

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Uso de técnicas simples e da análise genética para determinação
de persistência e dominância de leveduras em processos
fermentativos

MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO

Tese de Doutorado
2015



Instituto de Química

MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO

Uso de técnicas simples e da análise genética para
determinação de persistência e dominância de leveduras em
processos fermentativos

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Lalue

Araraquara
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

M397u	Masiero, Maria Olivia Campos Uso de técnicas simples e da análise genética para determinação de persistência e dominância de leveduras em processos fermentativos / Maria Olivia Campos Masiero. – Araraquara : [s.n], 2015 131 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Cecilia Lalue 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. 2. Dinâmica populacional. 3. Fermentação. 4. Corantes. 5. Análise interdelta. I. Título.
-------	---

DADOS CURRICULARES

Nome: Maria Olivia Campos Masiero

Nome em citações bibliográficas: MASIERO, M. O. C.

Nacionalidade: Brasileira

Sexo: Feminino

Nascimento: 01/08/1985 – Araraquara - SP

Endereço profissional:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisco Degni nº 55

Quitandinha - Araraquara

14800-900, SP - Brasil

Endereço eletrônico: maria_oliviamasiero@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2015 Doutora em Biotecnologia.

Instituto de Química-Universidade Estadual Paulista, IQ-UNESP, Brasil.

Título: Uso de técnicas simples e da análise genética para determinação de persistência e dominância de leveduras em processos fermentativos.

Orientadora: Cecília Laluce

Bolsista CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2009 - 2011 Mestrado em Biotecnologia.

Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, IQ-UNESP, Brasil.

Título: Avaliação da tolerância de leveduras a um coquetel de inibidores que simula um hidrolisado de bagaço de cana quando

adicionado a um meio sintético. Ano de obtenção: 2011.

Orientadora: Cecilia Lalluce

Bolsista CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2004 - 2007 Graduação em Ciências Biológicas.
Centro Universitário de Araraquara - UNIARA.

Formação complementar

2014 - 2014 Curso de curta duração: *Analytical approaches in the evaluation of flavour compounds and their precursors produced during alcoholic fermentation*. Realizado em Janeiro de 2014 na. Università Degli Studi Della Basilicata – Campus di Macchia Romana, Potenza-Italia.

2011 - 2011 Curso de curta duração em Operação e instalação básica do Sistema HPLC. (Carga horária: 17h).
Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP

2011 - Atual Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Doutoranda em Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva.

2009 - 2011 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda em Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva.

2008 - 2008 Vínculo: Estagiária. Enquadramento funcional: Estagiária. Regime: Dedicação exclusiva.

2. Instituto Butantan, São Paulo, SP

2008 - 2008 Vínculo: Estágio voluntário. Enquadramento funcional: Estagiária. Regime: Dedicação exclusiva.

3. Departamento Autônomo de Água e Esgoto de Araraquara, DAAE/Araraquara, SP

2007 - 2007 Vínculo: Estagiária. Enquadramento funcional: Estagiária.

Regime: Dedicação exclusiva.

Áreas de atuação

1. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia Industrial e de Fermentação.
 2. Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica dos Micro-organismos.
 3. Ciências Biológicas / Microbiologia / Biologia e Fisiologia dos Micro-organismos.
 4. Ciências Biológicas / Biologia Molecular / Análise Interdelta / Fermentação de Bebidas.
-

Projetos

2009 - 2011 Ethanol Production from Sugarcane Bagasse: Enzymatic Pre-Treatments and Microbiological assays to evaluate Tolerance to Hydrolysates at Increasing Temperatures.

Situação: Concluído. Natureza: Projetos de pesquisa. Dra. Cecilia Lalue (Responsável).

Financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. BIOEN-FAPESP 2010/6670.

2010 - 2011 Melhorias para processos fermentativos (Elson Longo, coordenador), Sub-projeto: Propostas fisiológicas e genéticas para melhorar e monitorar a produção de bioálcool (2010 - 2011)

Situação: Concluído

Financiador: BNDES

2014 - atual Dinâmica populacional e interações entre leveduras em fermentações de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e

melaço.

Situação: Em andamento. Natureza: Projetos de Pesquisa. Dra. Cecília Laluze (Responsável).

Financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - BIOEN-FAPESP 2013/15082-2.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem.
Italiano	Compreende Bem, Fala razoavelmente, Escreve Pouco, Lê Bem.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.

Prêmios e títulos

2010	TRABALHOS VENCEDORES DO VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, São Carlos, SP.
-------------	--

Patente de Invenção: BR 10 2015 005368 1

Data do depósito: 11/03/2015

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

Inventores: Cecília Laluze (IQ)/ **Maria Olivia Campos Masiero (IQ)**/ Angela Capece (UNIBAS)/ Patrizia Romano (UNIBAS)

Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Patente de Invenção: BR 10 2013 028239-1

Data do depósito: 01/11/2013

Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Inventores: Cecília Laluze (IQ) / Jéssica Carolina Medina Gallardo (IQ) / **Maria**

Olivia Campos Masiero (IQ) / Eduardo Maffud Cilli (IQ)

Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Atividades acadêmicas relevantes

Supervisão de Iniciação Científica

Título do projeto: Avaliação e seleção de leveduras *Sacchamoryces cerevisiae* autóctones e indígenas para produção de cerveja artesanal

Aluna de graduação: Maraina Amaral Machado, estudante do quarto ano de Química do IQ-UNESP Araraquara.

Duração: 3 meses

Estágio de docência realizado no segundo semestre de 2014

Curso de graduação: Farmácia Bioquímica.

Disciplina: Biologia Molecular

Período: Integral

Professores responsáveis pela disciplina na graduação: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Doutorado Sanduíche realizado na Universidade de Basilicata-Campus Macchia Romana sob a supervisão da Profa. Dra. Patrizia Romano, no período de Setembro de 2013 a Fevereiro de 2014 em Potenza, Itália

Estágio de docência realizado no segundo semestre de 2012

Curso de graduação: Farmácia Bioquímica.

Disciplina: Bioquímica Metabólica

Período: Integral

Professora responsável pela disciplina na graduação: Profa. Dra. Maria Célia Bertolini

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MIRANDA, I.; **MASIERO, M. O.**; ZAMAI, T.; CAPELLA, M.; LALUCE, C. Improved pretreatments applied to the sugarcane bagasse and release of lignin and hemicellulose from the cellulose-enriched fractions by sulfuric acid hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. DOI: 101002/jctb.4601.

Capítulos de livros publicados

1. Laluce, C., Longo, E., Sponchiado, S., Cilli, E. M., Gallardo, J. C. M., **Masiero, M. O. C.** A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais. In: Bioenergia: Desenvolvimento, Pesquisa e Inovação. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, p. 167-195, 2012.

Resumos publicados em anais de eventos

1. **MASIERO, M. O. C.**, CORADELLO, L. F. C., GALLARDO, J. C. M., LALUCE, C. Revitalization of *Saccharomyces cerevisiae* cells between successive fed-batch fermentations for ethanol production at 37°C. In: 13th International Congress on Yeasts ICY, 2012, Madison, Wisconsin. Program & Abstracts 13th ICY 2012, p.261, Madison, 2012.

2. MORAIS, M. R.; **MASIERO, M. O. C.**; LALUCE, C. Competition between strains of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of sugarcane molasses. In: International Congress on Yeasts, 2012, Madison. Program&Abstracts 13th ICY 2012, 2012. v. 1. p. 136.

3. OLIVEIRA, K. F.; **MASIERO, M. O. C.**; LALUCE, C. Effects of lignocellulose-derived inhibitors on the fermentability and growth capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VIII Brazilian Meeting On Chemistry of Food and Beverages, 2010, São Carlos. Resumos do VIII Brazilian Meeting On Chemistry of Food and

Beverages, 2010. v. 1.

4. **MASIERO, M. O. C.**; OLIVEIRA, K. F.; SILVA, V. P.; LALUCE, C. Acetic acid: Effects on growth, fermentation and viability in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

5. OLIVEIRA, K. F.; **MASIERO, M. O. C.**; SILVA, V. P.; LALUCE, C. Lignocellulose-derived inhibitors: estimation of their effects on the fermentability and growth capacity of yeast strains. In: 4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi, 2010, Rotterdam. Programme & Abstract Book of 4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi, 2010.

6. OLIVEIRA, K. F.; **MASIERO, M. O. C.**; SILVA, V. P.; LALUCE, C. Effects of acetic acid on the yeast cells during growth on solid and liquid media. In: 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. Anais Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **MASIERO, M. O. C.**; CORADELLO, L. F. C.; GALLARDO, J. C. M.; LALUCE, C. Revitalization of *Saccharomyces cerevisiae* cells between successive fed-batch fermentations for ethanol production at 37 C. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. **MASIERO, M. O. C.**; LALUCE, C. Genetic analysis and phenotypic variations in a population of *Saccharomyces cerevisiae* during its propagation on molasses. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. MORAIS, M. R.; **MASIERO, M. O. C.**; LALUCE, C. Competition between strains of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of sugarcane molasses. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. MORAIS, M. R.; **MASIERO, M. O. C.**; CORADELLO, L. F. C.; LONGO, E.; LALUCE, C. Revitalization of the Yeast Cream to Improve the Ethanol Production in a Cell-Recycling Fermentation Process. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. **MASIERO, M. O. C.** Acetic acid: effects on growth, fermentation and viability in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster/Painel no International Congress on Yeast ICY (Congresso, 2012). Revitalization of *Saccharomyces cerevisiae* cells between successive fed-batch fermentations for ethanol production at 37° C.

2. Apresentação de Poster/Painel na XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira Bioquímica. (Congresso, 2012). Genetic Analysis and Phenotypic Variations in a Population of *Saccharomyces cerevisiae* during its Propagation on Molasses.

3. Workshop 2012 Programas de Pós-graduação Química e Biotecnologia. (Encontro).

4. 1st Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference. (Congresso, 2012).

5. Apresentação de Poster/Painel no XXXIX Annual Meeting of SBBQ. (Congresso, 2010) Acetic acid: effects on growth, fermentation and viability in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. .

6. 25° CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. (Congresso, 2009).

7. WORKSHOP DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA IQ-UNESP. (Encontro, 2009).

8. CONCISU. (Congresso, 2007).

MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

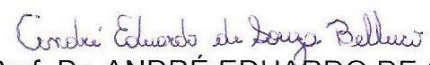
Araraquara, 13 de março de 2015.

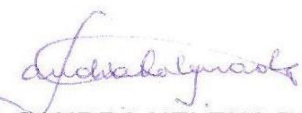
BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. CECILIA LALUCE (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara


Prof^a. Dr^a. MARIA CELIA BERTOLINI
Instituto de Química / UNESP / Araraquara


Prof. Dr. JOÃO BOSCO FARIA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara


Prof. Dr. ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO
Centro de Ciências Agrárias / UFSCAR / Araras


Prof^a. Dr^a. SANDRA HELENA DA CRUZ
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP / Piracicaba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, fruto de dedicação, perseverança e amor a pesquisa aos meus pais, Geraldo e Nely, minhas queridas irmãs Mariana, Manuela e Maria Leticia e ao meu companheiro, Guilherme.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a todos os Santos e Arcanjos que tanto ouviram minhas preces nesta etapa que se finda. Pela vida, saúde, paciência e sabedoria concedida.

A minha orientadora, Cecilia Laluce, que tanto me auxiliou desde os tempos de estagiária. Pelo seu carinho, atenção, dedicação e confiança. Por abrir as portas necessárias para esta pesquisa se tornar realidade. Pelas conversas sobre pesquisa e sobre a vida. Pelos deliciosos almoços e cafezinhos da tarde. Muito obrigada!

Aos meus pais Geraldo e Nely que eu tanto amo e admiro. Por sempre me motivarem e me ajudarem com palavras sábias nos momentos difíceis. Por me fazerem acreditar que nós podemos sim e que a conquista é questão de tempo, boa vontade e perseverança. Amo vocês!

As minhas irmãs que são meu orgulho: Mariana, Manuela e Maria Letícia, por tanta amizade, apoio, aprendizado, carinho e amor. Pelas diferenças, por tantas risadas e conselhos. Obrigada!

Ao meu parceiro Guilherme, que tanto me aturou nos momentos complicados. Por tanto ter que escutar e tentar entender um pouco sobre a pesquisa. Pelo seu apoio, atenção, carinho e amor. Por acreditar que o amor existe e resiste à distância. Amo você.

As minhas amigas de longa data, Sarah, Naly, Flávia e Aline por tantos momentos prazerosos, por tanta descontração, risadas e altos papos. Beijos para cada uma de vocês!

Aos amigos de laboratório, Luiz Fernando, Meline, Jéssica e Andrea. Por tanta amizade, respeito e carinho. Por tantos desabafos, ajuda e dicas. Pelas sextas-feiras inesquecíveis pós laboratório, tantas histórias, risadas até cair que jamais me esquecerei. Pela concretização de uma bela amizade. Saudades sem fim! Ismael, Ricardo e Jufner, pela colaboração, amizade e respeito.

A minha orientadora italiana, Patrizia Romano e sua pesquisadora Angela Capece, que abriram as portas do seu laboratório, no qual eu tive muita realização profissional e pessoal. Pela dedicação, paciência e muita atenção. Por tanto me ajudarem e me acolherem dentro e fora do laboratório. *Grazie mille!*

Pelas amigas de laboratório da Itália, Rossana, Rockina, Paola, Gabriela e Mariana. Obrigada pela paciência, carinho e ensinamentos. Por me fazerem sentir em casa, por tantas risadas, tantas *birras*, *spaghetti*, *gelato*, pela troca de conhecimento.

Aos amigos da casa de estudantes ARDSU, Antonella, Emanuela, Valentina, Michele, Rossa, Veronica, Kim, Porsche. Obrigada por tanto acolhimento, conhecimento, viagens, risadas e aventuras sem fim. *Grazie per amicizia!*

Ao técnico de Laboratório Fernando Delfino que sempre nos ajudou e resolveu os problemas cotidianos de um laboratório.

A equipe da seção de pós-graduação, sempre atenciosos e dedicados, em especial a Wenia e Célia que tanto resolveram e responderam as minhas inúmeras dúvidas.

Ao Instituto de Química de Araraquara, pela infraestrutura para realização de tantas pesquisas.

A equipe de bibliotecárias, que revisam e corrigem com tanto zelo as Referências Bibliográficas de todos os alunos desta pós-graduação.

A banca examinadora, por terem colaborado em participar desta defesa, pelas críticas e conselhos que certamente enriquecerão este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida e ao programa de bolsas de estudo no exterior da CAPES - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada!

Resumo

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada em processos fermentativos, pois é capaz de converter eficientemente os açúcares presentes no meio de cultivo em álcool. Esta conversão permite a produção de biocombustíveis como o etanol, e a produção de bebidas alcoólicas, como vinho, cerveja e cachaça. Durante a fermentação, as leveduras são expostas a estresses alcoólico, osmótico, nutricional, térmico e ácido. Esses estresses induzem o aparecimento de mutações, causando instabilidade no processo fermentativo. O reciclo celular durante as fermentações sucessivas agravam o ecossistema do processo através de contaminação por bactérias e consequentemente competição entre espécies e pelo substrato, porém o reuso celular diminui o tempo e o custo das fermentações. A garantia de que o inóculo *starter* estará presente durante as fermentações é outro aspecto de relevância nas indústrias, pois a dominância e persistência da levedura inoculada garante maior reprodutibilidade do processo. Técnicas simples de monitoramento de leveduras em processos fermentativos ainda não foram bem definidas por isso, um *screening* de corantes em meios sólidos e meios de indução de esporulação foram utilizados na busca de identificar instabilidade fenotípica das linhagens inoculadas durante as várias etapas do processo fermentativo. A partir desse *screening*, obteve-se o desenvolvimento de meios sólidos que permitiram identificar diferentes linhagens de leveduras com base nas diferentes pigmentações das colônias. O seu uso durante as fermentações simples e mistas permitiu monitorar a estabilidade fenotípica das leveduras inoculadas bem como acompanhar a proporção de linhagens dominantes e persistentes no processo. Essa técnica de monitoramento foi aplicada aos processos fermentativos de produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar e de produção de vinho a partir de mosto natural de uva. A sua capacidade de monitorar diferentes linhagens inoculadas em consórcio e em diferentes processos fermentativos foi validada através da técnica molecular interdelta. Comparações entre os perfis polimórficos das culturas estoques com os das colônias crescidas nos meios sólidos cromogênicos resultaram em bandas idênticas. Com isso, a identificação de leveduras por meio da coloração de colônias demonstrou ser altamente viável para elucidar a dinâmica populacional quanto à persistência e dominância de linhagens *starters* em processos fermentativos.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae* • dinâmica populacional • meio sólido cromogênico • análise interdelta • fermentação

Abstract

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is the most used yeast in fermentation processes because it is able to efficiently convert the sugars present in the medium into alcohol. This conversion allows the production of biofuels such as ethanol, and the production of beverages such as wine, beer and *cachaça*. During fermentation, yeasts are exposed to several stresses such as alcoholic, osmotic, nutritional, thermal and acid, which could induce the appearance of mutations causing instability in the fermentation process. Cell recycling aggravates the ecosystem of the process during successive fermentations due to the high concentration of contaminants, especially bacteria, which lead to a competition among species for substrate. However, it is known that cell reuse reduces time and cost of fermentation. Another relevant issue in industrial processes is the maintenance and survival of the starter inoculum during the whole fermentation, where dominance and persistence of the inoculated yeast ensures greater reproducibility of the process. Simple yeast monitoring techniques in fermentation processes have not been well defined due to this dynamic population. In the present work, a screening of dyes used in solid media and sporulation induction media were carried out in order to identify phenotypic instability of strains inoculated during the various stages of fermentation. It was possible to obtain a solid medium capable of identifying different yeast strains based on the difference of the colony pigmentation. Its use during the simple and mixed fermentation would enable monitor the phenotypic stability of starter yeasts and the proportion of dominant and persistent strains along the process. This monitoring technique was applied to ethanol fermentation using sugarcane molasses and to wine production from natural grape must and validated by interdelta molecular technique. Comparisons between the polymorphic profiles of cultures stocks with the colonies grown on solid media chromogenic resulted in identical bands. Thus, the identification of yeast colonies by coloration proved to be highly feasible to elucidate the population dynamics as persistence and dominance of the starters strains in fermentation processes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* • population dynamics • chromogenic solid medium • interdelta analysis • fermentation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processamento industrial da cana-de-açúcar para produção de bioetanol.....	33
Figura 2 – Ciclo de divisão celular da levedura <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 3 – Possíveis mecanismos e sinalizações da via metabólica da glicose em <i>S. cerevisiae</i>	38
Figura 4 – Propagação do inóculo realizada em quatro etapas com concentrações crescentes de ART (3; 5; 8 e 12 %). Leveduras propagadas em mesa agitadora a 100 rpm a 34 °C e a 37° C.....	54
Figura 5 – Mini-reator utilizado durante as fermentações em batelada-alimentada	55
Figura 6 – Fermentação do mosto natural de uva vermelha.....	57
Figura 7 – Plaqueamento da levedura 63M-1 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.....	67
Figura 8 – Plaqueamento da levedura 63M-2 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.....	69
Figura 9 – Plaqueamento da levedura 63M-3 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.....	70
Figura 10 – Plaqueamento da levedura PE-2 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.....	71
Figura 11 – Ilustração dos isolados (variantes fenotípicos, colônias ampliadas) obtidos após plaqueamento da levedura 63M-2.....	72

Figura 12 – Correlação entre marca de auxotrofia (crescimento negativo em meio mínimo) versus coloração das colônias dos isolados da levedura 63M-2 obtidos por plaqueamento nos meios sólidos diferenciais após a propagação a 34 °C e a 37 °C.....	73
Figura 13 – Frequência de esporulação da cultura estoque, propagada a 34 °C e a 37 °C das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 realizada em meio contendo 1 % (m/v) de acetato de potássio, agitação de 125 rpm a 30 °C. Medidas realizadas após 2 e 7 dias de incubação.....	75
Figura 14 – Plaqueamento das leveduras 63M-1 e PE-2 nos meios BTV e WLN para estabelecimento do meio de cultura a ser utilizado no monitoramento das fermentações. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.....	76
Figura 15 – Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura 63M-1 e de amostras coletadas de reatores após 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo a 40°C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.....	81
Figura 16 – Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura 63M-2 e de amostras coletadas de reatores após 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo a 40 °C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.....	82
Figura 17 – Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura 63M-3 e de amostras coletadas de reatores após 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo a 40 °C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.....	84
Figura 18 – Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura PE-2 e de amostras coletadas de reatores após 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo a 40 °C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.....	85
Figura 19 – Frequência de esporulação da cultura estoque das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 e das amostras coletadas de reatores após 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo a 40 °C. Células incubadas em meio contendo 1 % (m/v) de acetato de potássio, agitação de 125 rpm a 30°C.....	87

Figura 20 – Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura 63M-1 em gel de agarose 1,2 % (m/v). M: marcador 100 pb; 1 e 6: levedura estoque; 2 e 7: levedura propagada; 3 e 8: levedura final 1° ciclo fermentativo; 4 e 9: levedura final 3° ciclo fermentativo e; 5 e 10: levedura final 5° ciclo fermentativo.....	88
Figura 21 – Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura 63M-2 em gel de agarose 1,2 % (m/v). M: marcador 100 pb; 1 e 6: levedura estoque; 2 e 7: levedura propagada; 3 e 8: levedura final 1° ciclo fermentativo; 4 e 9: levedura final 3° ciclo fermentativo e; 5 e 10: levedura final 5° ciclo fermentativo.....	89
Figura 22 – Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura 63M-3 em gel de agarose 1,2 % (m/v). M: marcador 100 pb; 1 e 6: levedura estoque; 2 e 7: levedura propagada; 3 e 8: levedura final 1° ciclo fermentativo; 4 e 9: levedura final 3° ciclo fermentativo e; 5 e 10: levedura final 5° ciclo fermentativo.....	89
Figura 23 – Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura PE-2. em gel de agarose 1,2 % (m/v). M: marcador 100 pb; 1 e 6: levedura estoque; 2 e 7: levedura propagada; 3 e 8: levedura final 1° ciclo fermentativo; 4 e 9: levedura final 3° ciclo fermentativo e; 5 e 10: levedura final 5° ciclo fermentativo.....	90
Figura 24 – Monitoramento da população mista das leveduras 63M-3 e PE-2 durante ciclos sucessivos de fermentação através de plaqueamentos nos meios N1, BTV e WLN. Placas incubadas durante cinco dias a 30 °C.....	93
Figura 25 – Concentração e proporção do inóculo (UFC/mL x 10 ⁷) obtidos através de contagem de colônias nos meios sólidos cromogênicos das fermentações sucessivas mistas das leveduras 63M-3 e PE-2 realizadas a 40 °C.....	94
Figura 26 – Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta utilizando par de <i>primers</i> delta2/delta12 em gel de agarose 1,2 % (m/v) das colônias de leveduras 63M-3 e PE-2 plaqueadas durante as fermentações mistas.....	95

