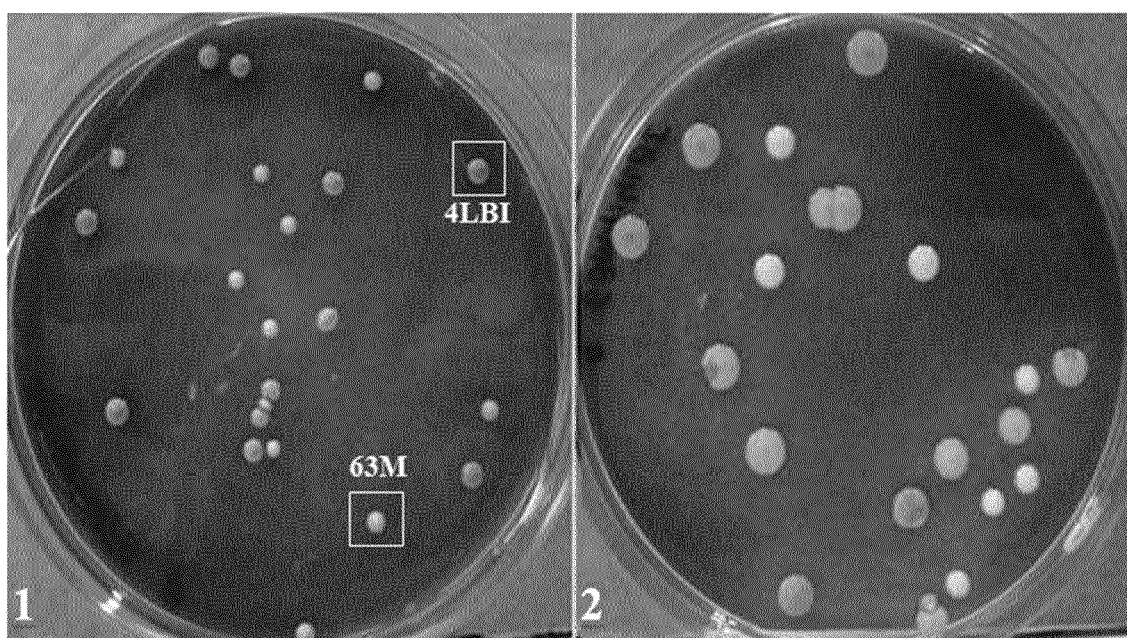


Figura 1

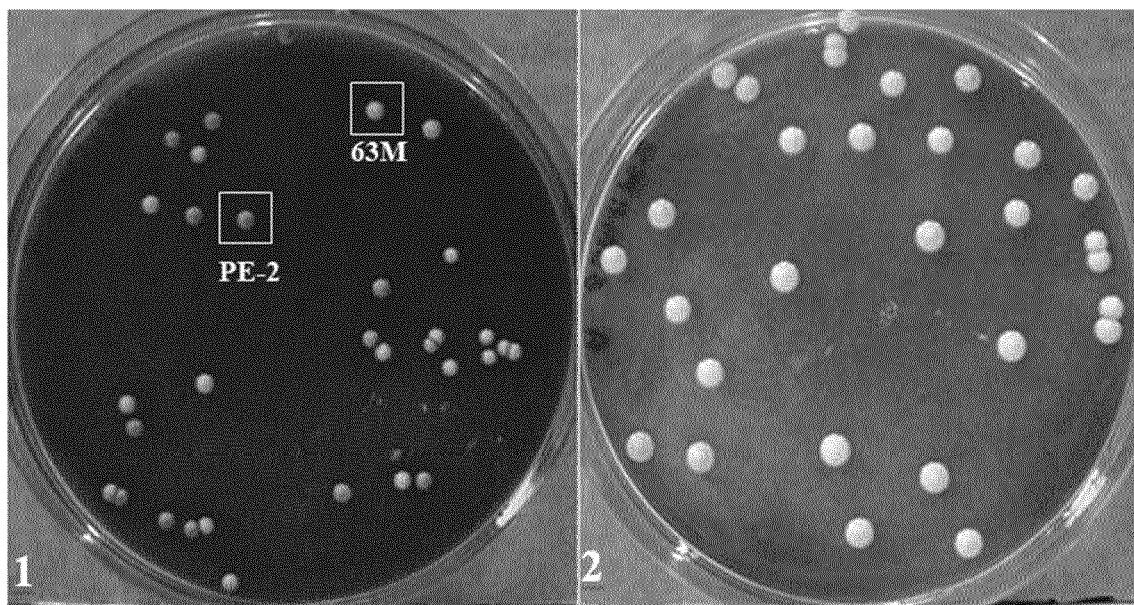


Figura 2

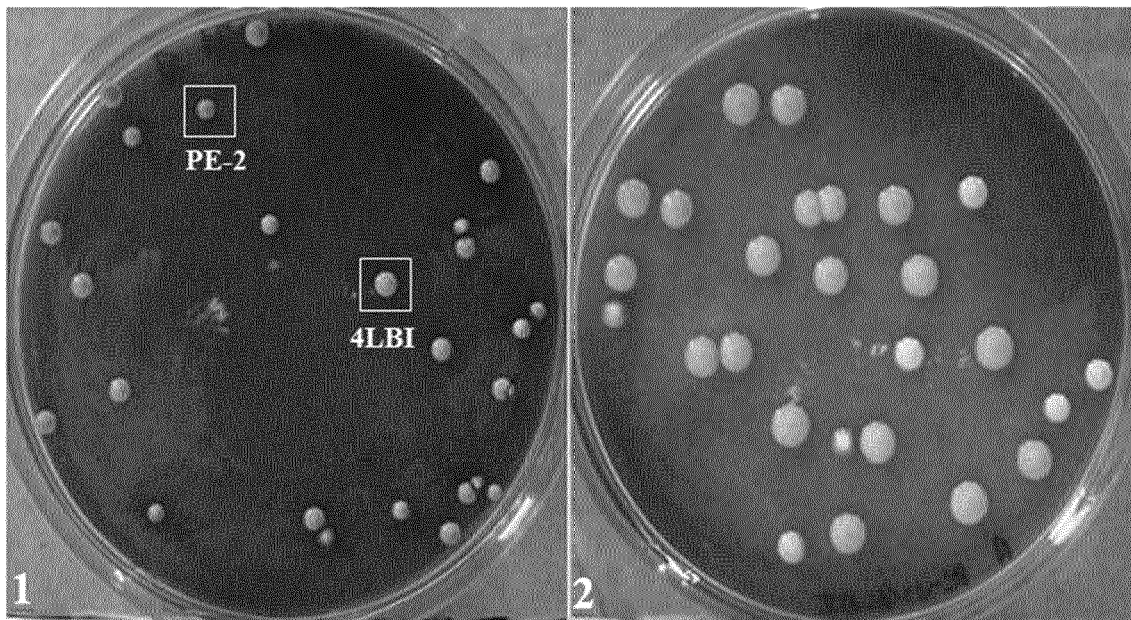


Figura 3

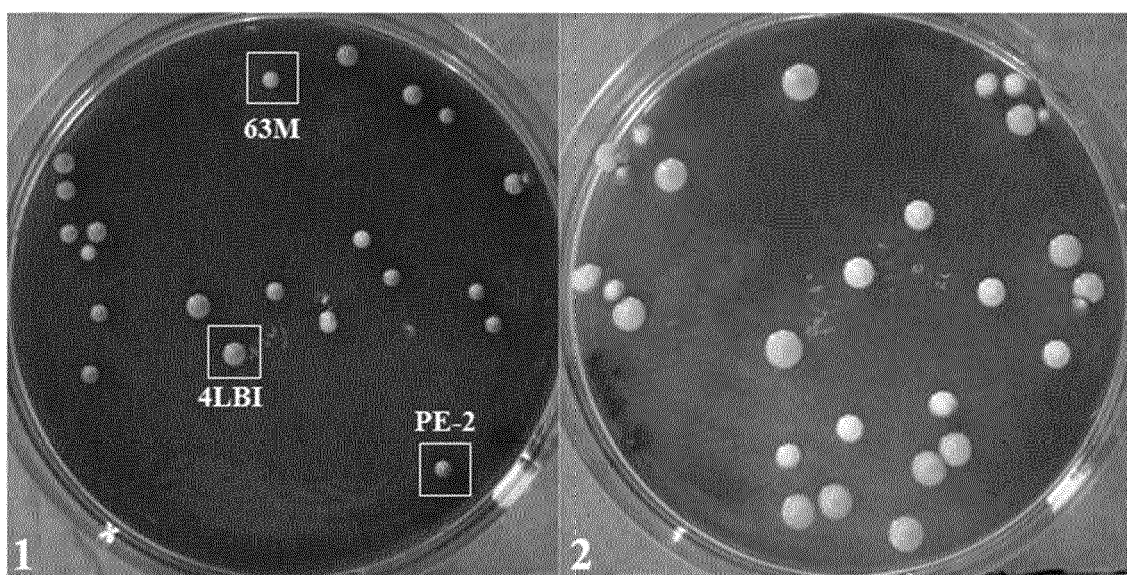


Figura 4

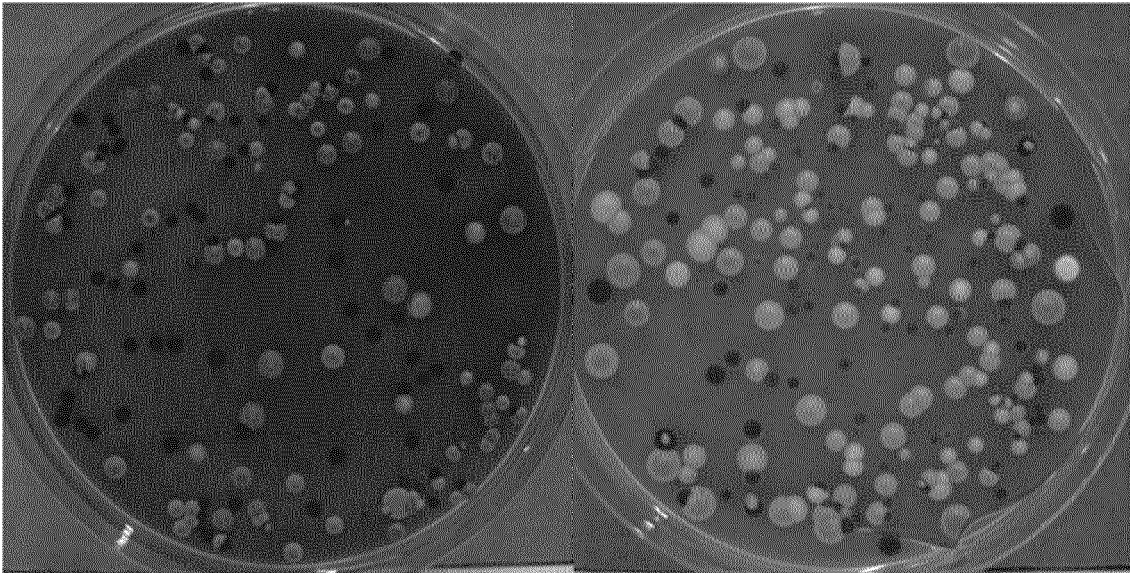


Figura 5

RESUMO**COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTURA SÓLIDO, PROCESSO PARA
PREPARAÇÃO DO MESMO E PROCESSO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS
LINHAGENS DE LEVEDURA NO REFERIDO MEIO**

A presente invenção se refere a uma composição de meio de cultura sólido contendo corantes específicos que permitem identificar leveduras inoculadas (*starters*) durante o processo de fermentação de vinho com base na diferença entre a coloração de colônias de leveduras. O meio de cultura proposto na presente invenção permite identificar diferenças entre a coloração das colônias dos inóculos *starters*. Uma vez que leveduras distintas ensaiadas (gêneros e espécies) apresentam colorações diferentes no meio proposto, tal técnica pode ser aplicada para detectar tanto a presença quanto a proporção de diferentes leveduras inoculadas durante o processo fermentativo. Além disso, a presente invenção adicionalmente propõe sua utilização nos diversos setores industriais de fermentação (biocombustíveis, cerveja e vinho) e um processo para a preparação de tal meio de cultura sólido, bem como um processo para identificação das linhagens de levedura no referido meio.