Figura 27 – Perfis eletroforéticos de linhagens <i>S. cerevisiae</i> obtidos através de amplificação por PCR da análise interdelta com par de <i>primers</i> delta2/delta12 em gel de agarose 1,2 % (m/v).....	99
Figura 28 – Perfis eletroforéticos de linhagens <i>S. cerevisiae</i> obtidos através de amplificação por PCR da análise interdelta com par de <i>primers</i> delta12/delta21 em gel de agarose 1,2 % (m/v).....	100
Figura 29 – Dendograma da Análise Cluster Combinada dos resultados obtidos da amplificação da região interdelta (pares de primers d2/d12, d12/d21 e d2/d21) das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> provenientes de diferentes países e destinadas a diferentes processos fermentativos.....	101
Figura 30 – Produção de CO ₂ e medidas dos sólidos totais dissolvidos (°Brix) durante a fermentação de vinho utilizando inóculo puro e misto (proporção 1:1) das leveduras: 63M-1, PE-2 e 4LBI-3. Fermentação contendo concentração inicial de 22,2 °Brix, 1X10 ⁷ céls/mL, pH 3,8. A fermentação foi realizada durante 14 dias a 26 °C	109
Figura 31 – Plaqueamento da cultura mista 63M-1:4LBI-3 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.....	113
Figura 32 – Plaqueamento da cultura mista 63M-1:PE-2 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.....	113
Figura 33 – Plaqueamento da cultura mista PE-2:4LBI-3 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.....	113
Figura 34 – Plaqueamento da cultura mista 63M-1:PE-2:4LBI-3 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do melaço de cana-de-açúcar e do mosto de uva...	39
Tabela 2 – Nome, origem e referência das leveduras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.....	48
Tabela 3 – Acúmulo de biomassa, produção de etanol e manutenção da viabilidade das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 durante fermentações sucessivas em melaço de cana-de-açúcar realizada em batelada alimentada contendo 20 % (ART), 24 g/L de inóculo, pH 4,5 a 40 °C por 6 h.....	79
Tabela 4 – Comparação da produção de etanol, acúmulo de biomassa e manutenção da viabilidade entre as fermentações sucessivas utilizando inóculo puro e misto (proporção 1:1) das leveduras 63M-3 e PE-2. Fermentação realizada em melaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada contendo 20 % (ART), 24 g/L de inólulo, pH 4,5 a 40 °C por 6 h.....	92
Tabela 5 – Caracterização tecnológica de leveduras para produção de vinho: resistência ao dióxido de enxofre, produção de sulfeto de hidrogênio e ausência ou presença do fenótipo <i>killer</i>	98
Tabela 6 – Produção de dióxido de carbono durante a fermentação de mosto natural de uva vermelha contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C....	104
Tabela 7 – Medidas dos sólidos totais dissolvidos durante a fermentação do mosto natural de uva vermelha contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.....	106
Tabela 8 – Produção de compostos voláteis após a fermentação (14 dias) do mosto natural de uva vermelha contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.....	107
Tabela 9 – Produção de compostos voláteis obtidos no final de fermentação de mosto natural de uva vermelha utilizando inóculo misto (proporção 1:1) contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
μL	microlitro
μm	micrometro
ART	açúcar redutor total
psi	pound square inch
ATP	adenosina tri fosfato
céls/mL	células por mL
CO ₂	gás carbônico
g	gramas
g/L	gramas por litro
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
M	molar
m/v	massa volume
mg/L	miligramas por litro
mL	mililitro
mM	milimolar
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SO ₂	dióxido de enxofre
WLN	Wallerstein Laboratory Nutrient
YPD	extrato de levedura, peptona e glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1. Processo Fermentativo.....	31
1.1.1. Produção de bioetanol.....	32
1.1.2. Produção de Vinho.....	34
1.2. A levedura <i>S. cerevisiae</i>	35
1.2.1. Metabolismo da levedura <i>S. cerevisiae</i>	37
1.3. Leveduras <i>starters</i> dos processos fermentativos: persistência e dominância.....	39
1.4. Interação entre micro-organismos no processo fermentativo.....	40
1.5. Instabilidade nos processos fermentativos.....	41
1.5.1. Relevância da estabilidade genética e sua manutenção.....	42
1.6. Técnicas de monitoramento de leveduras em processos fermentativos.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1. Leveduras e manutenção de culturas.....	48
3.2. Meios sólidos de cultura.....	48
3.2.1. Meio YPD.....	48
3.2.2. Meio mínimo.....	49
3.2.3. Meio WLN.....	49
3.2.4. Meio basal para adição de corantes.....	49
3.2.5. Meio N1.....	50
3.2.6. Meio para atividade <i>killer</i>	51
3.2.7. Meio BiGGY.....	52
3.2.8. Meio para teste de resistência ao dióxido de enxofre.....	53
3.3. Fermentação em escala de laboratório: melaço de cana-de-açúcar.....	53
3.3.1. Matéria-prima e tratamento.....	53
3.3.2. Propagação do inóculo.....	54

3.3.3. Fermentações em batelada alimentada.....	55
3.3.4. Fermentações sucessivas: inóculos puros e mistos.....	56
3.4. Fermentação em escala de laboratório: mosto de uva natural.....	56
3.4.1. Matéria-prima e tratamento.....	56
3.4.2. Propagação do inóculo.....	56
3.4.3. Fermentação do mosto natural de uva.....	56
3.4.4. Medidas de dióxido de carbono (CO ₂).....	57
3.4.5. Medidas dos sólidos totais dissolvidos: °Brix.....	57
3.5. Ensaio analítico e microbiológico.....	58
3.5.1. Biomassa celular.....	58
3.5.2. Viabilidade celular.....	59
3.5.3. Contagem do número de células para plaqueamento nos meios sólidos.....	60
3.5.4. Açúcar redutor total.....	60
3.5.5. Etanol.....	61
3.5.6. Compostos voláteis.....	61
3.5.7. Análise estatística.....	62
3.6. Análise molecular.....	62
3.6.1. Extração de DNA.....	62
3.6.2. Amplificação de DNA e <i>primers</i>	62
3.6.3. Análise de agrupamento.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1. SELEÇÃO DE MEIOS DIFERENCIAIS PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA.....	66
4.1.1. Acompanhamento da estabilidade fenotípica das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2.....	66
4.1.2. Detecção da capacidade de esporulação usando meio de acetato de potássio.....	74
4.1.3. Desenvolvimento de meio de cultura para determinação de dominância e persistência de leveduras.....	75
4.2. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DAS	

LEVEDURAS 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 DURANTE FERMENTAÇÕES SUCESSIVAS EM BATELADA ALIMENTADA A 40 °C UTILIZANDO INÓCULO PURO.....	77
4.2.1. Monitoramento dos parâmetros fermentativos durante as fermentações sucessivas: acúmulo de biomassa, produção de etanol e manutenção da viabilidade.....	77
4.2.1.1. Monitoramento da estabilidade das leveduras durante as fermentações sucessivas: meios sólidos cromogênicos, capacidade de esporulação e análise interdelta.....	79
4.2.1.2. Monitoramento das fermentações sucessivas: plaqueamentos nos meios N1, BTV e WLN.....	80
4.2.1.3. Monitoramento das fermentações sucessivas: capacidade de esporulação.....	86
4.2.1.4. Monitoramento das fermentações sucessivas: análise interdelta..	87
4.3. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DURANTE FERMENTAÇÕES SUCESSIVAS EM BATELADA ALIMENTADA A 40 °C UTILIZANDO INÓCULO MISTO.....	90
4.3.1. Monitoramento dos parâmetros fermentativos durante as fermentações sucessivas: acúmulo de biomassa, produção de etanol e manutenção da viabilidade.....	91
4.3.2. Monitoramento das fermentações sucessivas: análise de dominância e persistência.....	92
4.3.3. Validação do monitoramento das fermentações sucessivas: análise interdelta.....	94
4.4. CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS INDÍGENAS PARA PRODUÇÃO DE VINHO.....	96
4.4.1. Caracterização de leveduras para produção de vinho: resistência ao dióxido de enxofre, produção de sulfeto de hidrogênio e atividade <i>killer</i>	96
4.4.2. Caracterização genética das leveduras: análise interdelta e de agrupamento.....	98
4.5. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DURANTE FERMENTAÇÃO EM MOSTO NATURAL DE UVA VERMELHA	

UTILIZANDO INÓCULO PURO: PRODUÇÃO DE CO ₂ , °BRIX E COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	102
4.5.1. Monitoramento da fermentação de mosto natural de uva vermelha utilizando inóculo puro: produção de CO ₂	102
4.5.2. Monitoramento da fermentação de mosto natural de uva vermelha utilizando inóculo puro: °Brix.....	105
4.6. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DURANTE FERMENTAÇÃO EM MOSTO NATURAL DE UVA VERMELHA UTILIZANDO INÓCULO MISTO: INTERAÇÕES ENTRE LEVEDURAS INDÍGENAS E NATIVAS.....	108
4.6.1. Fermentações do mosto de uva utilizando inóculo misto: interações entre leveduras destinadas a produção de bioetanol (63M-1 e PE-2) e de vinho (4LBI-3).....	108
4.6.2. Monitoramento da fermentação de vinho utilizando inóculo misto: análise interdelta <i>versus</i> plaqueamentos.....	112
5. CONCLUSÕES.....	116
REFERÊNCIAS.....	119
APÊNDICE.....	127

Introdução

1. Introdução

1.1. Processo Fermentativo

A palavra fermentação é derivada da palavra latina “*fervere*”, que significa ebulição. Isto foi usado por Pasteur para nomear ações microbiológicas envolvendo açúcar como substrato resultando em liberação de gás, o que dava a impressão de ebulição (ALENCAR et al., 2009). O processo fermentativo é uma das mais antigas reações bioquímicas conhecidas pelo homem. No Egito antigo (5.000 antes de Cristo) já se usava a fermentação, porém sem conhecimento científico pelo processo.

Desde a descoberta da fermentação em 1897 pelo bioquímico Eduard Buchner, em extratos de células de levedura, até a elucidação da via completa em leveduras (por Otto Warburg e Hans von Euler-Chelpin) e em células musculares (por Gustav Embden e Otto Meyerhof) na década de 1930, estas reações foram o objetivo principal da pesquisa bioquímica (NELSON; COX, 2014).

A fermentação é um termo geral para degradação anaeróbia da glicose para obtenção de energia na forma de ATP. Carboidratos presentes no meio são transformados em etanol e gás carbônico através do metabolismo anaeróbico das leveduras (ALENCAR et al., 2009).

Dentre os processos fermentativos para produção de etanol destaca-se a produção de bioetanol (primeira e segunda geração) e a produção de bebidas alcoólicas (cachaça, vinho e cerveja). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal micro-organismo do processo, porém outras leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Picchia* dentre outros são encontrados no processo desempenhando papel prejudicial à fermentação (OLIVA-NETO et al., 2013).

No presente trabalho, os processos fermentativos para produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar e vinho a partir de mosto natural de uva vermelha terão maior enfoque, pois foram os processos fermentativos utilizados para o estudo de desenvolvimento de tecnologia simples de monitoramento de leveduras.

1.1.1. Produção de bioetanol

O interesse econômico na cana-de-açúcar tem aumentado significativamente devido ao aumento mundial na demanda pela produção de energia sustentável (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). O etanol é o biocombustível mais consumido no mundo sendo o Brasil o primeiro a introduzir este combustível por meio de energia renovável (BASSO et al., 2011). Durante décadas, o Brasil foi o principal produtor, porém, sua produção foi superada pelos Estados Unidos quanto à produção volumétrica de bioetanol (VALDES, 2007).

O objetivo industrial no processamento da cana-de-açúcar (Fig. 1) é obter os produtos etanol e açúcar (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011) e para isto, várias etapas são necessárias as quais são divididas em aquecimento, floculação, filtração, fermentação e destilação. Os produtos resultantes (açúcar e etanol) são altamente puros, ou seja, praticamente livres de contaminação por outras moléculas orgânicas (LEME JUNIOR; BORGES, 1965 apud CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

O processo de produção de bioetanol no Brasil é caracterizado pela fermentação industrial de larga escala em biorreatores (0,5 a 3 milhões de litros) contendo alta densidade celular (10-15 %, m/v). Cerca de 85 % das destilarias utilizam o processo fermentativo de batelada-alimentada com reciclo de células, também denominado de *Melle-Boinot*, e apenas 15 % são por processos de fermentação contínua (GODOY et al., 2008).

A fermentação em batelada alimentada é um processo que consiste na adição do inóculo no tanque de fermentação no início do processo. O biorreator é alimentado pela adição constante de substrato, o qual é adicionado até completar o volume final da fermentação (ANDRIETTA et al., 2011). Por outro lado, o processo de fermentação contínua é realizado por meio de um sistema de 4 biorreatores ligados em série no qual o substrato e as células de leveduras são adicionados simultaneamente de maneira contínua e controlada (ANDRIETTA et al., 2011).

Estas fermentações (batelada alimentada e contínua) são realizadas em mosto de caldo de cana-de-açúcar, melaço ou em uma mistura de ambos em um curto período (6 - 12 h). Ao final da fermentação, a concentração alcoólica chega a 7-11 % (v/v), contendo baixa ($\leq 0,1\%$) concentração de açúcar redutor total (ART). A seguir, o mosto fermentado é centrifugado para coletar as células de leveduras, que

serão posteriormente tratadas com ácido sulfúrico (pH 2 - 2,5) para redução da contaminação bacteriana. Após 2 -3 h de tratamento ácido, as células de levedura retornam para o biorreator dando início a um novo ciclo de fermentação (AMORIM et al., 2011). No processo de fermentação em batelada alimentada, as células de levedura são reutilizadas pelo menos duas vezes por dia, fazendo deste perfil fermentativo, uma alternativa na redução da propagação celular intensiva (BASSO et al., 2011).

No passado, as plantas de etanol utilizavam levedura de pão como inóculo *starter* devido seu baixo custo e disponibilidade (BASSO et al., 2008). Atualmente, as destilarias optam por iniciar o processo com linhagens de leveduras selecionadas. Quatro linhagens (CAT-1; PE-2; SA-1 e BG-1) estão sendo produzidas em larga escala e comercializadas para iniciar os processos de fermentação alcoólica (ANDRIETTA et al., 2011).

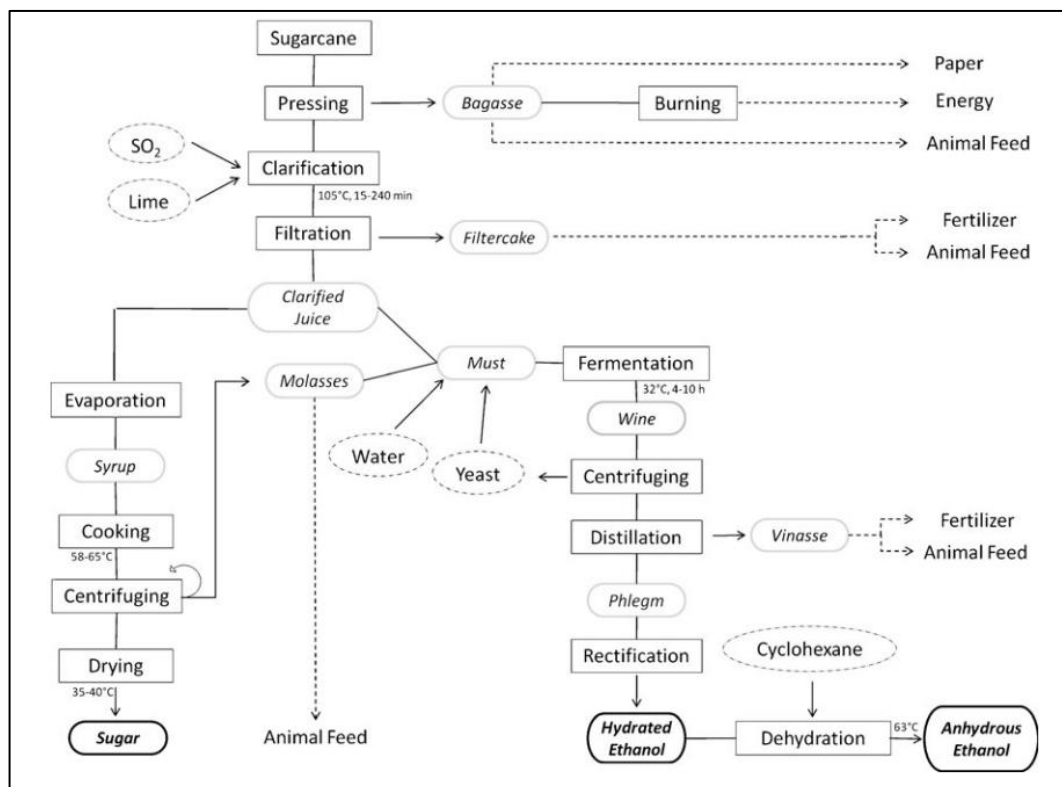


Figura 1. Processamento industrial da cana-de-açúcar para produção de bioetanol. Fonte: CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011.

1.1.2. Produção de Vinho

O vinho é o produto de complexas interações entre fungos, leveduras e bactérias. Estes micro-organismos dão início à fermentação e continuam durante todo o processo fermentativo até o seu engarrafamento (FLEET, 2003). O vinho está na humanidade desde os primórdios da civilização e tem seguido os seres humanos e a agricultura ao longo de diversas vias de migração. A sua descoberta presumivelmente desempenhou parte da sua gênese há mais de 7.000 anos onde uvas danificadas fermentadas espontaneamente em vasos para colheita tiveram a sua bebida alcoólica resultante provada por agricultores curiosos. Estes agricultores gostaram do que provaram e de seus efeitos dizendo que preferiram o suco de uva fermentado ao invés do suco de uva não fermentado. A partir disso, o destino da uva foi selado (revisado em CHAMBERS; PRETORIUS, 2010).

O suco de uva fresco esmagado é conhecido por ter sua fermentação iniciada com diversas leveduras, principalmente as do gênero *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* (FLEET, 2008). Esse primeiro estágio de fermentação realizado por leveduras não-*Saccharomyces* é denominado de fermentação espontânea e/ou natural, no entanto, a espécie *S. cerevisiae* é a linhagem que frequentemente domina a população da metade até o final do processo fermentativo (FLEET, 2003).

As fermentações do suco de uva normalmente são conduzidas pelos processos em batelada e contínua (FLEET, 2008). Quase todos os vinhos são produzidos pela fermentação em batelada, onde o suco é inserido em um frasco e este é mantido até a fermentação ser completada, normalmente após 5-10 dias (DIVIES, 1993). Neste processo existem duas opções de fermentação do vinho: espontânea e/ou natural, ou utilizando uma cultura *starter* (PRETORIUS, 2000), ou seja, a fermentação inoculada com uma linhagem selecionada. Este é um processo no qual o crescimento, as atividades bioquímicas das leveduras e o controle das variáveis (temperatura, agitação e aeração) são bem elucidados (DIVIES, 1993). Por outro lado, trata-se de um processo lento, onde a fermentação é dependente do crescimento das células de levedura e por ser uma fermentação descontínua (em batelada), uma nova batelada de vinho não pode ser realizada antes de a fermentação ser completada e removida dos frascos (FLEET, 2008).

A fermentação contínua é caracterizada por operar em vários biorreatores conectados em série onde o volume do substrato permanece constante e as células de leveduras são usualmente imobilizadas (CLEMENTE et al., 2011). Este é um processo no qual alta densidade de células é utilizada como inóculo ($10^9 - 10^{10}$ céls/mL) resultando em um processo mais rápido, eficiente, de fácil controle e baixo custo (RAO et al., 2009).

A inoculação, para ambos os processos (batelada e contínuo) apresentam aspecto tecnológico relevante, uma vez que culturas selecionadas de *S. cerevisiae* devem gerenciar e dominar a fermentação alcoólica resultando em um vinho com propriedades sensoriais e organolépticas de alta qualidade (MOLINA et al., 2009).

1.2. A levedura *S. cerevisiae*

As leveduras estão presentes na água, ar e solos. O habitat ideal é aquele que contem alto teor de açúcar e pH próximo a 5, porem, são capazes de se desenvolverem em ambientes com baixo grau de umidade e alta concentração de sal. Estas características facilitam o seu isolamento e manutenção de cultura (PELCZAR et al., 1996; TORTORA et al., 2012)

As leveduras pertencem ao grupo ascomicetos ou basidiomicetos, também denominado de fungos superiores. São micro-organismos unicelulares, eucariotos com alto grau de organização celular apresentando núcleo celular (delimitado por uma membrana nuclear), mitocôndria (responsável pelo metabolismo energético da célula), vacúolos (reservatório de nutrientes, enzimas e produtos tóxicos), retículo endoplasmático e Complexo de Golgi. A parede celular apresenta uma estrutura rígida constituída de glicanas, quitina e mananas (~ 25 % do peso da célula), que auxiliam na proteção da célula. Possuem metabolismo aeróbico e anaeróbico facultativo. São quimio-heterotróficas, ou seja, necessitam de componentes orgânicos externos como fonte de energia e carbono (WALKER, 1998; TORTORA et al., 2012).

A morfologia celular das leveduras pode ser de forma esférica, elipsoidal ou cilíndrica. O tamanho e forma (1-5 μm de largura e 5-12 μm de comprimento) das células são dependentes das condições ambientais, tais como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (PELCZAR et al., 1996; WALKER, 1998).

As leveduras podem existir tanto na forma haploide (n), contendo metade do material genético quanto na forma diploide ($2n$). Em ambientes onde há escassez de nutrientes, as células diploides iniciam meiose (Fig. 2) formando esporos haploides que são mais resistentes às condições adversas. Os esporos formados contêm diferentes reações de acasalamento ou *mating-type* denominados de a e α . Em ambientes favoráveis, estes esporos (cruzamento entre células haploides a e α) podem novamente gerar células diploides através da reprodução sexuada (HERSKOWITZ, 1988).

As células diploides das leveduras se reproduzem de forma assexuada, gerando células filhas idêntica à célula mãe. A reprodução ocorre por meio de uma protuberância na célula mãe denominada de brotamento, o qual pode ser monopolar, bipolar ou multilateral. Os brotos gerados normalmente se desprendem da célula mãe iniciando um novo ciclo de reprodução assexuada.

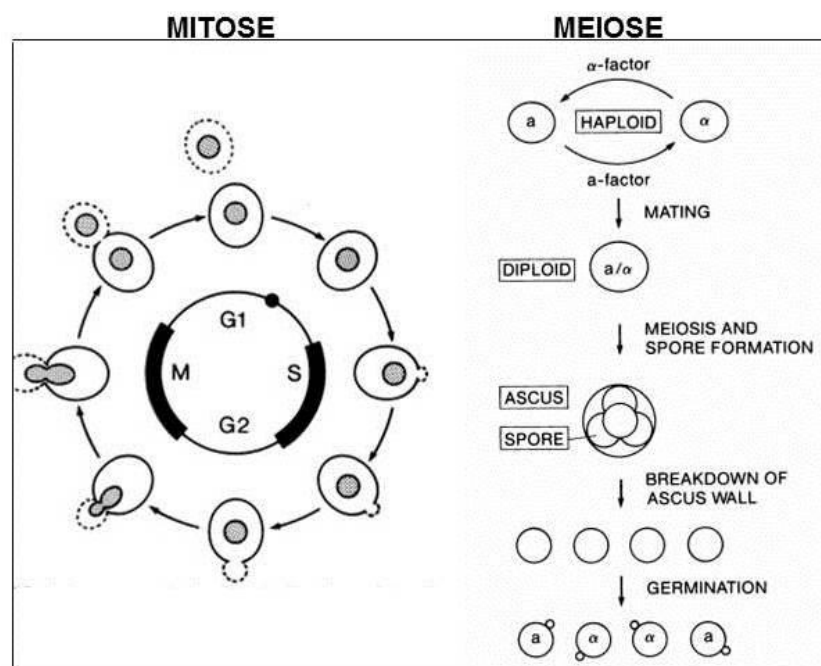


Figura 2. Ciclo de divisão celular da levedura *S. cerevisiae*. (Fonte: Adaptado de HERSKOWITZ, 1988).

Os termos homotalismo (versão funcional do gene HO) e heterotalismo (versão defeituosa do gene HO) também são utilizados para descrever os diferentes tipos de ciclo de vida em leveduras. No ciclo de vida homotático, uma única célula haploide (esporo) dá origem à progênie de células diploides que é capaz de sofrer meiose. Quanto ao ciclo de vida heterotático, diploides são formados apenas por acasalamentos entre células derivadas de esporos separados que possuem tipos de acasalamento opostos (a ou α). O comportamento homotático e heterotático das células de leveduras *S. cerevisiae* podem ser testadas através do crescimento de célula haplóide e se esta célula tem capacidade de esporulação (HERSKOWITZ, 1988). Ou seja, células haploides homotáticas irão formar diplóides e esporular, ao passo que as heterotáticas se manterão haploides, ao menos se houver o acasalamento de um esporo separado contendo *mating-type* oposto. O gene *ho* é típico de linhagens de levedura de laboratório, pois elas não mudam o *mating-type*, impedindo o cruzamento de diferentes haploides, ou seja, estes haploides são “estéreis” e não vão cruzar entre si. Com isso, uma confusão na população de célula e consequentemente na sua progênie celular é evitada (HERSKOWITZ, 1988).

Devido a sua versatilidade, a levedura *S. cerevisiae* é a mais utilizada na área da Biotecnologia (indústria de panificação, produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível, entre outros produtos de importância industrial e econômica). Segundo os autores Johnson e Echavarri-Erasun (2011), o gênero *Saccharomyces* é sem dúvida um dos grupos mais estudados pela comunidade científica, já que é considerado organismo eucarioto modelo e organismo GRAS (*Generally Recognize as Safe*).

1.2.1. Metabolismo da levedura *S. cerevisiae*

A glicose é um nutriente ubíquo para células eucarióticas, servindo como uma fonte de carbono e energia. Na presença de glicose, uma variedade de vias metabólicas é afetada, resultando em alterações em metabólitos intermediários, cofatores e produtos finais. Além disso, diferentes células eucarióticas utilizam mecanismos específicos para detectar a presença de glicose. O papel fisiológico destes mecanismos depende do tipo particular de cada célula (ROLLAND et al., 2001).

As células da levedura *S. cerevisiae* mostram preferência por altas concentrações de glicose comparadas com outros açúcares ou outras fontes de carbono (PEETERS; THEVELEIN, 2014). A notável preferência pela glicose (e açúcares relacionados) manifesta-se por esta molécula ter vias múltiplas de regulação (Fig. 3) que têm como objetivo principal converter rapidamente açúcares em etanol (ROLLAND et al., 2001).

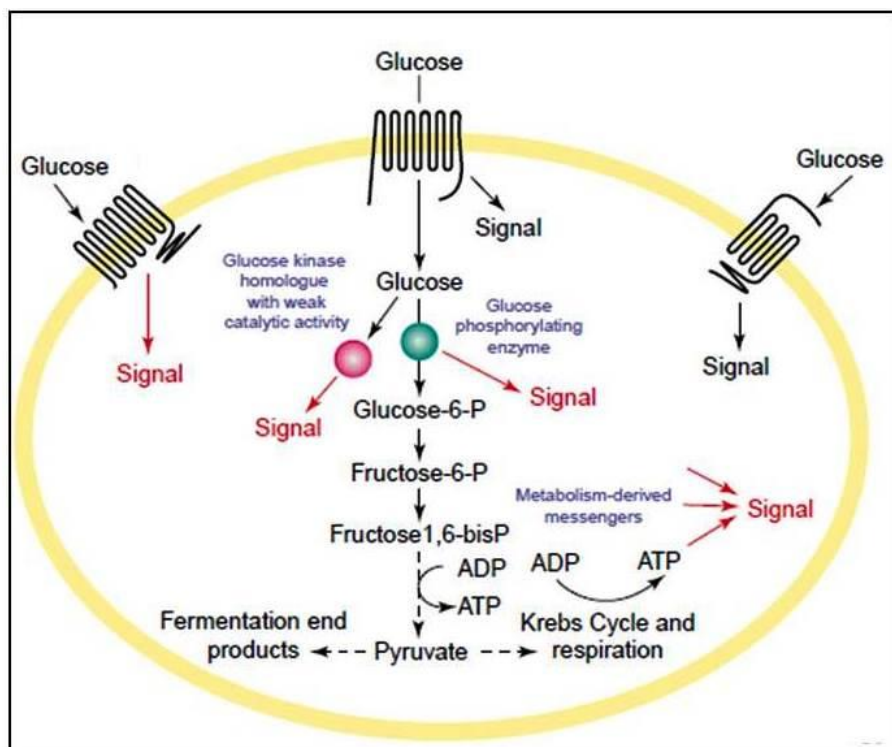


Figura 3. Possíveis mecanismos e sinalizações da via metabólica da glicose em *S. cerevisiae*. (Fonte: Adaptado de ROLLAND et al., 2001).

A glicólise desempenha um papel central no metabolismo da glicose na levedura *S. cerevisiae*, pois ela representa a raiz condutora dos diferentes ramos da via metabólica, principalmente para a produção de biomassa, etanol e dióxido de carbono (DIDERICH et al., 2001). A glicose é transportada para o interior das células por um extenso conjunto de transportadores de glicose por meio de difusão facilitada que são codificadas pelos genes transportadores de hexose, HXT (ÖZCAN; JOHNSTON, 1995). Estes transportadores têm diferentes afinidades e atividades catalíticas, e a sua expressão é ajustada de acordo com a concentração de glicose no meio (ÖZCAN; JOHNSTON, 1995).

O melaço de cana-de-açúcar tem como principal fonte de carbono (Tab. 1) a sacarose (60 %). A levedura *S. cerevisiae* na presença desse substrato produz a enzima invertase, que catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, resultando em uma solução altamente fermentável (JABBAR; AL-SA'ADY, 2014). Essa atividade invertásica não é ativada em mosto de uva, pois ele é constituído principalmente por glicose e frutose (Tab. 1).

Tabela 1. Composição do melaço de cana-de-açúcar e do mosto de uva.

Componente	Melaço (%)	Mosto de Uva (%)
Água	17-25	70-80
Sacarose	30-40	-
Glicose	4-9	10
Frutose	5-12	11
Outros carboidratos	2-5	0,16
Cinzas	7-15	-
Compostos nitrogenados	2-6	0,05-0,1
Gorduras, esteróis, fosfolipídios	0,1-1	-
Fração mineral	4,08X10 ⁻³ -4,38X10 ⁻³	0,25-0,35
Ácidos não nitrogenados	2-8	-

Fonte: Teclu et al., 2009 e Belitz et al., 2009.

1.3. Leveduras *starters* dos processos fermentativos: persistência e dominância

A literatura se refere ao termo grau de dominância de uma linhagem de levedura como sendo a proporção desta linhagem na população de células do fermentador, a qual é dependente do seu grau de competitividade em relação a outras leveduras e da sua velocidade específica de crescimento. Em contraste, persistência significa a habilidade da linhagem permanecer no reator por resistir as múltiplas condições de estresse do processo de fermentação do bioetanol (DELLA-BIANCA et al., 2013).

A maioria das leveduras industriais é isolada durante os processos fermentativos. O fenótipo deste tipo de levedura é mais estável do que os das linhagens de levedura de laboratório (MORTIMER et al., 1994). Segundo Arguesso

et al. (2010), as cepas de leveduras isoladas de processos fermentativos apresentam heterogeneidade genômica estabelecendo uma forte conexão entre complexidade genômica e adaptação ao ambiente industrial. Desde a década de 1980 existe uma estratégia de escolha de linhagens que consiste na seleção de leveduras selvagens que apresentem alta eficiência fermentativa combinada com persistência durante o processo fermentativo, induzindo desta forma a implantação destas cepas melhoradas no setor industrial (ARGUESO et al., 2009). Durante fermentações naturais de uva, leveduras também são selecionadas e inoculadas como linhagens *starters* nas indústrias vinícolas (JOHNSTON et al., 2000).

A persistência e a dominância de leveduras durante uma safra em uma destilaria dependem do desenvolvimento de tolerância aos estresses (BASSO et al., 2008), tais como alcoólico, ácido, térmico e nutricional (BASSO et al., 2011). As diferentes habilidades de resistência das leveduras frente às condições de estresse podem definir suas propriedades de fermentação e estabelecer critérios para a seleção de leveduras melhoradas (QUEROL et al., 2003).

1.4. Interação entre micro-organismos no processo fermentativo

Nos processos fermentativos industriais, normalmente a matéria-prima utilizada não é esterilizada. Tratamentos térmicos, ácidos e de clarificação, adição de insumos externos como o dióxido de cloro e de enxofre (melaço) e o dióxido de enxofre (mosto de uva) são realizados, porém trata-se de procedimentos que controlam o processo prevenindo e ou/inibindo a contaminação sem efeito bactericida.

Mesmo utilizando linhagens de leveduras selecionadas (BASSO et al., 2008), as quais são mais adequadas quando comparadas com as leveduras de panificação, poucas unidades industriais terminam a safra com a mesma linhagem que deu início ao processo (ANDRIETTA et al., 2011). A produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar é um processo aberto que está sujeito a contaminação por bactérias e leveduras indígenas. Estes contaminantes competem com a linhagem *starter* desenvolvendo estratégias de sobrevivência no fermentador durante o processo de fermentação alcoólica (AMORIM et al., 2011). Por outro lado, linhagens indígenas presentes na matéria-prima tendem a dominar o processo, substituindo as linhagens que foram introduzidas como inóculo *starter*. Esta substituição nem sempre é

prejudicial ao processo, uma vez que os seus parâmetros fermentativos são semelhantes aos das linhagens selecionadas como *starter* (ANDRIETTA et al., 2011).

A fermentação do vinho também ocorre por uma complexa evolução de micro-organismos envolvendo leveduras e bactérias. Geralmente as leveduras predominam durante a fermentação alcoólica, onde o baixo valor de pH e escassez nutricional do mosto de uva seleciona o crescimento de leveduras (COCOLIN et al., 2000). A fase inicial de uma fermentação espontânea é caracterizada por leveduras não-*Saccharomyces*, porém, devido à baixa resistência frente às altas concentrações de etanol, estas leveduras tendem a serem substituídas por leveduras *Saccharomyces* (LOPANDIC et al., 2008). Atualmente, com o crescente interesse na qualidade do vinho, é necessário utilizar linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, a qual é capaz de controlar a biota e consequentemente dominar a fermentação (BARRAJÓN et al., 2010).

Antigamente, o processo de produção de etanol combustível era realizado por linhagens de panificação e a fermentação do vinho era um processo espontâneo, ou seja, de fermentação natural. Atualmente a busca pela interação sinérgica entre os micro-organismos utilizados para compor o inóculo inicial de fermentações mistas ainda é uma incógnita. Como o processo fermentativo ocorre por meio de um consórcio microbiano, compreender as interações entre os micro-organismos é fundamental para realizar um processo fermentativo bem sucedido.

1.5. Instabilidade nos processos fermentativos

Durante os ciclos sucessivos de fermentação ocorrem mutações espontâneas (ZEYL; DEVISSER, 2001) e mutações induzidas pelas condições de estresse do processo (MARQUES, 2004). Entre as mutações induzidas têm-se as mutações resultantes da pressão osmótica (GARAY-ARROYO, 1999), a indução da formação de proteínas de choque térmico (PLESSET et al., 1982) e mutações mitocondriais induzidas pelo etanol (BANDAS; ZAKHAROV, 1980). Mortimer e colaboradores (1994) propuseram um mecanismo de evolução para linhagens de levedura durante a fermentação destinada à produção de vinhos. Segundo esta hipótese, denominada teoria da “Renovação Genômica”, ocorre um acúmulo de mutações deletérias em genes heterozigotos e homozigotos, produzindo diploides homozigotos capazes de

repor os heterozigotos originais que vão decrescendo durante o processo. Segundo Puig et al. (2000), o mecanismo da evolução do genoma de leveduras envolve também recombinações mitóticas.

O estudo de leveduras tolerantes e persistentes as condições adversas é de interesse tanto científico quanto industrial. Linhagens mais adaptadas e resultantes de alterações em expressão gênica ou inativação de genes por mutações benéficas surgem durante o processo de produção de etanol, principalmente causados por fermentações sucessivas (HALL; JOSEPH, 2010). Tais mutações podem ser avaliadas com base na eficiência da esporulação, velocidade de crescimento de células haploide e diploide e viabilidade dos esporos, indicando que as mutações podem ser benéficas ou dominantes, enquanto que as prejudiciais são recessivas (HALL; JOSEPH, 2010).

1.5.1. Relevância da estabilidade genética e sua manutenção

S. cerevisiae é um bom modelo para estudar instabilidade genética (RAMÍREZ et al., 2004), sendo importante para a indústria no setor de produção de bioetanol e na área da saúde (doenças genéticas, câncer e desenvolvimento de drogas resistentes) os quais desenvolvem um papel importante sobre o entendimento da nossa evolução (RAMÍREZ et al., 2004). A instabilidade genética pode alterar as propriedades das leveduras que iniciam o processo fermentativo resultando ao longo das fermentações em mutantes sensíveis ao processo, ou seja, aqueles que passam a apresentar redução no crescimento e baixa velocidade de fermentação (PÉREZ et al., 2001).

A manutenção da estabilidade genômica é crítica para a sobrevivência das células e para o seu crescimento celular normal. Existem vias múltiplas de manutenção da estabilidade genômica da levedura *S. cerevisiae* (KOLODNER et al., 2002) tais como: I) via de supressão de erros da replicação do DNA; II) degradação de telômeros (deleções ou adições terminais); III) recombinações aberrantes (suprimidas por reparo do tipo “*mismatch*” ou sistemas que reconhecem e reparam erros de inserção e deleção por incorporações aleatórias errôneas de bases no DNA); IV) ativação de mecanismo de detecção de erros de replicação do DNA na fase S do ciclo celular. Os erros de replicação estão relacionados com inativação

dos “*checkpoints*” ou dos mecanismos sensores que garantem a fidelidade da cópia do DNA na fase S do ciclo de divisão celular.

Em *S. cerevisiae* a instabilidade está associada em perdas de heterozigose (LOH), mudanças no tamanho de cromossomos e o aparecimento de mutantes homozigotos recessivos (KOLODNER et al., 2002). Embora a instabilidade genética em leveduras tenha sido analisada em detalhes nos últimos anos, pouco se sabe sobre as causas de tais instabilidades (KOLODNER et al., 2002).

1.6. Técnicas de monitoramento de leveduras em processos fermentativos

Processos biotecnológicos conduzidos por *S. cerevisiae* estão ganhando cada vez mais importância. O monitoramento das linhagens inoculadas durante a fermentação é necessário para garantir a qualidade do processo, tais como a produção de bioetanol ou fermentação do vinho (FRANCO-DUARTE et al., 2011). Estudos sobre o acompanhamento de leveduras selecionadas para fermentação em destilarias estão sendo realizados com a finalidade de detectar de forma rápida e simples o inóculo “*starter*” durante a fermentação. Métodos como plaqueamentos em meios sólidos contendo corantes são utilizados para acompanhar a estabilidade fenotípica da levedura inoculada no início do processo (POWELL; DIACETIS, 2007).

Vários métodos moleculares foram desenvolvidos para caracterizar e identificar leveduras nos diferentes processos fermentativos. Dentre as técnicas mais empregadas para monitorar a dinâmica populacional de leveduras encontram-se: cariotipagem (BASSO et al., 2008) que analisa os cromossomos em um campo pulsado, análise de restrição do DNA mitocondrial (*mtDNA*) baseado no isolamento de minipreparações do DNA padrão de levedura (LÓPEZ et al., 2001), amplificação aleatória do DNA (RAPD) (LOPANDIC et al., 2008), análise de microssatélite (SIA et al., 2000) através de sequências repetitivas não codificante de ocorrência frequente no genoma (2-4 pares de bases) e minissatélite (10-100 pares de bases) (CARVALHO-NETO et al., 2013), PCR em tempo real (HIERRO et al., 2006), análise interdelta (LEGRAS; KARST, 2003; XUFRE et al., 2011; FRANCO-DUARTE et al., 2011) que amplifica sequências polimórficas, dentre outras. Estas técnicas apresentam alto poder discriminatório e reprodutibilidade, porém trata-se de um procedimento que requer mão de obra especializada e de custo elevado.

A análise interdelta é muito utilizada para avaliar a evolução das leveduras em fermentação de vinho, pois é uma técnica capaz de caracterizar e monitorar as leveduras durante ciclos sucessivos de fermentação além de ser um aliado na seleção de linhagens resistentes às condições adversas presentes no processo (LEGRAS; KARST, 2003; XUFRE et al., 2001). Os primers delta 1, delta 2, delta 3, delta 12 e delta 21 são oligonucleotídeos customizados que amplificam entre os elementos delta do genoma da levedura resultando em amplificação da sequência polimórfica (NESS et al., 1993). Os elementos delta formam os RTL (repetições terminais longas) que flanqueiam os retrotransposons TY1 e TY2 em leveduras, sendo denominados de região interdelta. Quando os elementos são encontrados separados dos retrotransposons, são denominados de elementos delta (LEGRAS; KARST, 2003).

No Brasil, o monitoramento durante a fermentação quanto à identificação das linhagens de leveduras é normalmente realizado por empresas terceirizadas (Fermentec, Genotyping dentre outras). A busca por procedimentos simples de identificação de leveduras em processos fermentativos bem como a construção e isolamento de linhagens adaptadas e que persistem por mais tempo no processo tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos.

Objetivos

Objetivo geral

Esta pesquisa teve como finalidade desenvolver e estabelecer técnicas simples de identificação e monitoramento de leveduras (proporção, dominância e persistência) em processos fermentativos através de plaqueamentos em meios sólidos cromogênicos.

Objetivos específicos

- a) Estabelecer vias rápidas de detecção de estabilidade genética: desenvolvimento de meios sólidos de cultivo contendo corantes (cromogênicos) e determinação da capacidade de esporulação;
- b) Padronização do plaqueamento nos meios sólidos cromogênicos (verificação de estabilidade fenotípica e ajuste da suspensão celular);
- c) Monitoramento de leveduras em processo fermentativo para produção de biocombustíveis e vinho utilizando inóculo simples (uma linhagem *starter*): plaqueamento nos meios sólidos cromogênicos (estabilidade da coloração das colônias) durante os ciclos sucessivos de fermentação e escolha das linhagens *starters* a serem utilizadas nas fermentações mistas;
- d) Monitoramento de leveduras em processo fermentativo para produção de biocombustíveis e vinho utilizando inóculo misto (mais de uma linhagem *starter*): plaqueamento nos meios sólidos desenvolvidos e determinação da permanência e dominância de leveduras;
- e) Validação da metodologia proposta de monitoramento de leveduras em processos fermentativos através da técnica molecular interdelta.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Leveduras e manutenção de culturas

As linhagens de leveduras de *S. cerevisiae* e *Picchia apiculata*^(a) utilizadas nos experimentos do presente trabalho estão resumidas na tabela abaixo.

Tabela 2. Nome, origem e referência das leveduras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Leveduras	Origem e Referências
OSMO-8 PV-2 63M-1	Souza, C. S. et al. 2007. World J Microbiol Biotechnol., v. 23, p. 1667-1677.
63M-2 63M-3	Presente Trabalho (Instituto de Química-UNESP, SP/Brasil)
PE-2 CAT-1 BG-1	Basso, L. C. et al. 2008. FEMS Yeast Res., v. 8, p. 1155–1163.
FT858 4LBI-3	Linhagem Industrial - Fermentec
5TB8-60 SC ₂ -37 RB3-7SC ₂ ^a KA-397	Linhagens da coleção de cultura do Laboratório de Leveduras Produtoras de Vinho. Campus de Machia Romana-UNIBAS Potenza/Itália.
EC1118	Linhagem comercial isolada em fermentação de Champanhe. http://wine.lallemandyeast.com/products/ec-1118-wine-yeast
DBVPG 6500 DBVPG 6497 DBVPG 6499	NCYC 1006; National collection of yeasts cultures, Norwich, England.

As células das leveduras foram estocadas em meio sólido YPD a 4 °C e em glicerol 15 % (v/v) em freezer a – 80 °C.

3.2. Meios sólidos de cultura

3.2.1. Meio YPD (yeast extract-peptone-dextrose)

O meio YPD foi preparado segundo Sherman e Hicks (1991) apresentando a seguinte composição (m/v):

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

Procedimento: Os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada. A esterilização do meio de cultivo foi realizada em autoclave a 121 °C por 20 min. a 1 psi (*pound square inch*) de pressão. Após esterilização e esfriamento parcial do meio, este foi distribuído em placas de Petri e conservado em geladeira a 4 °C até a sua utilização.

3.2.2. Meio mínimo

O meio mínimo foi utilizado para detectar leveduras com deficiência nutricional (auxotrofia). O meio foi preparado seguindo as especificações de Amberg et al. (2005)..

3.2.3. Meio WLN - Wallerstein Laboratory Nutrient

O meio WLN foi diluído seguindo as especificações do fabricante (HIMEDIA). Este meio foi utilizado como referência no presente trabalho devido ao seu uso corrente em processos fermentativos.

3.2.4. Meio basal para adição de corantes (NAGAI, 1963).

Este meio foi utilizado para detectar a ocorrência de fenótipos de relevância para o processo fermentativo através da adição de diferentes corantes, tendo em sua composição basal os seguintes reagentes (m/v):

Glicose	2,00 %
Peptona	0,15 %
Extrato de levedura	0,15 %
Fosfato de potássio monobásico	0,15 %
Sulfato de amônio	0,15 %
Sulfato de magnésio	0,10 %
Agar	2,00 %

Procedimento: os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. a 1 psi de pressão. Após esterilização e esfriamento parcial, corantes foram adicionados ao meio e este foi homogeneizado e distribuído em placas de Petri. Após solidificação, as placas foram conservadas em geladeira a 4 °C até a sua utilização.

Os corantes utilizados e a concentração final no meio de cultivo foram:

- | | |
|-------------------------|------------------------------------|
| 1. Floxina B | 10 mg/L (MIDDELHOVEN et al., 1976) |
| 2. Rodamina Pink | 50 mg/L (AMBRONA et al., 2006) |
| 3. Eosina | 8 mg/L (Nagai, 1963) |
| 4. Azul de tripano | 15 mg/L (Nagai, 1963) |
| 5. Verde de Bromocresol | 200 mg/L (MIURA et al., 2004) |

Procedimento: os corantes foram preparados individualmente e esterilizados por filtração (filtro GSW 0,22 µm de diâmetro). As soluções estéreis (1000X concentradas) foram estocadas em frascos âmbar em geladeira a 4 °C. Os corantes 1, 2 e 5 foram adicionados singularmente ao meio basal (descrito acima) e os corantes 3 e 4 foram adicionados juntamente.

3.2.5. Meio N1

Este meio (Patente de Invenção número de depósito: BR 10 2015 005368 1) foi utilizado para monitorar a dominância e persistência de leveduras em processos fermentativos contendo a seguinte composição:

Reagentes	Fórmula Química	Concentração % (m/v)
1. Peptona	-	0,20
2. Extrato de levedura	-	0,15
3. Sulfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,15
4. Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	0,15
5. Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
6. Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	2,00
7. Agar	-	2,00
8. Eosina amarelada	$\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$	0,0012
9. Azul de tripano	$\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{S}_4$	0,0015

PROCEDIMENTO: pesar os reagentes (1 a 6) e dissolvê-los em água Milli-Q. Ajustar o volume final desejado em proveta e transferi-lo para um frasco shott e/ou erlenmeyer contendo o agar. Esterilizar em autoclave por 20 min a 1 psi de pressão. Após esterilização e esfriamento parcial, adicionar os corantes (soluções estoques) com ponteiros estéreis ao meio de cultura. Homogeneizar e distribuir o meio em placas de Petri. Após solidificação estocar em geladeira a 4 °C até a sua utilização.

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE

Foi preparada uma solução estoque 1000 X 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.

3.2.6. Meio para atividade *killer*

Este meio foi utilizado para detectar a presença de fenótipo *killer* apresentando a seguinte composição (m/v):

Extrato de malte	2,00 %
Azul de metileno	0,0003 %
Agar	2,00 %

Procedimento: o extrato de malte foi dissolvido em água destilada e o seu pH foi ajustado para 4,6 com solução tampão citrato de fosfato 0,1 M. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. a 1 psi de pressão. Após esterilização e esfriamento parcial, adicionou-se o corante azul de metileno (solução 1000 X concentrada, 0,3 %) ao meio o qual foi homogeneizado, distribuído em placas de Petri e conservado em geladeira a 4 °C até a sua utilização.

Inoculação: três linhagens controles: DBVPG 6500 (linhagem sensível ao fenótipo *killer*); DBVPG 6497 (linhagem *killer*) e; DBVPG 6499 (linhagem *killer*) foram utilizadas para o teste. Um plaqueamento prévio (10^6 céls/mL) foi realizado utilizando a linhagem controle sensível (DBVPG 6500) ao fenótipo *killer*. Após a incorporação das células deste plaqueamento, as linhagens a serem testadas foram transferidas por meio de uma alça estéril de células fresca ao meio. As placas foram incubadas a 26 °C por três dias. A atividade *killer* foi determinada quando não houve crescimento da linhagem utilizada como controle sensível ao fenótipo *killer* formando um halo (ausência de crescimento de colônias) ao redor de linhagens que tem o fenótipo *killer*.

3.2.7. Meio BiGGY

O meio BiGGY Agar foi diluído seguindo as especificações do fabricante (OXOID, USA). O seu uso é destinado para identificar leveduras que produzam elevada concentração de sulfeto de hidrogênio (H_2S), um composto indesejável para produção de vinhos.

Inoculação: uma alça estéril de células de cultura de 24 h de leveduras foram transferidas para o meio BiGGY. O meio foi incubado por 48 h a 26 °C. A produção do composto (H_2S) foi baseada na coloração das colônias crescidas no meio, sendo: marrom intenso – alta produção de H_2S ; marrom – produção moderada de H_2S ; e branca – baixa produção de H_2S .

3.2.8. Meio para teste de resistência ao dióxido de enxofre (SO₂)

Este meio foi preparado para verificar a resistência de leveduras na presença de SO₂, um antimicrobiano frequentemente adicionado em mosto natural de uva.

Procedimento: o meio foi preparado em duas partes: a primeira contendo agar (4%, m/v) e água foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min., e a segunda parte contendo mosto natural de uva, o qual foi submetido a tratamento térmico a 100 °C por 20 min. Após esfriamento parcial, as duas partes foram misturadas e homogeneizadas e SO₂ (solução estoque esterilizada por filtração) foi adicionado na concentração desejada (0-300 ppm).

Inoculação: foi realizada através da adição de 5 µL da suspensão celular (10⁷ céls/mL) das linhagens testadas. As placas foram incubadas a 26 °C por 48 h. A linhagem de levedura *Picchia apiculata* KA-397, foi utilizada como controle sensível ao composto (ausência de crescimento na presença ≤ 50 ppm de SO₂). A resistência ao SO₂ foi verificada com base na intensidade do crescimento das colônias.

3.3. Fermentação em escala de laboratório: melaço de cana-de-açúcar

3.3.1. Matéria-prima e tratamento

A matéria-prima utilizada no presente trabalho foi o melaço de cana-de-açúcar contendo 80-90° Brix doado pela Usina São Martinho. Após transporte a temperatura ambiente, esta matéria-prima foi armazenada em câmara fria a 5 °C. Um processo de clarificação foi realizado antes de seu uso, o qual consistiu do seguinte procedimento: o melaço estoque foi diluído duas vezes com água de torneira e após homogeneização o seu pH foi ajustado para 4,5 com solução de H₂SO₄ 6 mol/L. O melaço diluído foi então submetido a tratamento térmico (aquecimento pelo vapor da autoclave ± 100 °C por 40 min.). Em seguida, deixou-se o melaço clarificado decantar os resíduos sólidos por 48 h em câmara fria (5 °C) sendo o sobrenadante coletado por sifonação (LALUCE et al., 1991). Após o procedimento de clarificação do melaço, dosagem de açúcares redutores totais (ART) foi realizada para análise da concentração de açúcares, os quais foram expressos em porcentagem (%)

apresentando uma média de 45-50 % de ART. O melaço clarificado foi estocado em geladeira a 4 °C para uso em um período de até duas semanas.

3.3.2. Propagação do inóculo

O melaço clarificado (item 3.2.1) foi diluído com água de torneira até obter as concentrações de 3 %, 10 %, 16 % e 24 % de ART com reajuste de pH para 4,5 com solução de H₂SO₄ 6 mol/L. O meio de propagação foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. a 1 psi de pressão. A propagação das leveduras (63M-1; 63M-2; 63M-3 e PE-2) foram realizadas separadamente em concentrações (ART, 3, 5, 8 e 12 %) e volumes (50, 100, 200 e 400 mL) crescentes, para assim adaptar o inóculo aos estresses osmótico e alcoólico.

Procedimento: A propagação foi realizada em quatro etapas (Fig. 4) por 48 h (12 h para cada concentração de ART) em mesa agitadora operando a 100 rpm (rotação por minuto) a 34 °C e a 37 °C. As leveduras foram inoculadas por meio de uma alça cheia de células fresca no melaço 3 % ART.

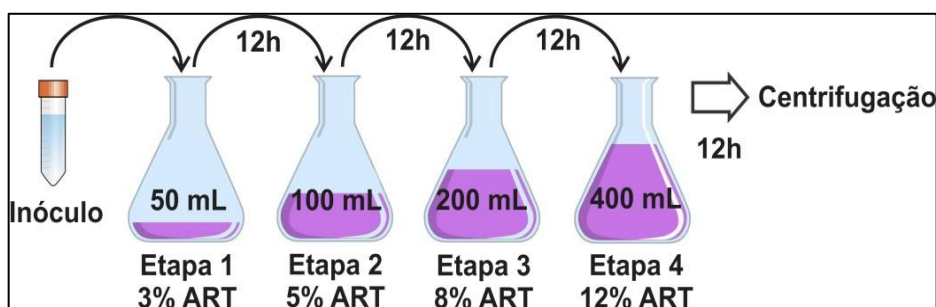


Figura 4. Propagação do inóculo realizada em quatro etapas com concentrações crescentes de ART (3; 5; 8 e 12 %). Leveduras propagadas em mesa agitadora a 100 rpm a 34 °C e a 37 °C (Fonte: CORADELLO, 2012).

Após a etapa de propagação, as células de leveduras foram coletadas por centrifugação a 4700 *g* por 10 min. a 4 °C (centrifuga *Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6R*). O concentrado celular resultante foi lavado com água destilada estéril e re-submetido a outra etapa de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em água para formar o creme ou leite de levedura a ser utilizado como inóculo das fermentações.

3.3.3. Fermentações em batelada alimentada

As fermentações foram realizadas em batelada alimentada conduzidas em um sistema constituído por 4 mini-reatores semiautomáticos (Marconi S/A, modelo MA5002/4/200, Piracicaba, SP). Este sistema (Fig. 5) é equipado com controles independentes de ajuste de pH, agitação magnética, controle de temperatura (água circulante proveniente de banho-maria termostático) e coluna de resfriamento (refrigerada por água circulante a 4 °C) para evitar a evaporação do etanol. Estes reatores possuem uma capacidade equivalente a um volume de trabalho de 200 mL. A alimentação do meio de cultura foi feita por meio de uma bomba peristáltica (MasterFlex, modelo 7518-00) operando com fluxo contínuo.

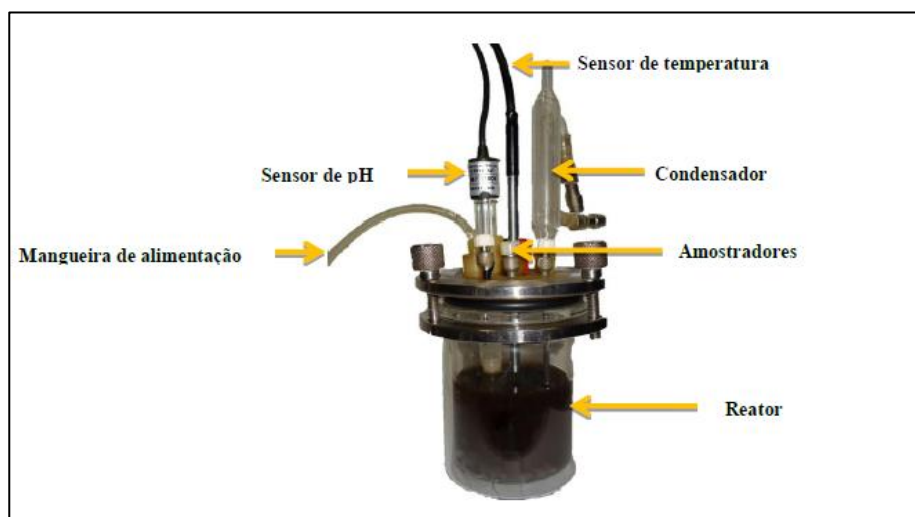


Figura 5. Mini-reator utilizado durante as fermentações em batelada-alimentada (Fonte: MORAIS, 2013).

Procedimento: a fermentação foi conduzida em volume final de 100 mL de melaço de cana-de-açúcar preparado e inoculado da seguinte forma: inóculo de 24 g/L de células equivalente a 30 mL ou 30 % do volume de trabalho do reator e 70 mL de melaço de cana-de-açúcar contendo 28,5 % (ART). Após a inoculação, deu-se início a alimentação do meio de cultura (0,38 mL/min.) com duração de aproximadamente 3 h. As fermentações foram conduzidas a 40 °C, o pH do meio foi ajustado quando necessário para 4,5 com adição de solução de NaOH 4 mol/L com tempo de fermentação fixo em 6 h para cada ciclo do processo.

3.3.4. Fermentações sucessivas: inóculos puros e mistos

As fermentações sucessivas utilizando inóculo puro e misto foram realizadas seguindo a metodologia descrita no item 3.3.3. No final de cada ciclo, as células foram coletadas através de centrifugação (4700 *g* por 10 min. a 4 °C) e suspensas em água destilada estéril para reutilização dos inóculos. Este procedimento foi repetido 5 vezes totalizando 5 ciclos de fermentações sucessivas. A proporção de leveduras utilizadas nas fermentações mistas foi de 1:1, ou seja, 12 g/L de cada linhagem utilizada.

3.4. Fermentação em escala de laboratório: mosto natural de uva

3.4.1. Matéria-prima e tratamento

A matéria-prima utilizada foi o mosto natural de uva vermelha doada por uma vinícola proveniente da Itália. O mosto de uva foi estocado em câmara fria a - 20 °C. Este substrato não recebeu nenhum pré-tratamento antes da sua utilização.

3.4.2. Propagação do inóculo

As leveduras utilizadas para fermentação do vinho foram propagadas em meio YPD líquido através da inoculação de uma alça cheia de células fresca. A propagação foi realizada em mesa agitadora operando a 150 rpm a 26 °C por 16 h. As leveduras propagadas foram coletadas por centrifugação (5000 *g* por 8 min. a 4 °C).

3.4.3. Fermentação do mosto natural de uva

A fermentação foi conduzida em mosto natural de uva com concentração inicial de sólidos totais dissolvidos de 22,2 °Brix e pH de 3,8.

Procedimento: os frascos estéreis receberam a adição de 95 mL de mosto natural de uva vermelha acrescido de 5 mL de uva esmagada (Fig. 6). O antimicrobiano SO₂ foi adicionado ao meio de cultura (50 ppm) e após 15 min. (ação do antimicrobiano)

as leveduras propagadas foram inoculadas no meio de cultivo na concentração de 5×10^7 céls/mL. A fermentação foi conduzida a 26 °C, sem agitação e o seu término foi considerado quando não houve variação no peso dos frascos inoculados (aproximadamente 14 dias, ver item 3.4.4).



Figura 6. Fermentação do mosto natural de uva vermelha.

3.4.4. Medidas de dióxido de carbono (CO₂)

O CO₂ foi medido para acompanhamento da atividade fermentativa através da pesagem diária (horário fixo) dos frascos inoculados em balança semi-analítica. Os resultados foram expressos em CO₂ (g/100 mL) através do seguinte cálculo:

$$CO_2 \text{ (g/100mL)} = (1^{\text{a}} \text{ pesagem} - 2^{\text{a}} \text{ pesagem}); (2^{\text{a}} \text{ pesagem} - 3^{\text{a}} \text{ pesagem}); n \dots \dots \dots$$

3.4.5. Medidas dos sólidos totais dissolvidos: °Brix

As medidas foram realizadas com intervalos de 48 h utilizando um refratômetro de bancada. Os resultados foram expressos em °Brix (g/100 mL).

Procedimento: antes da leitura das amostras fermentadas, água destilada foi utilizada para zerar o refratômetro (leitura do branco). Após calibração, um volume de 5 µL foi retirado de cada frasco e adicionado ao equipamento para a leitura.

3.5. Ensaios analíticos e microbiológicos

Os seguintes ensaios foram realizados em duplicata:

3.5.1. Biomassa celular

A biomassa das leveduras foi determinada em espectrofotômetro por medidas de densidade ótica a 570 nm e convertidas a valores de massa úmida (g/L). Curvas padrões (ver em Apêndice) foram realizadas para cada linhagem (61M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2) a fim de correlacionar medidas de absorbância (nm) e massa seca (g). As equações geradas para determinação da biomassa celular (g/L) foram:

- Equação para a determinação da biomassa celular da levedura 63M-1:

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs - 0,021}{2,189} \times dil$$

- Equação para a determinação da biomassa celular da levedura 63M-2:

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs - 0,026}{1,826} \times dil$$

- Equação para a determinação da biomassa celular da levedura 63M-3:

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs - 0,04115}{2,90916} \times dil$$

- Equação para a determinação da biomassa celular da levedura PE-2:

$$Biomassa (g/L) = \frac{Abs - 0,03707}{3,40863} \times dil$$

3.5.2. Viabilidade celular

A viabilidade das células foi determinada pelo método do azul de metileno (LEE et al., 1981). As células que permanecem incolores quando em contato com o reagente azul de metileno são identificadas como células viáveis, enquanto as células que se coram de azul são células inviáveis e/ou mortas. A viabilidade foi expressa em valores de porcentagem e calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células totais}} \times 100$$

Composição do reagente azul de metileno

Glicose	5,0 g
KCl	0,21 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,24 g
NaHCO ₃	0,1 g
NaCl	4,5 g
Azul de metileno	0,125 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. O reagente foi estocado em frasco âmbar a temperatura ambiente.

Procedimento: a suspensão de células foi diluída no reagente azul de metileno, após 5 minutos de contato com o corante, realizou-se a contagem das células utilizando a câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 40 X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

3.5.3. Contagem do número de células para plaqueamento nos meios sólidos descritos nas seções: 3.2.1; 3.2.2 e 3.2.3

O número de células por mL (n° céls/mL) foi determinado pela seguinte fórmula utilizando a câmara de Neubauer e microscópio com aumento de 40 X:

$$N^{\circ} \text{células/mL} = \text{contagem} \times 5 \times 10^4 \times \text{dil}$$

Procedimento: a suspensão de células das leveduras foi transferida para câmara de Neubauer onde se realizou a contagem das células em microscópio. A concentração celular foi dada pela equação descrita acima. As células foram diluídas em solução de NaCl 0,85 % até a concentração de 1×10^3 céls/mL. Desta concentração foram pipetados volumes variando de 50 a 100 μ l para o plaqueamento nos meios sólidos, tendo como resultado o crescimento de 50 a 100 UFC/placa após período de incubação.

3.5.4. Açúcar redutor total (ART)

O ART foi determinado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1951). Uma curva padrão de glicose foi obtida para relacionar a absorbância com a concentração dos açúcares hidrolisados (ver em Apêndice). A quantidade de açúcar redutor total foi expressa em % e calculada pela seguinte equação:

$$\text{ART (\%)} = \frac{\text{Abs} + 0,096}{31,941} \times \text{dil}$$

Composição do reagente DNS

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	1,0 g
Tartarato de Sódio e Potássio tetrahidratado	30,0 g
Hidróxido de Sódio	1,6 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. O reagente foi estocado em frasco âmbar a temperatura ambiente.

Procedimento: as amostras retiradas dos reatores foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas a 10.400 rpm por 3 min. a 4 °C (centrifuga *Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6R*), o sobrenadante foi reservado enquanto que o resíduo celular (pellet) foi descartado. O sobrenadante foi diluído em água destilada, hidrolisado em HCl 6 mol/L por 7 min. a 60 °C e neutralizado com NaOH 2,4 mol/L. As medidas de absorbância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro a 546 nm (espectrofotômetro marca Bioespectro SP-22).

3.5.5. Etanol

O etanol produzido foi medido utilizando um cromatógrafo a gás (Modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil), operando com um detector de ionização de chama (coluna empacotada PAD/2499) o qual foi calibrado com soluções padrões de etanol nas concentrações de 0,5 % e 1,0 % (v/v). As concentrações de etanol foram expressas em g/L através da seguinte equação:

$$Etanol (g/L) = concentração \times diluição \times 0,789$$

Procedimento: o sobrenadante das amostras centrifugadas foi diluído (10 X) em água destilada, 4 µL desta solução foram injetados no cromatógrafo através do uso de uma seringa para obter os picos e medidas de concentração de etanol.

3.5.6. Compostos voláteis

Os seguintes compostos foram medidos no final da fermentação de vinho: acetaldeído, metanol, n-propanol, isobutanol, ácido acético, d-amílico, isoamílico e etanol. As medidas foram realizadas através de injeção direta das amostras em cromatógrafo a gás (Modelo Agilent7890A) operando com detector de ionização de chama.

Procedimento: 1 mL de vinho fermentado foi adicionado em tubos para análise cromatográfica automática dos compostos voláteis.

3.5.7. Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram calculados utilizando o Microsoft Excel (médias e desvios padrão) versão 2010. Os gráficos foram construídos pelo programa OriginPro 8. O Programa Corel Draw (versão X5) foi utilizado para converter os gráficos em figuras.

3.6. Análise molecular

3.6.1. Extração de DNA

As linhagens a serem analisadas foram previamente estriadas em meio YPD sólido e incubadas a 26 °C por 48 h. Com o uso de alça microbiológica estéril, colônias isoladas foram coletadas e transferidas para eppendorfs contendo 1 mL de solução tampão STE (Tris 10 mmol/L; EDTA 1 mmol/L e NaCl 0,1 mol/L). As suspensões celulares foram centrifugadas (14.000 rpm por 5 min.) e os sobrenadantes foram descartados. O pellet resultante foi lavado com 1 mL de água destilada estéril, homogeneizado em vortex de alta velocidade (± 10 seg.), centrifugado (14.000 rpm por 5 min.) e o sobrenadante foi mais uma vez descartado. Uma resina sintética (*Instagene Bio-Rad Matrix*) foi adicionada ao pellet (0,2 mL) e a suspensão celular foi incubada em banho-maria (56 °C por 30 min). Após incubação, a suspensão foi homogeneizada em vortex de alta velocidade (± 10 seg.), incubada em água em ponto de ebulição por 8 min. e homogeneizada em vortex de alta agitação (± 10 seg.). Esta suspensão foi por fim centrifugada (14.000 rpm por 5 min.) e o seu sobrenadante contendo o DNA extraído foi coletado e transferido para um eppendorf, o qual foi estocado em freezer a - 20° C.

3.6.2. Amplificação de DNA e *primers*

Três *primers* foram utilizados no presente estudo: delta2 reverse (5'-GTGGATTTTATTCCAAC-3'), delta12 forward (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') e delta21 reverse (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') em diferentes combinações:

delta2-delta12 e delta12-delta21. O *primer* delta2 foi descrito por Ness et al. (1993) e os *primers* delta12 e delta21 foram desenhados por Legras e Karst (2003). O DNA extraído foi submetido à amplificação utilizando a seguinte reação de mistura:

Reagentes	Concentração
Tampão (5X)	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
<i>Primer forward</i> (100 µM)	1 µM
<i>Primer reverse</i> (100 µM)	1 µM
dNTP (10 mM)	200 µM
<i>goTaq</i> 5 U/µL	1 U
DNA molde	0,4-2,0 µg
H ₂ O destilada q.s.p.	50 µL

Água deionizada foi adicionada para completar o volume final desta reação. A reação foi amplificada em termociclador tendo os seguintes programas para *Polimerase Chain Reaction* (PCR):

- **Combinação delta2/delta12:** desnaturação inicial a 97 °C por 10 min., seguido por 30 ciclos de desnaturação a 90 °C por 30 seg., hibridação a 45 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 2 min. A PCR foi finalizada com uma extensão a 72 °C por 10 min.
- **Combinação delta12/delta21:** desnaturação inicial a 97 °C por 10 min., seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg., hibridação a 52 °C por 30 seg. e extensão a 72 °C por 1 min. A PCR foi finalizada com uma extensão a 72 °C por 10 min.

Para as análises moleculares das colônias isoladas no final das fermentações (20 colônias escolhidas com base na coloração nos meios sólidos) não foi realizada prévia extração de DNA. As colônias foram adicionadas diretamente à mistura de reação e água destilada esterilizada foi adicionada para completar o volume final (50

uL) da reação. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese (gel de agarose, 1,2 %, m/v) e submetidos a 100 V (voltagem constante) durante 90 min. em tampão de TBE (0,5 X) (Tris-HCl 1 mol/L pH 7,5; ácido bórico e EDTA 0,5 mol/L pH 8). As amostras de DNA foram carregadas no gel de eletroforese usando o tampão azul de bromofenol (0,25 %). Em cada gel foi adicionado marcadores de peso molecular de 100 pares de base (DNA *Ladder*, Biolabs). As bandas de DNA foram coradas pela utilização de 0,5 ug/mL de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha, EUA) visualizadas e fotografadas utilizando um transluminador ultravioleta (UV).

3.6.3. Análise de agrupamento

O dendograma e/ou agrupamento de dados foi construído utilizando a Correlação de Pearson, que estabelece o conceito de distância entre os objetos, neste caso, a distância entre as leveduras analisadas. Esta análise foi realizada por meio do perfil eletroforético das diferentes combinações de pares de *primers* (delta2/delta12 e delta12/delta21) resultando em agrupamento de leveduras em classes, de forma que as mais semelhantes agrupam-se na mesma classe.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. SELEÇÃO DE MEIOS DIFERENCIAIS PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA

O uso de meios sólidos contendo diferentes corantes foi utilizado para monitorar a estabilidade fenotípica de leveduras frente às condições adversas dos processos fermentativos. Os corantes eosina e azul de tripano (detecção de *petites*), floxina B (detecção de auxotrofia), rodamina pink (mutantes melhorados) foram adicionados no meio sólido descrito por Nagai (1963) e o meio industrial WLN contendo o corante verde de bromocresol foram utilizados para o plaqueamento de leveduras após as propagações a 34 °C e a 37 °C. Paralelamente, a frequência de esporulação (indução de formas diploides em haploides) foi outra via de detecção qualitativa da variabilidade genética em leveduras. Os critérios avaliados nos ensaios foram detecção de mudanças fisiológicas e morfológicas das leveduras comparadas a sua cultura estoque.

4.1.1. Acompanhamento da estabilidade fenotípica das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2

O uso de meios diferenciais foi utilizado no presente trabalho para detectar instabilidade fenotípica através da comparação morfológica entre a cultura estoque e a cultura propagada das linhagens de leveduras *S. cerevisiae* da coleção de cultura do nosso laboratório, 63M-1 (Fig. 7), 63M-2 (Fig. 8) e 63M-3 (Fig. 9) e da linhagem industrial PE-2 (Fig. 10).

Todas as linhagens de leveduras estoques plaqueadas (Fig. 7 a 10) apresentaram homogeneidade entre a população de colônias, ou seja, uniformidade no tamanho, borda e coloração. A Fig. 7 ilustra o plaqueamento da levedura 63M-1, um diploide heterotático MATa/ α *LYS/lys URA/ura* (SOUZA et al., 2007). É possível observar nos meios de cultivo que não houve variação fenotípica relevante comparando-se a cultura propagada com a cultura estoque. Deficientes respiratórios “*petites*” (colônias menores coradas intensamente) foram detectados na cultura estoque no meio B, contendo o corante floxina B e na propagação realizada a 37 °C no meio C, contendo o corante rodamina pink. Estes “*petites*” foram confirmados

através do crescimento negativo em meio YEPG. Meios contendo corantes são comumente utilizados para diagnosticar o aparecimento de *petites* (NAGAI, 1963). Outra observação morfológica foi ilustrada pelo plaqueamento da levedura 63M-1 no meio industrial WLN, onde as colônias apresentaram pigmentação mais clara independente da temperatura de propagação realizada. Powell e Diacetis (2007) utilizaram este meio para monitorar a estabilidade fenotípica de leveduras de cervejaria com reutilização de células durante um ano comparando-se as colônias com a cultura inicial (estoque). Em outro trabalho, este meio foi utilizado para avaliar a população microbiana de 15 destilarias no Sul de Minas (SCHWAN et al., 2001).

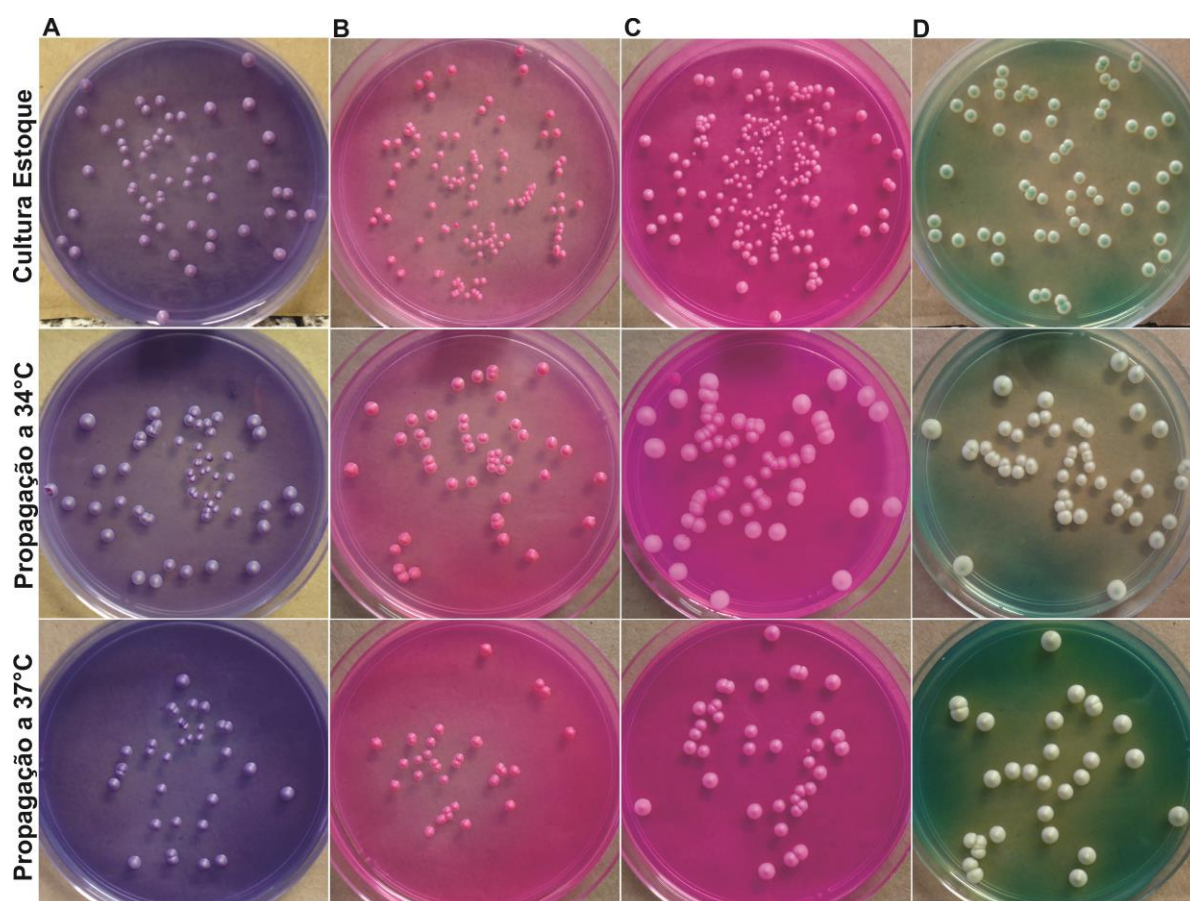


Figura 7. Plaqueamento da levedura 63M-1 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxacina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.

A Fig. 8 ilustra o plaqueamento da levedura 63M-2. Esta levedura é um híbrido heterotático apresentando deficiência nutricional no metabolismo de lisina (*lys/lys*). A auxotrofia (necessidade nutricional) desta linhagem foi detectada através do crescimento negativo em meio mínimo (SPENCER et al., 1989) e a marca de auxotrofia em *lys* foi determinada através da técnica de Análise de Esporos ao Acaso, onde os esporos desta levedura cresciam apenas com suplementação exógena de lisina. A cultura estoque desta levedura apresenta uma coloração mais intensa nos meios A e B do que as leveduras prototróficas, ou seja, sem necessidade nutricional (comparar meios A e B das Figs. 7, 9 e 10 com Fig. 8). Ao passo em que esta levedura foi propagada, foi possível detectar o aparecimento de variantes fenotípicas como *petites* e detectar o aparecimento de leveduras prototróficas, ou seja, leveduras revertentes (LYS^+). Esta reversão com base na coloração das colônias foi confirmada através de crescimento positivo em meio mínimo, indicando que leveduras de coloração intensa nestes meios são linhagens que apresentam alguma deficiência nutricional. A reversão de leveduras haploides contendo marca de auxotrofia em *lys2* para prototrófico LYS^+ foi verificada quando células de leveduras foram crescidas sobre o meio sintético completo desprovido de lisina (STEELE; JINKS-ROBERTSON, 1992). Comparando-se o meio definido e o melaço de cana-de-açúcar, pode ser que ambos sejam desprovidos de suplementação nutricional necessária para manter a marca de auxotrofia da levedura. O aumento de revertentes foi mais intenso quando a levedura foi propagada a 37 °C, indicando, desta forma, a influência do estresse térmico sobre a permanência da marca de auxotrofia. Quanto aos meios C e D, estes apresentaram menor eficiência quando comparados aos meios A e B, pois não foi possível observar distinção entre colônias de leveduras auxotróficas (coradas intensamente pelo corante) de prototróficas.

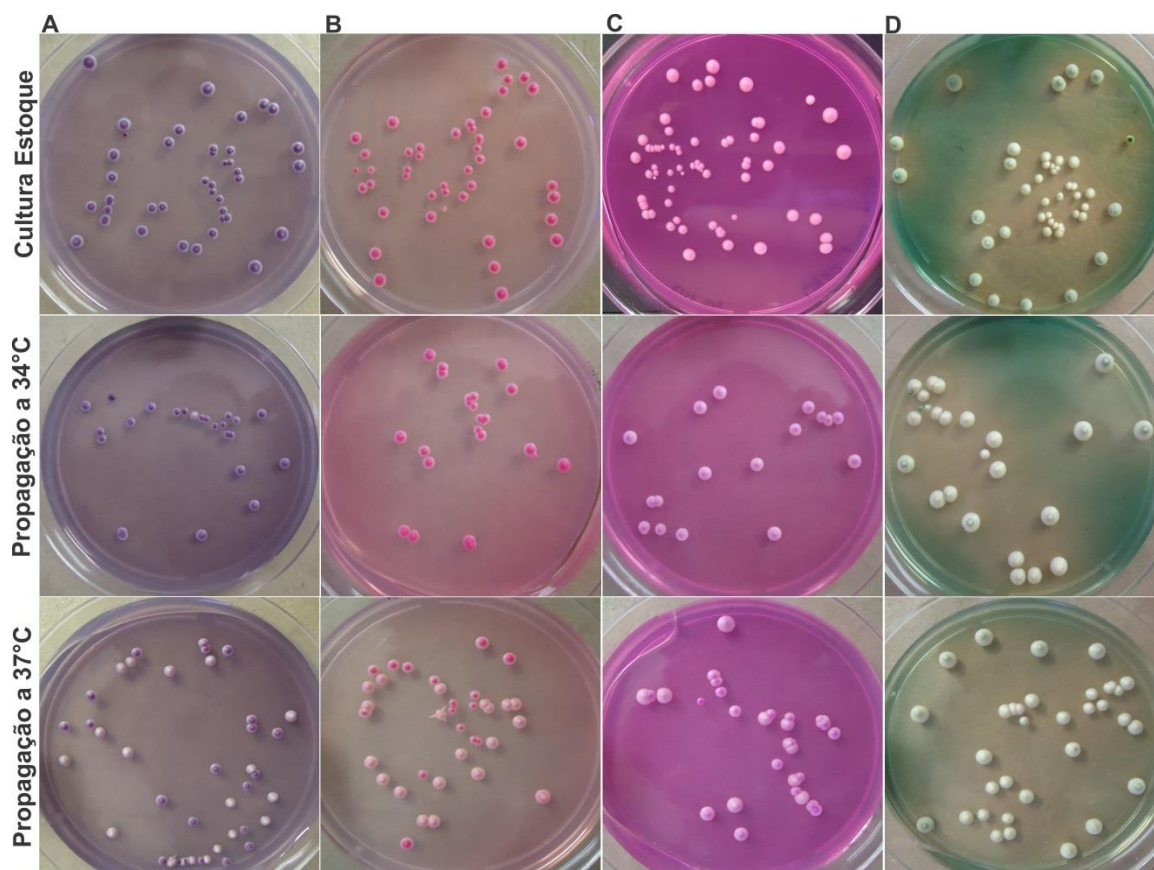


Figura 8. Plaqueamento da levedura 63M-2 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamin pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.

A Fig. 9 ilustra o plaqueamento da levedura 63M-3, uma linhagem prototrófica revertente LYS^+ isolada do plaqueamento da levedura 63M-2 após propagação a 37 °C (ver meio A, Fig. 8). Durante a propagação da levedura revertente 63M-3, não houve o aparecimento de colônias auxotróficas, o que poderia ocorrer uma vez que esta linhagem é descendente de uma linhagem auxotrófica. O aparecimento de *petites* nos meios sólidos cromogênicos foi observado após a propagação tanto a 34 °C quanto a 37 °C, no entanto a sua ocorrência não foi expressiva. No meio WLN as colônias perderam a pigmentação do corante após as propagações, como já observado (ver Fig. 7) no plaqueamento da levedura 63M-1.

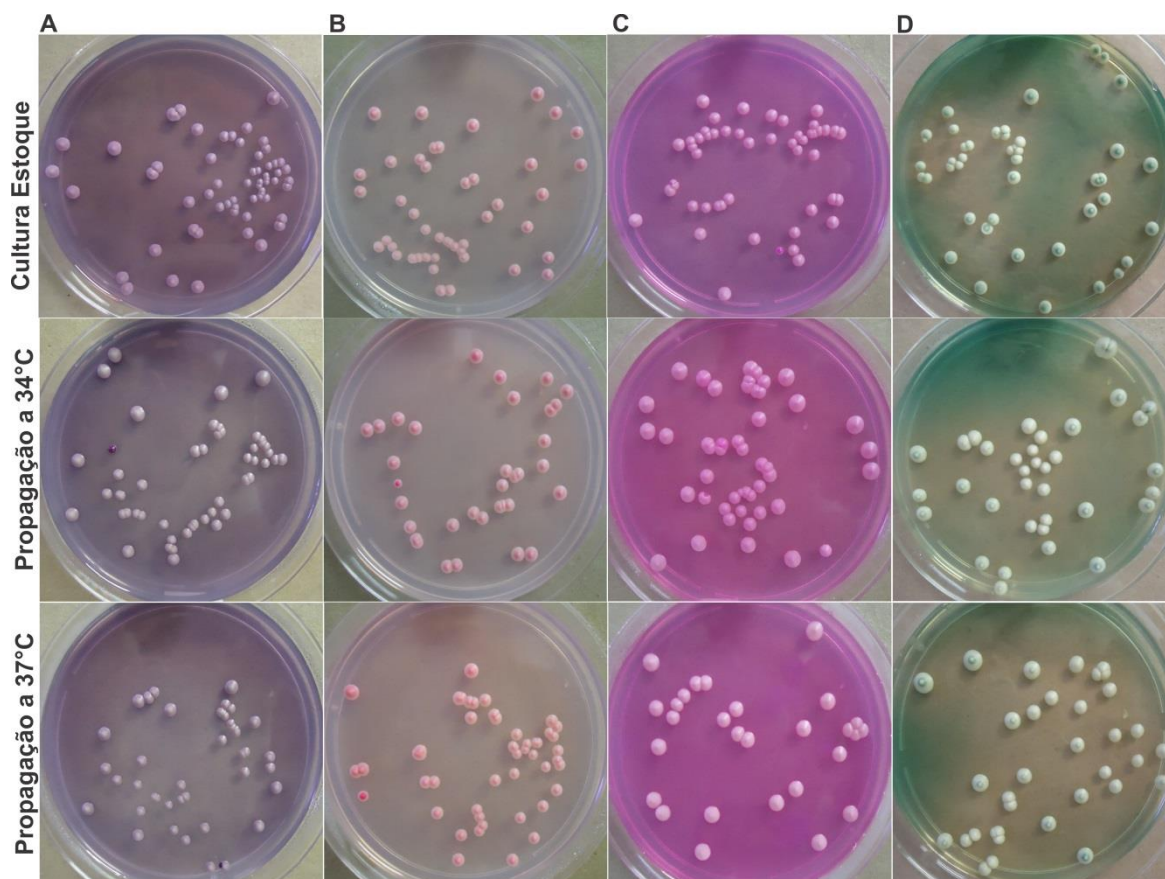


Figura 9. Plaqueamento da levedura 63M-3 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.

A levedura PE-2 foi isolada de processo fermentativo para produção de etanol combustível (BASSO et al., 2008). Nos dias de hoje, esta levedura é muito utilizada como linhagem *starter* nas destilarias brasileiras para produção de biocombustíveis (ARGUESO et al., 2009) e por esta razão, foi escolhida como linhagem de referência no presente estudo. A Fig. 10 ilustra o plaqueamento da levedura PE-2, onde o aparecimento de *petites* foi mais uma vez observado (meio A) na cultura propagada a 34 °C e a 37 °C. Segundo Lodolo et al. (2008), os *petites* são formados a partir da instabilidade do genoma mitocondrial (mtDNA), e a presença de *petites* na fermentação causa um efeito negativo, pois a fermentação torna-se mais lenta e o crescimento das leveduras é reduzido (ERNANDES et al., 1993). Porém, a detecção de mutantes respiratórios observados nos plaqueamento (Fig. 7 a 10) indicam que a instabilidade no mtDNA durante as fermentações com reuso de células é baixa. Quanto ao plaqueamento em meio WLN, não foi detectado nenhuma característica

fenotípica relevante a não ser o aumento do tamanho das colônias das culturas propagadas em comparação à cultura estoque.

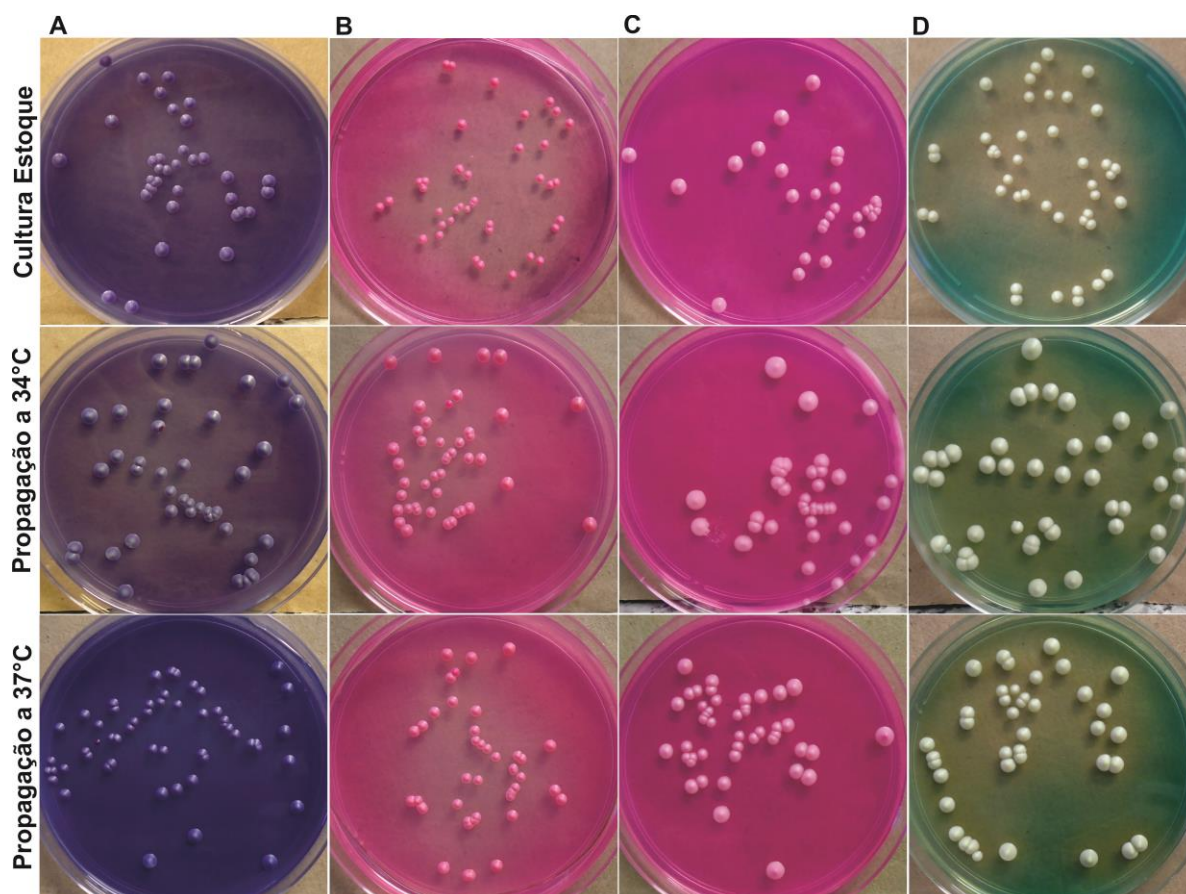


Figura 10. Plaqueamento da levedura PE-2 nos meios cromogênicos (A) eosina e azul de tripano; (B) floxina B, (C) rodamina pink e (D) WLN da cultura estoque e após a propagação a 34 °C e 37 °C. Placas incubadas em estufa a 30 °C por 5 dias.

Devido à levedura 63M-2 apresentar maior instabilidade fenotípica nos meios sólidos cromogênicos, decidiu-se isolar, analisar e correlacionar estas colônias de morfologia diversa. A Fig. 11 ilustra (resolução ampliada) as colônias selecionadas dos meios sólidos cromogênicos após plaqueamento da propagação celular (ver Fig. 8). O meio cromogênico mais seletivo segundo os resultados foi o meio contendo os corantes eosina e azul de tripano > floxina B > rodamina pink = WLN.

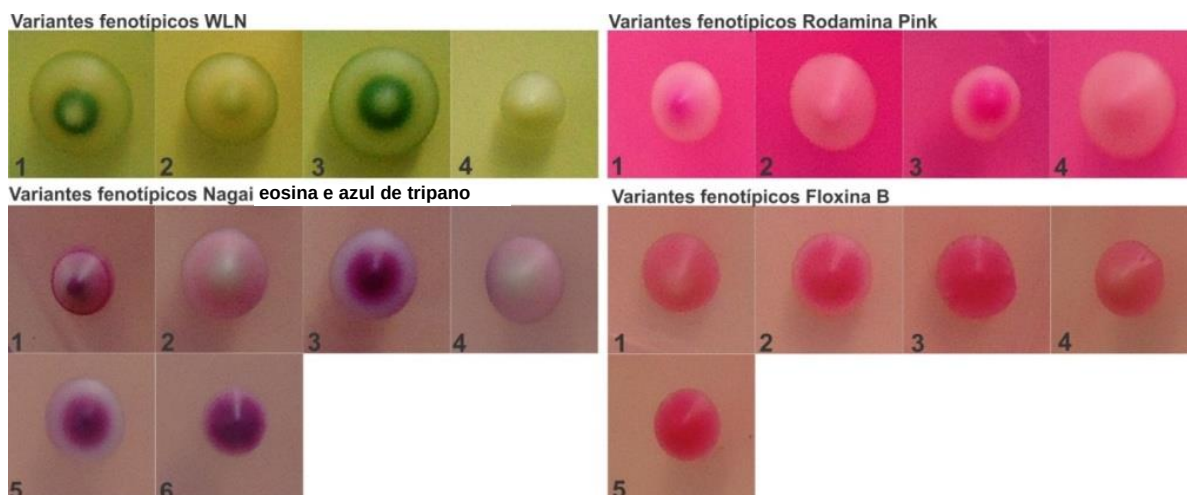


Figura 11. Ilustração dos isolados (variantes fenotípicos, colônias ampliadas) obtidos após plaqueamento da levedura 63M-2.

As colônias enumeradas (Fig. 11) foram transferidas com palitos esterilizados (Fig. 12) para o meio mínimo (controle, detecção de auxotrofia) e nos meios contendo corantes para correlacionar a coloração das colônias quanto à presença (crescimento negativo em meio mínimo) ou ausência (crescimento positivo em meio mínimo) de deficiência nutricional. Foi possível identificar e confirmar que colônias de coloração intensa dos meios sólidos indicaram a presença do marcador genético de auxotrofia como ilustrado na Fig. 12 no meio A (eosina e azul de tripano), B (floxina B) e C (rodamina pink). Estes meios foram fracionados em 4 partes e as colônias auxotróficas foram identificadas sendo: *parte A*, colônias de número 3, 5 e 6; *parte B*, colônias de número 3 e 4; *parte C*, colônias de número 2, 3 e 5; e *parte D*, colônias de número 2 e 3. O meio WLN não permitiu diferenciar colônias auxotróficas de prototróficas. Assim, os corantes dos meios A, B e C podem ser utilizados para diagnosticar marca de auxotrofia em leveduras, sendo esta discriminação mais intensa no meio $A > B > C$.

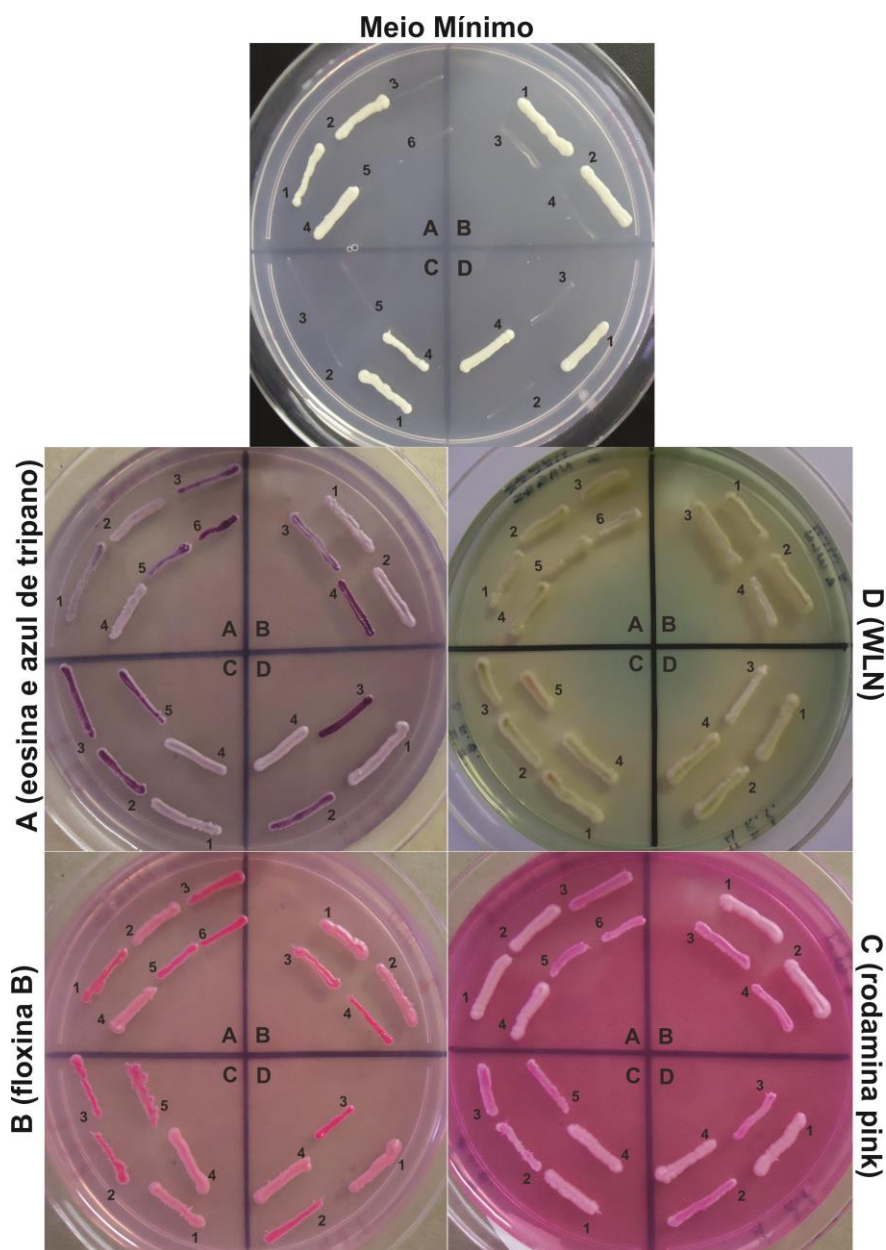


Figura 12. Correlação entre marca de auxotrofia (crescimento negativo em meio mínimo) *versus* coloração das colônias dos isolados da levedura 63M-2 obtidos por plaqueamento nos meios sólidos diferenciais após a propagação a 34 °C e a 37 °C.

4.1.2. Detecção da capacidade de esporulação usando meio de acetato de potássio

A esporulação é uma característica que pode contribuir para a estabilidade de uma linhagem (MORTIMER, 2000) e por isto, também foi adotada como via de acompanhamento do controle de instabilidade durante as propagações das linhagens 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2. A Fig. 13 descreve a esporulação da cultura estoque, propagada a 34 °C e propagada a 37 °C. A levedura que apresentou frequência de esporulação (%) mais estável, ou seja, manteve a frequência de esporulação próxima a sua cultura estoque foi à levedura 63M-1. A linhagem 63M-3 esporulou melhor a 37 °C do que a 34 °C após dois dias de incubação. Isto pode ser devido ao fato desta linhagem ter sido isolada após propagação a 37 °C. As leveduras PE-2 e 63M-2 apresentaram menor frequência de esporulação após dois dias quando comparado com a cultura estoque. Após 7 dias de incubação, a levedura PE-2 atingiu frequência de esporulação muito próxima a sua cultura estoque ($89,77 \pm 0,17, \%$) tanto na propagação a 34 °C ($85,82 \pm 0,29, \%$) quanto a 37 °C ($86,65 \pm 2,91, \%$). Por outro lado, a levedura 63M-2 apresentou baixa frequência de esporulação ($> 50 \%$) após 2 e 7 dias independente da temperatura de propagação realizada. Linhagens que acumulam danos mutacionais são menos prováveis de esporular e consequentemente incapazes de realizar o processo de Renovação Genômica (MORTIMER et al., 2000). Esta linhagem (63M-2) já havia apresentado instabilidade fenotípica (ver Fig. 8) durante a propagação, indicando que o estresse térmico teve influência tanto na capacidade de esporulação quanto na manutenção da marca de auxotrofia.

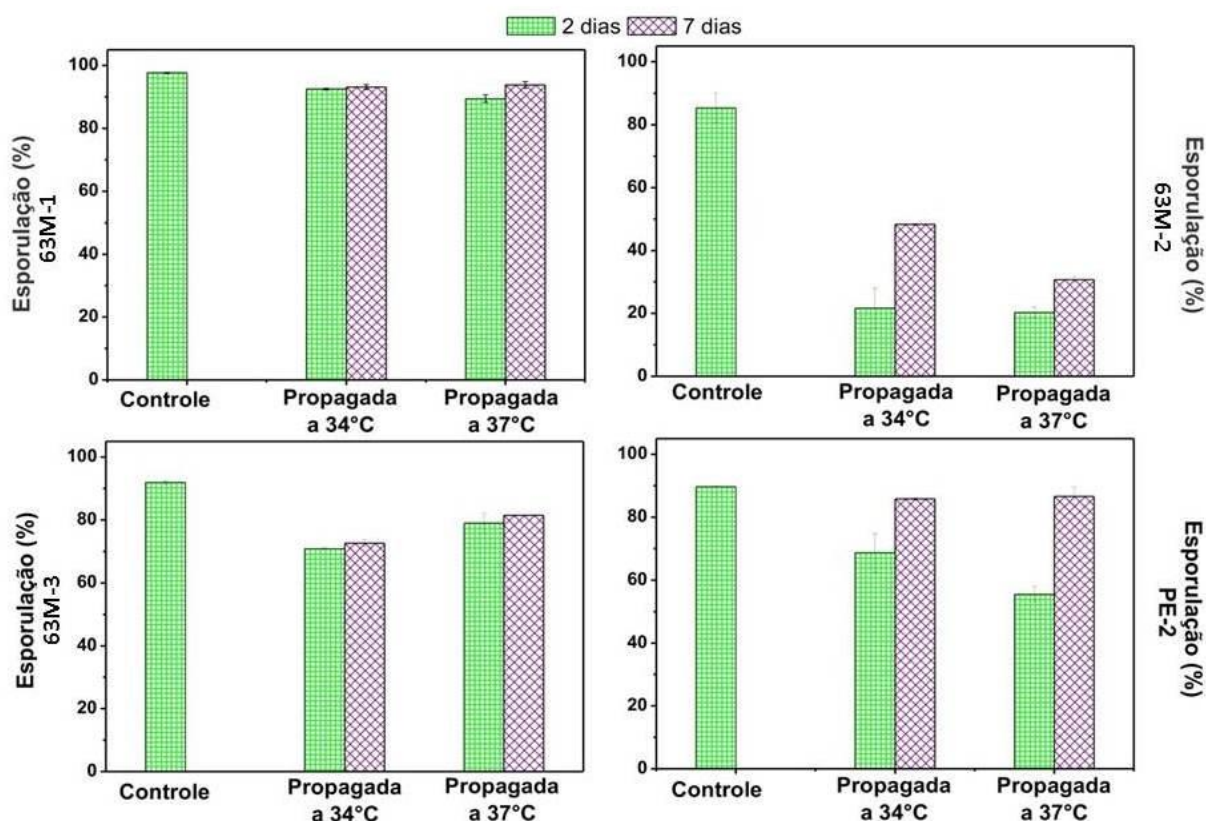


Figura 13. Frequência de esporulação da cultura estoque, propagada a 34 °C e a 37 °C das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 realizada em meio contendo 1 % (m/v) de acetato de potássio, agitação de 125 rpm a 30 °C. Medidas realizadas após 2 e 7 dias de incubação.

4.1.3. Desenvolvimento de meio de cultura para determinação de dominância e persistência de leveduras

Vários meios sólidos foram utilizados no presente trabalho para detectar instabilidade fenotípica, porém houve o desenvolvimento de um meio sólido denominado de meio BTV capaz de diferenciar leveduras através da diferença de coloração entre as colônias. A Fig. 14 ilustra o plaqueamento da cultura estoque das leveduras 63M-1 e PE-2 e a mistura das mesmas nos meios BTV e WLN. É possível observar que essas leveduras apresentaram colônias de pigmentação diferente tanto no meio BTV quanto no meio WLN. Devido à diferença de coloração, um plaqueamento contendo a mistura destas linhagens foi realizado para verificar se as colônias mantinham essa diferença fenotípica. O plaqueamento revelou que a mistura das leveduras plaqueadas apresentaram melhor contraste e distinção no

meio BTV que no meio WLN, onde quase não foi possível observar diferença entre a pigmentação das colônias. Este plaqueamento também foi realizado (dados não mostrados) com as linhagens de leveduras 63M-2 e 63M-3, as quais apresentaram a mesma coloração da levedura 63M-1, indicando que o meio BTV não permite diferenciar colônias de leveduras auxotróficas de prototróficas.

Testes para verificar estabilidade fenotípica quanto à coloração das colônias foram realizados (dados não mostrados de plaqueamento após a propagação e 1 ciclo de fermentação) para comprovar a eficiência do uso do meio BTV no monitoramento de leveduras no processo fermentativo. Como resultado, obteve-se a manutenção das colônias das leveduras, indicando que este meio tem potencialidade para indicar permanência e dominância de leveduras durante o processo fermentativo.

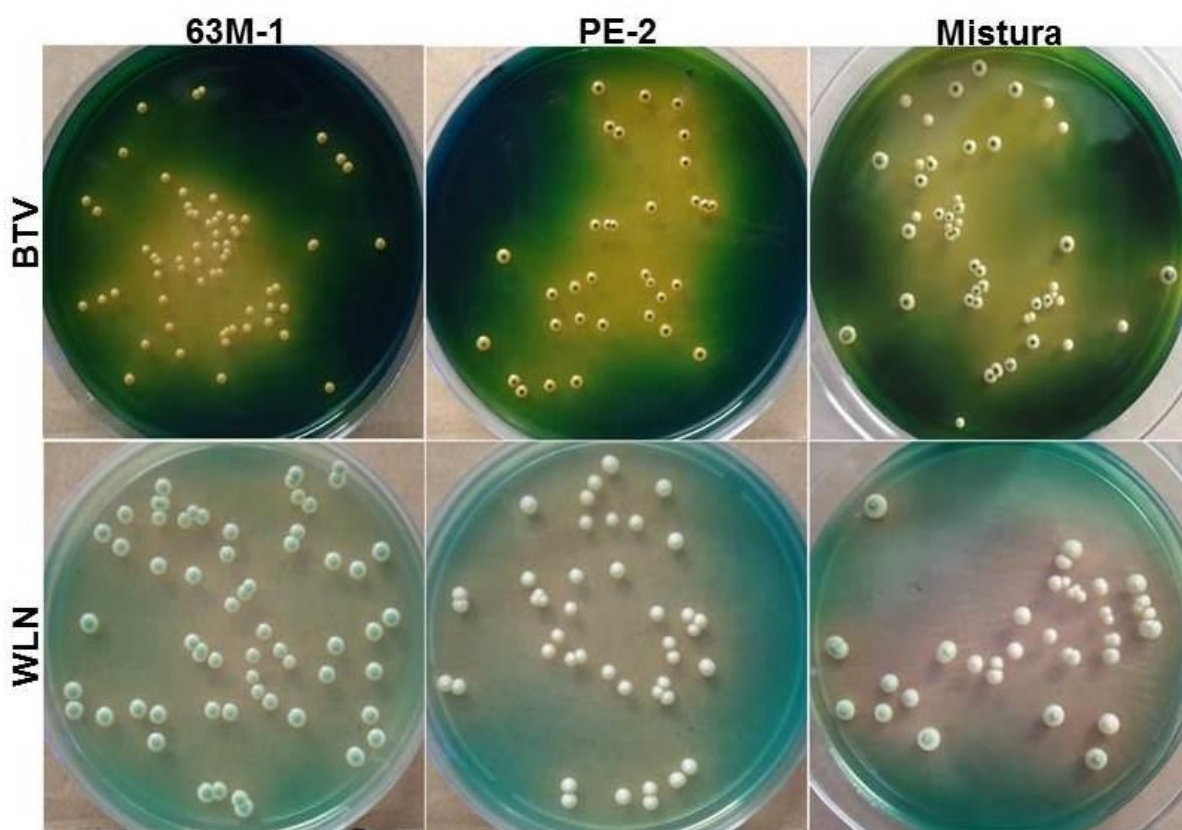


Figura 14. Plaqueamento das leveduras 63M-1 e PE-2 nos meios BTV e WLN para estabelecimento do meio de cultura a ser utilizado no monitoramento das fermentações. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.

4.2. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DAS LEVEDURAS 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 DURANTE FERMENTAÇÕES SUCESSIVAS EM BATELADA ALIMENTADA A 40 °C UTILIZANDO INÓCULO PURO

Fermentações sucessivas (5 ciclos) em melaço de cana-de-açúcar a 40 °C (indução de estresse) foram realizadas em mini-reatores (controle de temperatura, agitação e pH). As leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 foram fermentadas individualmente para conhecimento do perfil tecnológico fermentativo de cada linhagem. Os parâmetros diários analisados foram: acúmulo de biomassa, produção de etanol e viabilidade. Análises de plaqueamento nos meios sólidos cromogênicos, capacidade de esporulação e análise interdelta foram realizadas em dias intercalados, ao final do 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo para verificação e correlação entre estabilidade fenotípica e perfil molecular.

4.2.1. Monitoramento dos parâmetros fermentativos durante as fermentações sucessivas: acúmulo de biomassa, produção de etanol e manutenção da viabilidade

Micro-organismos utilizados no processo de fermentação de etanol devem ter características bem definidas, tais como: habilidade de fermentar carboidratos com alta performance, alta velocidade de fermentação, osmotolerante, tolerância ao etanol, habilidade em produzir alta concentração de etanol, tolerância a acidez do meio, alta viabilidade celular para reuso de células, resistência a altas temperaturas e estabilidade genética das características previamente mencionadas (FERRARI et al., 1980). No entanto, até o presente, não existem relatos sobre a existência de linhagens que possuam todas essas características acopladas em um único micro-organismo.

Fermentações sucessivas foram realizadas no presente estudo com a finalidade de identificar individualmente as características fermentativas das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2. Estas leveduras foram submetidas a 5 ciclos sucessivos de fermentação a 40 °C durante os quais se acompanhou o acúmulo de biomassa, produção de etanol e viabilidade (Tab. 3). Com os valores obtidos foi possível observar o acúmulo mais alto de biomassa com a linhagem 63M-3 durante os 4 ciclos fermentativos, variando de 5,95 a 8,5 g/L de biomassa. Em

seguida, a linhagem 63M-1 teve acúmulo de biomassa nos finais do primeiro e terceiro ciclo fermentativo, enquanto que as linhagens 63M-2 e PE-2 tiveram acúmulo somente no primeiro ciclo de fermentação ($2,48 \pm 0,62$ e $3,53 \pm 1,25$, g/L de biomassa, respectivamente).

Quanto à produção de etanol, a levedura 63M-1 foi a que manteve e obteve maior produção ($73,18 \pm 1,33$ g/L) até o final do 5º ciclo, seguida de produção equivalente pelas linhagens 63M-2 ($60,09 \pm 1,51$ g/L) e 63M-3 ($59,39 \pm 3,57$ g/L). A menor produção de etanol foi obtida com a linhagem comercial PE-2 ($50,41 \pm 2,53$ g/L). A manutenção mais elevada da viabilidade celular foi obtida com a levedura 63M-1 ($76,75 \pm 3,11$ %) seguida das leveduras 63M-3 ($68,10 \pm 2,95$) e PE-2 ($68,73 \pm 6,42$) e a levedura mais sensível ao processo foi a linhagem 63M-2 ($52,78 \pm 3,84$) após o 5º ciclo fermentativo. A capacidade das células se manterem viáveis em condições de estresse durante longos períodos é um perfil importante, pois garante competitividade no ambiente industrial, onde o estresse oxidativo e calor são gerados durante o processo fermentativo (ARGUESSO et al., 2009; LANDOLFO et al., 2008).

A temperatura elevada (40 °C) nas fermentações pode ser a razão para o baixo acúmulo de biomassa obtido pela maioria das leveduras durante os ciclos sucessivos de fermentação com reuso de células. Estudos sobre o impacto da temperatura sobre os parâmetros fermentativos foi reportado por Aldiguiet et al. (2004) onde este autor variou a temperatura de 27 °C a 39 °C. A temperatura ideal quanto à produção de biomassa foi de 30 °C (39 g em 30 h) e para produção de etanol foram de 30 °C a 33 °C (120 g/L). Quando a fermentação foi realizada a 39 °C houve baixa produção tanto de biomassa (≤ 2 g) quanto de etanol (29,5 g/L). As leveduras do presente estudo demonstraram serem mais tolerantes às elevadas temperaturas, pois produziram etanol mesmo em condições desfavoráveis.

Tabela 3. Acúmulo de biomassa, produção de etanol e manutenção da viabilidade das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 durante fermentações sucessivas em melaço de cana-de-açúcar realizada em batelada alimentada contendo 20 % (ART), 24 g/L de inóculo, pH 4,5 a 40 °C por 6 h.

Leveduras	Acúmulo de Biomassa (Final-Inicial em g/L)				
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo
63M-1	3,02±0,53	ND	1,13±3,94	ND	ND
63M-2	2,48±0,62	ND	ND	ND	ND
63M-3	8,49±0,37	6,27±2,02	5,95±0,40	6,81±1,70	ND
PE-2	3,53±1,25	ND	ND	ND	ND
Leveduras	Produção de Etanol (g/L)				
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo
63M-1	93,06±0,02	87,83±0,64	98,69±4,03	67,19±0,41	73,18±1,33
63M-2	81,85±1,14	66,46±0,07	76,39±9,57	70,96±1,28	60,09±1,51
63M-3	87,30±0,95	82,86±3,15	83,59±0,62	68,86±1,76	59,39±3,57
PE-2	86,36±0,56	81,54±5,53	74,82±0,42	54,87±0,27	50,41±2,53
Leveduras	Viabilidade (%)				
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo
63M-1	86,72±0,42	80,03±4,22	75,15±3,94	76,96±7,83	76,75±3,11
63M-2	94,72±1,84	92,35±3,32	76,55±4,41	76,17±2,15	52,78±3,84
63M-3	91,25±1,79	83,87±0,94	76,38±3,85	75,39±7,77	68,10±2,95
PE-2	91,67±0,03	87,19±1,03	79,02±3,80	76,02±6,16	68,73±6,42

ND- não detectável.

4.2.1.1. MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE DAS LEVEDURAS DURANTE AS FERMENTAÇÕES SUCESSIVAS: meios sólidos cromogênicos, capacidade de esporulação e análise interdelta

Meios 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 que identificam deficiência nutricional (SPENCER et al., 1989), capacidade de esporulação (JAQUET; JAUNIAUX, 1999), ploidia (YAMAZAKI; OSHIMA, 1979) e da taxonomia molecular (KURTZMAN; FELL, 1998) podem ser usados como formas rápidas para uma caracterização genômica preliminar (PALLMAN et al., 2001).

Durante as propagações realizadas no presente estudo, quatro meios de cultura foram utilizados para monitorar a estabilidade do processo, no entanto, o meio A foi o substrato que demonstrou ser o mais indicado para acompanhamento de instabilidade fenotípica durante as propagações. A reformulação do meio basal e ajuste da concentração dos corantes eosina e azul de tripano otimizou o seu uso no

quesito monitoramento de leveduras em processos fermentativos (proporção e estabilidade). Este novo meio de cultura foi denominado de meio N1 no presente estudo e será utilizado juntamente com os meios BTV e o meio de referência WLN para controle e monitoramento individual das leveduras nas fermentações sucessivas. A capacidade de esporulação foi mais uma vez via de detecção de estabilidade no processo fermentativo.

Análise do grau do polimorfismo genético entre as leveduras foram realizados através da técnica molecular da sequência interdelta, a qual permite elucidar e monitorar de forma precisa a evolução das leveduras frente ao processo fermentativo (LEGRAS; KARST, 2003; XUFRE, 2011). Os resultados (perfil polimórfico, fenotípico e capacidade de esporulação) após 5 ciclos fermentativos foram comparados com o inóculo *starter*, ou seja, aquele que deu início ao processo.

4.2.1.2. Monitoramento das fermentações sucessivas: plaqueamentos nos meios N1, BTV e WLN

As figuras 15, 16, 17 e 18 ilustram o plaqueamento das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 nos meios sólidos diferenciais (~ 50 UFC/placa) no final do 1º, 3º e 5º ciclo das fermentações sucessivas. Foi utilizado como parâmetro a homogeneidade das colônias em placas (tamanho e borda) e a manutenção da coloração das leveduras nos meios cromogênicos.

A Fig. 15 ilustra o plaqueamento da levedura 63M-1 da sua cultura estoque e durante os ciclos fermentativos (1º, 3º e 5º ciclo). Não foi possível detectar fenótipos de relevância durante os plaqueamentos, somente o aparecimento de alguns petites (deficientes respiratórios) nos meios N1 e BTV (ver colônia pequena e corada intensamente). Estas colônias foram transferidas para o meio YEPG as quais apresentaram crescimento negativo indicando ser mutantes respiratórios.

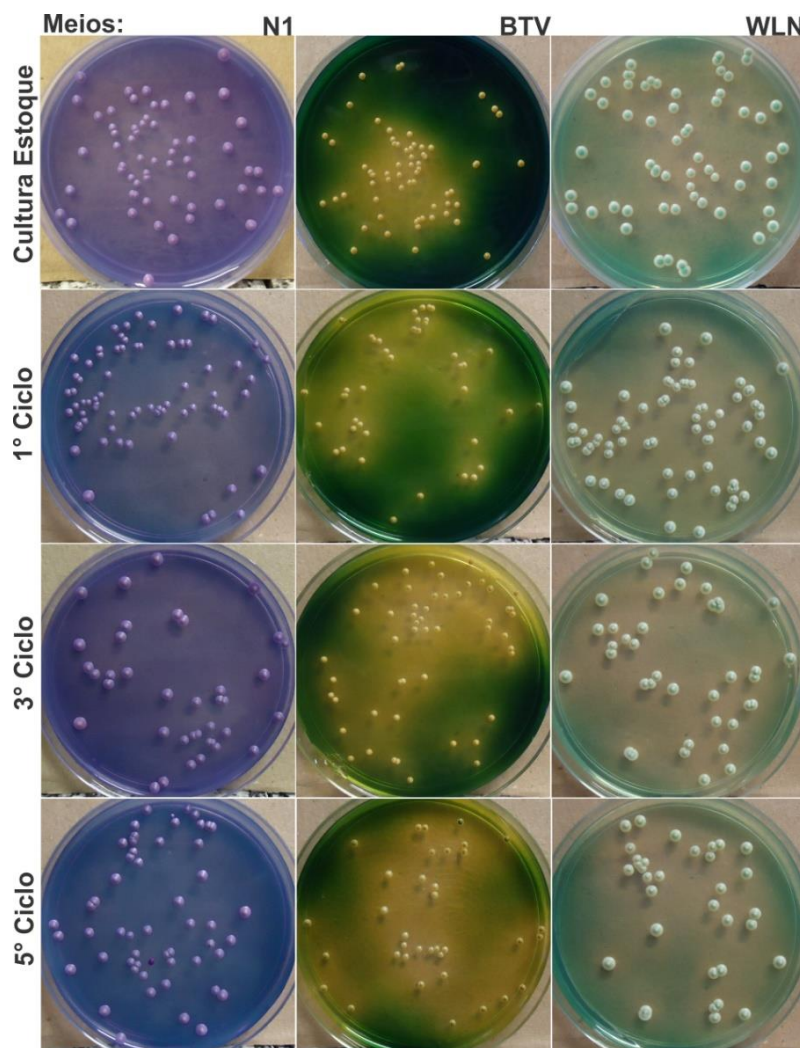


Figura 15. Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura 63M-1 e de amostras coletadas de reatores após 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo a 40 °C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.

A Fig. 16 ilustra o plaqueamento da levedura auxotrófica 63M-2 (*lys/lys*). A cultura estoque desta levedura apresentou uma coloração mais intensa no meio N1 do que as leveduras prototróficas (63M-1, 63M-3 e PE-2). Como mencionado anteriormente, esta levedura após propagações a 34 °C e 37 °C revelou o aparecimento de colônias revertentes *LYS*⁺ (ver Fig. 8). Durante as fermentações sucessivas realizadas a 40 °C, todas as colônias mostraram ser prototróficas e não houve o reaparecimento de colônias auxotróficas. Variantes fenotípicos como mutantes respiratórios também foram detectados durante as fermentações sucessivas, porém sem alterações ao processo.

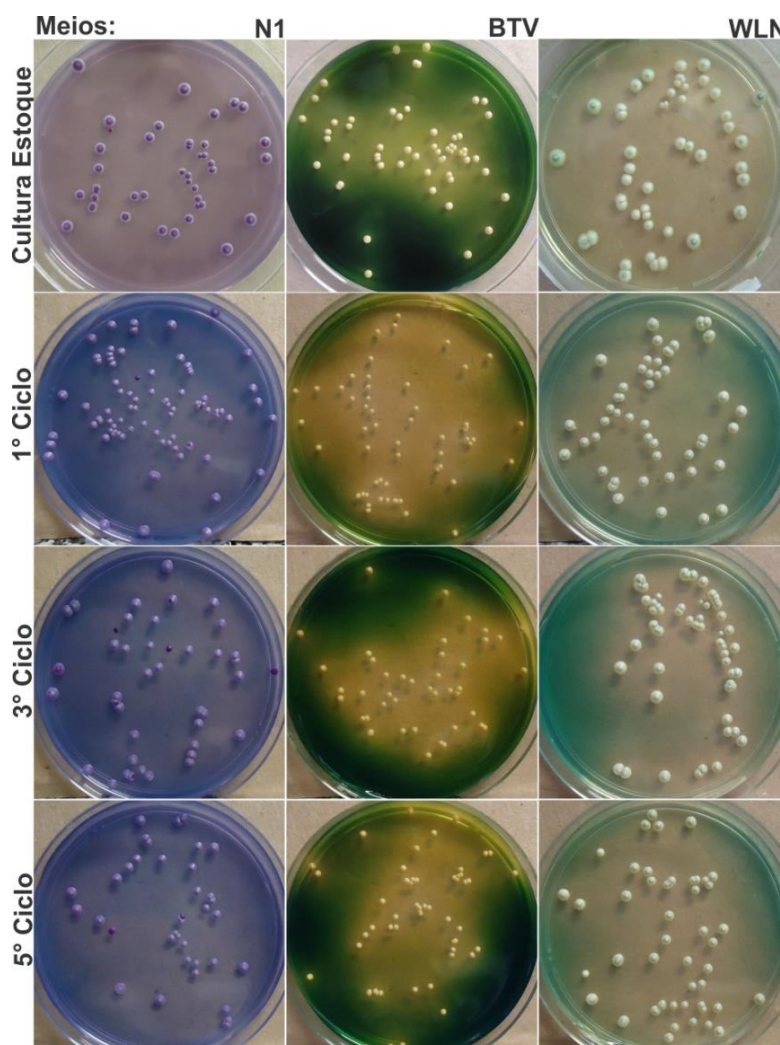


Figura 16. Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura 63M-2 e de amostras coletadas de reatores após 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo a 40 °C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.

A Fig. 17 ilustra o plaqueamento da levedura 63M-3 (revertente LYS^+). Esta levedura (63M-3) também apresentou colônias homogêneas durante as fermentações sucessivas nos meios N1, BTV e WLN. Com isso, pode-se afirmar que as leveduras da coleção de cultura do nosso laboratório apresentaram estabilidade fenotípica durante as fermentações sucessivas, não havendo alterações morfológicas quanto à coloração das colônias, homogeneidade do tamanho e borda.

Em meio sólido rico as células de levedura *S. cerevisiae* formam colônias lisas, porém em condições desfavoráveis uma diversidade de fenótipos de colônias pode aparecer em meios sólidos pobres. Morfologias diversas como formação de pseudo-

hifas (meio líquido), crescimento invasivo (meios sólidos) são ocasionadas em ambientes desfavoráveis com deficiência nutricional (KRON, 1997). A concentração da fonte de carbono e o tempo de crescimento também alteram as morfologias das colônias. Outro fator que pode determinar o tipo de morfologia das colônias são as mutações (colônias rugosas e/ou *fluffy*). A morfologia das colônias também depende da ploidia e variam com o tipo de reação de acasalamento dos haplóides. Alta concentração de etanol também pode induzir variações fenotípicas nas colônias de leveduras (CASALONE et al., 2005). As explicações para estes fenômenos são pouco conhecidas. Sabe-se, no entanto que estas diversidades morfológicas surgem como consequência de limitação de um ou mais nutrientes no meio (GRANEK; MAGWENE, 2010) e que o gene FLO11 codifica o fenótipo para adesão entre células e está envolvido com a formação de filamentos celulares, crescimento invasivo, floculação e aderência a superfícies sólidas (FIDALGO et al., 2009).

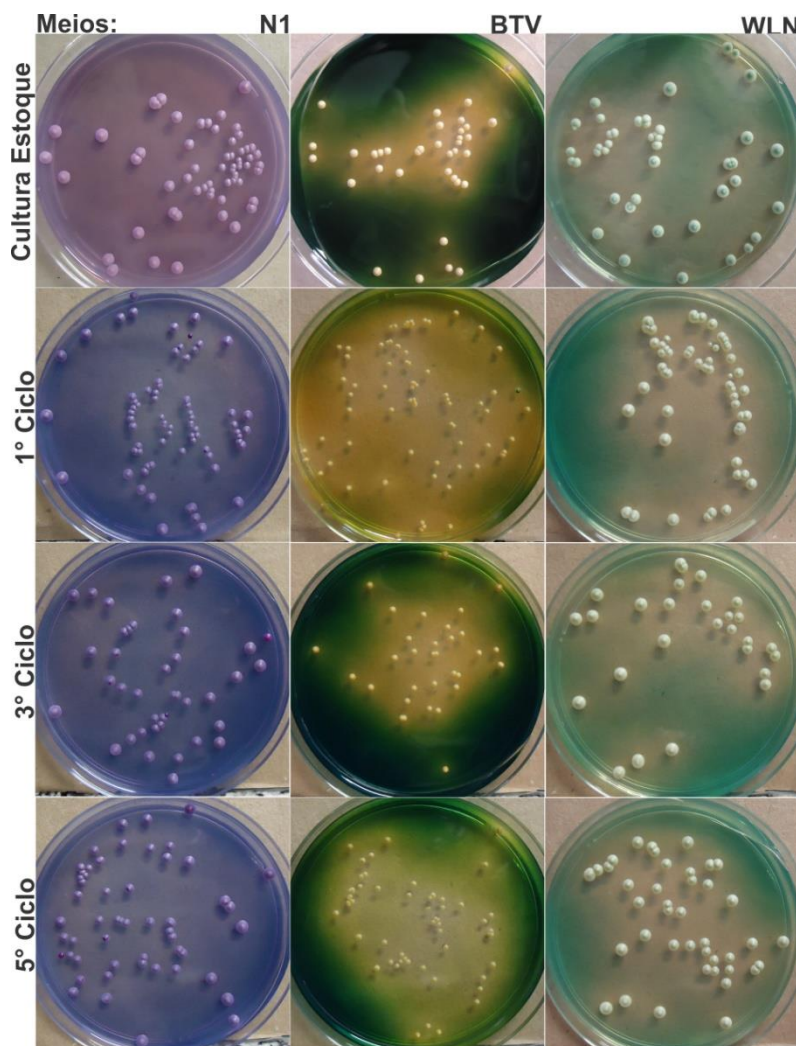


Figura 17. Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura 63M-3 e de amostras coletadas de reatores após 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo a 40°C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.

A Fig. 18 ilustra o plaqueamento da levedura comercial PE-2. Esta linhagem apresentou homogeneidade entre as suas colônias em todos os meios e durante o processo fermentativo, onde a coloração típica desta levedura foi mantida. A manutenção da coloração das colônias nos plaqueamentos nos meios desenvolvidos N1 e BTV (Fig. 15-18) reforçaram a ideia da utilização destes meios sólidos no monitoramento populacional de leveduras durante as fermentações mistas. O controle populacional em processos fermentativos quanto à permanência e dominância de leveduras são frequentemente monitorados através de técnicas moleculares (BASSO et al., 2008; XUFRE et al., 2011), no entanto não há relatos na

literatura de meios de cultura que permitam verificar de forma simples a permanência do inóculo *starter*. A confirmação e reprodução do uso destes meios pode induzir ao setor industrial uma maior autonomia em análises de rotina.

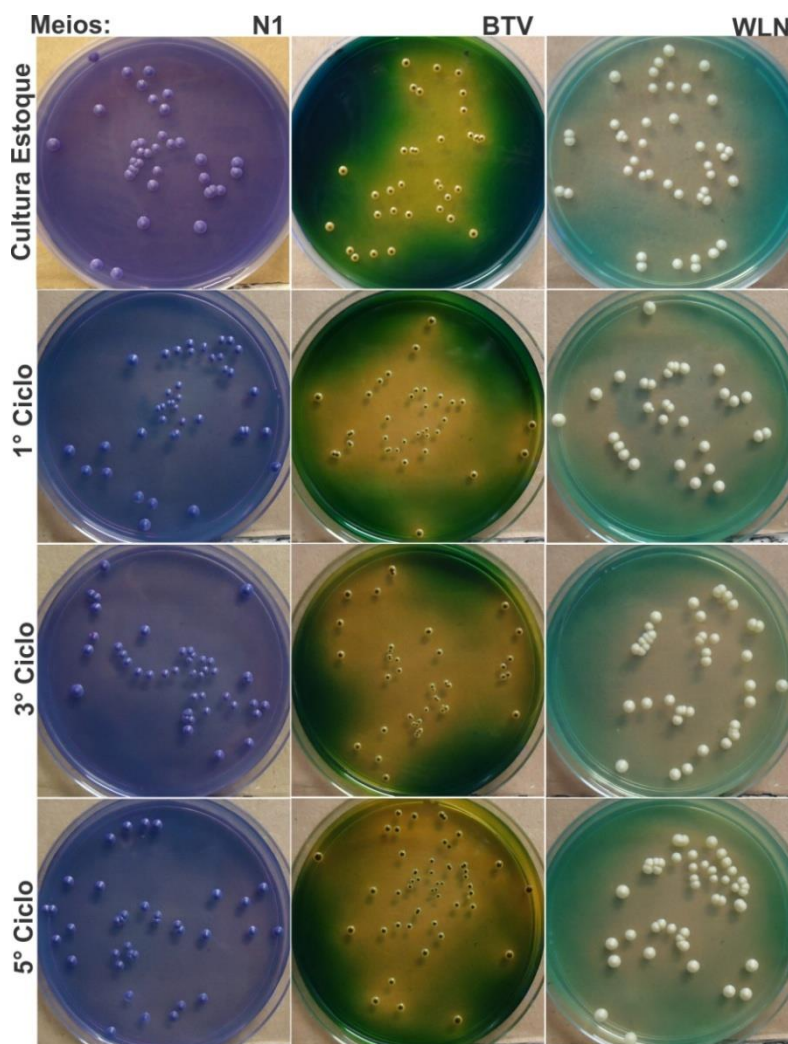


Figura 18. Plaqueamento nos meios cromogênicos N1, BTV e WLN da cultura estoque da levedura PE-2 e de amostras coletadas de reatores após 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo a 40°C. Placas incubadas durante 5 dias a 30 °C.

4.2.1.3. Monitoramento das fermentações sucessivas: capacidade de esporulação

A esporulação, indução de formas diploides em haploides por meio de esgotamento de fontes de nitrogênio, foi realizada durante as fermentações sucessivas, onde amostras retiradas dos mini-reatores (final do 1º, 3º e 5º ciclo) foram inoculadas em meio contendo acetato de potássio. A Fig. 19 ilustra a capacidade de esporulação das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2. Alta frequência de esporulação foi obtida para todas as linhagens (frequência próxima à cultura estoque). A levedura 63M-1 foi à linhagem que apresentou maior estabilidade na frequência de esporulação durante os ciclos fermentativos e a levedura industrial PE-2 apresentou uma esporulação mais lenta (sete dias de incubação). Este comportamento foi observado anteriormente durante a esporulação das propagações (ver Fig. 13). Segundo Gerke et al. (2006), a fração de células que esporulam em uma cultura, é denominada de capacidade de esporulação, e isto varia hereditariamente entre as linhagens de levedura. A linhagem de laboratório S288c é um exemplo de levedura de baixa esporulação e a linhagem SK1 é uma levedura com alta eficiência em esporulação (GERKE et al., 2006). A levedura 63M-2 teve sua capacidade de esporulação aumentada durante as fermentações sucessivas (Fig. 19) quando comparadas com a esporulação da sua cultura propagada (Fig. 13). Isto pode ser devido a esta levedura não estar mais em fase de transição de células *lys*⁻ revertentes em *Lys*⁺.

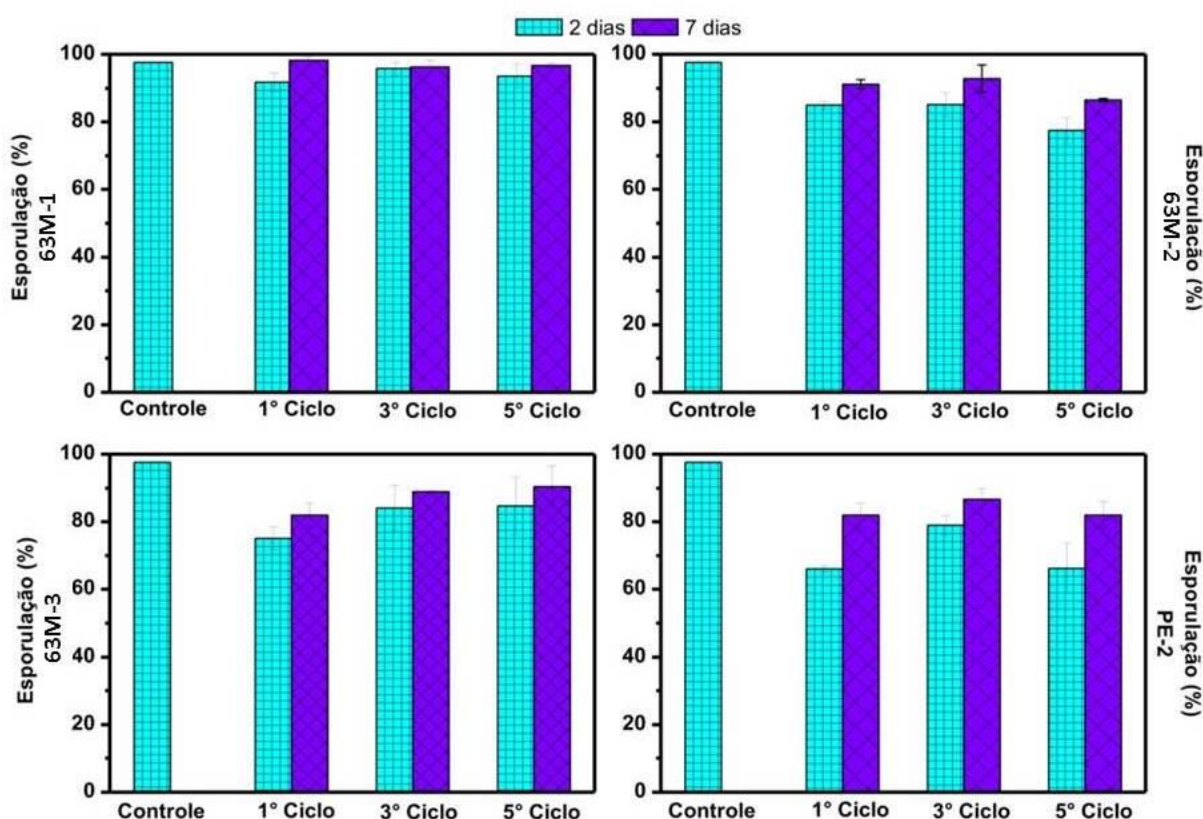


Figura 19. Frequência de esporulação da cultura estoque das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 e das amostras coletadas de reatores após 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo a 40°C. Células incubadas em meio contendo 1 % (m/v) de acetato de potássio, agitação de 125 rpm a 30 °C.

4.2.1.4. Monitoramento das fermentações sucessivas: análise interdelta

Nos últimos anos, várias metodologias de tipagem baseados em polimorfismos de DNA têm sido desenvolvidos permitindo identificar e discriminar cepas de leveduras (SCHULLER et al., 2004). Técnicas moleculares são exigidas para diagnosticar e caracterizar o comportamento dinâmico de leveduras durante a fermentação. No presente estudo, pesquisas sobre o polimorfismo das leveduras 63M-1, 63M-2, 63M-3 e PE-2 durante as fermentações sucessivas a 40 °C foram realizados através da técnica molecular de sequência interdelta. Estas sequências flanqueiam (300 pb) os retrotransposons *TY1* e *TY2* que se encontram dispersos ao longo do genoma (particularmente na região terminal cromossômica), mas também podem ser encontradas como elementos únicos. Os 300 elementos delta foram descritos no genoma da linhagem de laboratório S288c. Uma vez que o número e

localização de elementos delta tem uma certa variabilidade intraespecífica, eles são marcadores genéticos apropriados para a identificação de polimorfismos (FRANCO-DUARTE et al., 2011).

As Figs. 20, 21, 22 e 23 ilustram o perfil eletroforético da reação de PCR utilizando par de *primers* delta2/delta12 e delta12/delta21. Todas as combinações revelaram diferentes polimorfismos entre as leveduras, porém a combinação que revelou um perfil polimórfico mais distinto foi com o uso do par de *primers* delta2/delta12. A análise interdelta também possibilitou diferenciar as linhagens entre si, no entanto, devido ao fato destas leveduras (63M-1; 63M-2 e 63M-3) serem derivadas uma das outras foi possível observar similaridade polimórfica entre as suas bandas. Segundo FRANCO-DUARTE et al. (2011), a amplificação de regiões interdelta entre sequências delta “vizinhas” resulta em uma mistura de diferentes tamanhos de fragmentos intraespecíficos entre linhagens. Já a levedura PE-2 apresentou bandas completamente distintas das obtidas pelas leveduras de coleção de cultura do nosso laboratório. Variações polimórficas durante os ciclos sucessivos não foram detectadas durante os ciclos sucessivos de fermentação para todas as leveduras.

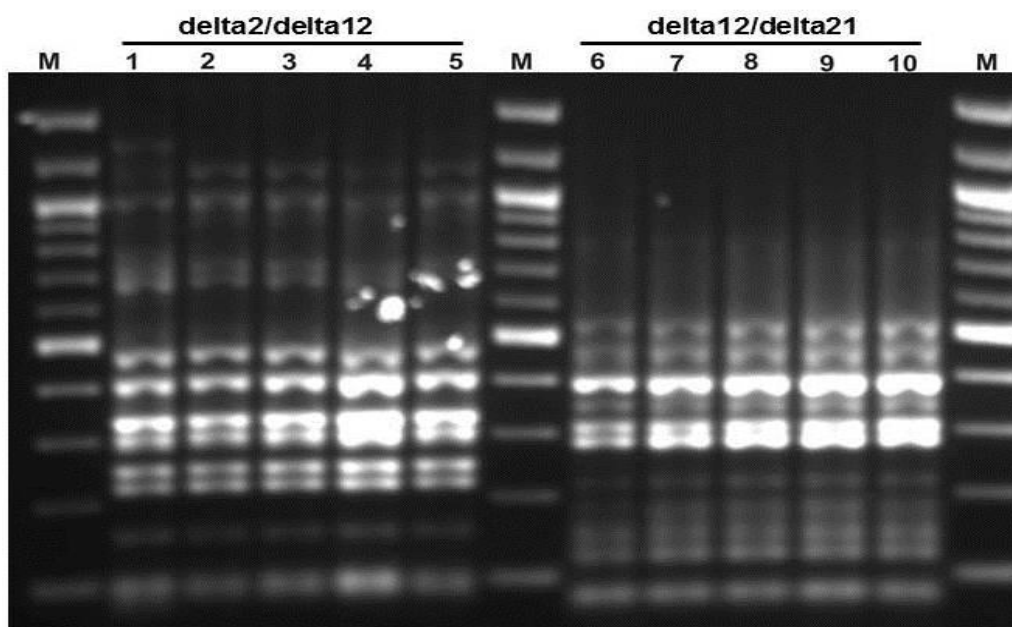


Figura 20. Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura 63M-1 em gel de agarose 1,2 % (m/v). **M:** marcador 100 pb; **1 e 6:** levedura estoque; **2 e 7:** levedura propagada; **3 e 8:** levedura final 1° ciclo fermentativo; **4 e 9:** levedura final 3° ciclo fermentativo e; **5 e 10:** levedura final 5° ciclo fermentativo.

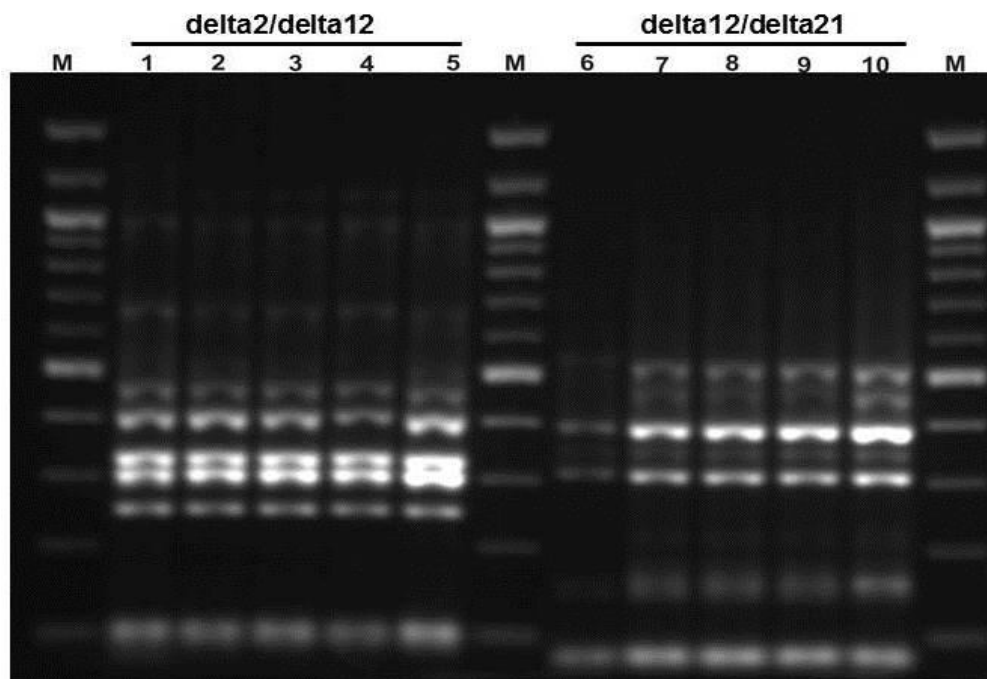


Figura 21. Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura 63M-2 em gel de agarose 1,2 % (m/v). **M:** marcador 100 pb; **1 e 6:** levedura estoque; **2 e 7:** levedura propagada; **3 e 8:** levedura final 1º ciclo fermentativo; **4 e 9:** levedura final 3º ciclo fermentativo e; **5 e 10:** levedura final 5º ciclo fermentativo.

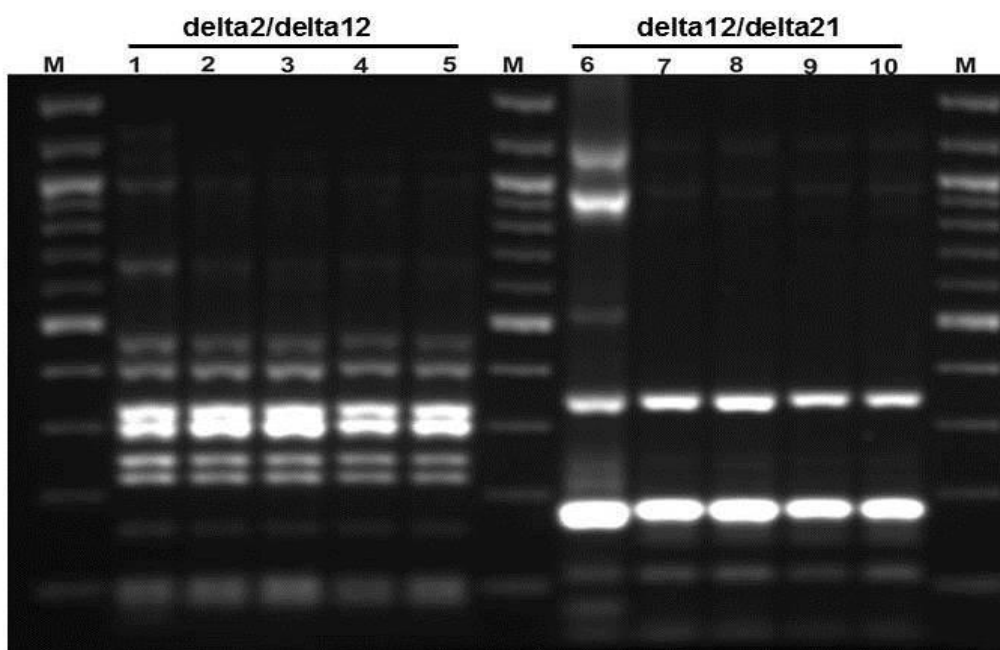


Figura 22. Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura 63M-3 em gel de agarose 1,2 % (m/v). **M:** marcador 100 pb; **1 e 6:** levedura estoque; **2 e 7:** levedura propagada; **3 e 8:** levedura final 1º ciclo fermentativo; **4 e 9:** levedura final 3º ciclo fermentativo e; **5 e 10:** levedura final 5º ciclo fermentativo.

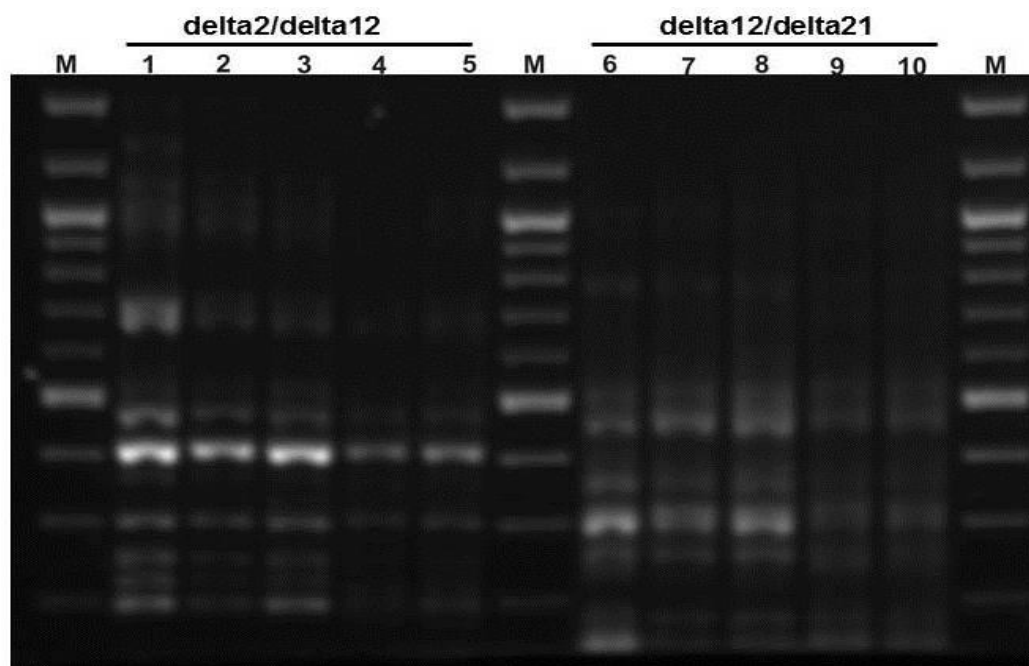


Figura 23. Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta da levedura PE-2. em gel de agarose 1,2 % (m/v). **M:** marcador 100 pb; **1 e 6:** levedura estoque; **2 e 7:** levedura propagada; **3 e 8:** levedura final 1° ciclo fermentativo; **4 e 9:** levedura final 3° ciclo fermentativo e; **5 e 10:** levedura final 5° ciclo fermentativo.

4.3. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DURANTE FERMENTAÇÕES SUCESSIVAS EM BATELADA ALIMENTADA A 40 °C UTILIZANDO INÓCULO MISTO

Com base nos resultados obtidos na seção 4.2., duas linhagens de leveduras foram escolhidas para serem utilizadas nas fermentações mistas (proporção 1:1), sendo a levedura 63M-3 (elevado acúmulo de biomassa) e PE-2 (linhagem de referência industrial). Os testes de acúmulo de biomassa, etanol e viabilidade foram realizados após cada ciclo de fermentação. Plaqueamentos nos meios sólidos cromogênicos N1, BTV e WLN foram realizados após o 1°, 3° e 5° ciclo fermentativo, para análise da proporção das leveduras na fermentação mista (permanência e dominância). A análise interdelta foi realizada através da extração direta das colônias de leveduras crescidas nos meios cromogênicos para validar a utilização de técnicas simples como alternativa de monitoramento de leveduras em processos fermentativos.

4.3.1. Monitoramento dos parâmetros fermentativos durante as fermentações sucessivas: acúmulo de biomassa, produção de etanol e manutenção da viabilidade

É de comum conhecimento entre pesquisadores e pessoas que trabalham envolvidos na produção de etanol em larga escala que o inóculo escolhido para dar início a safra deve ser uma cepa adaptada ao processo, pois é de fundamental importância que a levedura mantenha a estabilidade da população, que por sua vez, leva a reprodutibilidade (constante) na produção de etanol (DELLA-BIANCA et al., 2013).

No presente estudo, duas linhagens foram utilizadas para as fermentações mistas sendo uma linhagem da coleção de cultura do nosso laboratório 63M-3 e a linhagem comercial industrial PE-2 (BASSO et al., 2008). A tabela 4 indica os parâmetros fermentativos quanto ao acúmulo de biomassa, produção de etanol e viabilidade durante as fermentações sucessivas mistas a 40 °C. Comparando-se individualmente as fermentações destas linhagens (Tab.4) é possível dizer que a fermentação mista teve efeito sinérgico (aumento de ~ 1,3 vezes) na produção de etanol ($69,47 \pm 4,01$ g/L), pois a sua produção durante as fermentações puras foi de $59,39 \pm 3,57$ g/L (63M-3) e de $50,41 \pm 2,53$ g/L (PE-2) ao final do 5º ciclo fermentativo. Quanto à viabilidade o efeito foi neutro para ambas as leveduras (mesma viabilidade na fermentação individual e mista) e quanto à produção de biomassa, esse efeito foi antagônico para a levedura 63M-3, pois esta individualmente teve acúmulo de biomassa até o quarto ciclo de fermentação ao passo que na fermentação mista houve acúmulo até o segundo ciclo fermentativo.

Destilarias brasileiras geralmente iniciam a fermentação utilizando mais de um inóculo *starter* sendo as leveduras PE-2, CAT-1, BG-1 (BASSO et al., 2008) e FT-858 dentre outras, as mais utilizadas para produção de bioetanol. A destilaria Usina Santa Cruz S/A- Açúcar e Alcool localizada em Américo Brasiliense inicia a safra utilizando como inóculo *starter* a mistura de igual proporção das linhagens descritas acima.

Tabela 4. Comparação da produção de etanol, acúmulo de biomassa e manutenção da viabilidade entre as fermentações sucessivas utilizando inóculo puro e misto (proporção 1:1) das leveduras 63M-3 e PE-2. Fermentação realizada em melaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada contendo 20 % (ART), 24 g/L de inólulo, pH 4,5 a 40 °C por 6 h.

Leveduras	Acúmulo de Biomassa (Final-Inicial em g/L)				
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo
63M-3:PE-2	7,91±3,41	2,34±1,82	ND	ND	ND
63M-3	8,49±0,37	6,27±2,02	5,95±0,40	6,81±1,70	ND
PE-2	3,53±1,25	ND	ND	ND	ND
Leveduras	Produção de Etanol (g/L)				
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo
63M-3:PE-2	84,87±0,94	77,33±0,57	76,94±1,17	63,91±4,88	69,47±4,01
63M-3	87,30±0,95	82,86±3,15	83,59±0,62	68,86±1,76	59,39±3,57
PE-2	86,36±0,56	81,54±5,53	74,82±0,42	54,87±0,27	50,41±2,53
Leveduras	Viabilidade (%)				
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo
63M-3:PE-2	86,81±2,10	85,69±2,41	77,30±0,06	70,25±3,06	69,53±6,44
63M-3	91,25±1,79	83,87±0,94	76,38±3,85	75,39±7,77	68,10±2,95
PE-2	91,67±0,03	87,19±1,03	79,02±3,80	76,02±6,16	68,73±6,42

ND- não detectável.

4.3.2. Monitoramento das fermentações sucessivas: análise de dominância e persistência

A literatura se refere ao termo grau de dominância de uma linhagem de levedura como sendo a proporção desta linhagem na população de células do fermentador, a qual é dependente do seu grau de competitividade em relação a outras leveduras e da sua velocidade específica de crescimento. Em contraste, persistência significa a habilidade da linhagem permanecer no reator por resistir as múltiplas condições de estresse do processo de fermentação do bioetanol (DELLA-BIANCA et al., 2013).

A Fig. 24 ilustra o método utilizado para acompanhar a dominância e permanência das leveduras 63M-3 e PE-2 durante fermentações sucessivas. Os plaqueamentos foram realizados no início do 1º ciclo para verificar a proporção inicial de cada inóculo no fermentador e no final do 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo. Para tal, a população de células foram plaqueadas nos meios N1, BTV e WLN e incubadas durante 5 dias a 30 °C. Para surpresa dos resultados, foi verificado a potencialidade do meio N1 (além de distinguir colônias de leveduras prototróficas de auxotróficas) distinguir as colônias de leveduras quando plaqueadas em cultura mista, ou seja, ambos os meios N1 e BTV são capazes de diferenciar as colônias de

leveduras pela coloração, sendo assim possível calcular a proporção de cada cepa durante as fermentações sucessivas. Mais uma vez, o meio WLN não permitiu com clareza diferenciar as colônias do inóculo misto crescido em placas.

A escolha do método mais apropriado a ser incluído na rotina de destilarias é um quesito muito importante, pois compreende equipe técnica, tempo e custo operacional. No Brasil, análise de identificação de leveduras são realizadas por empresas terceirizadas. A técnica de cariotipagem tem sido utilizada para determinar a dominância e persistência de leveduras em diferentes plantas de produção de bioetanol (BASSO et al., 2008).

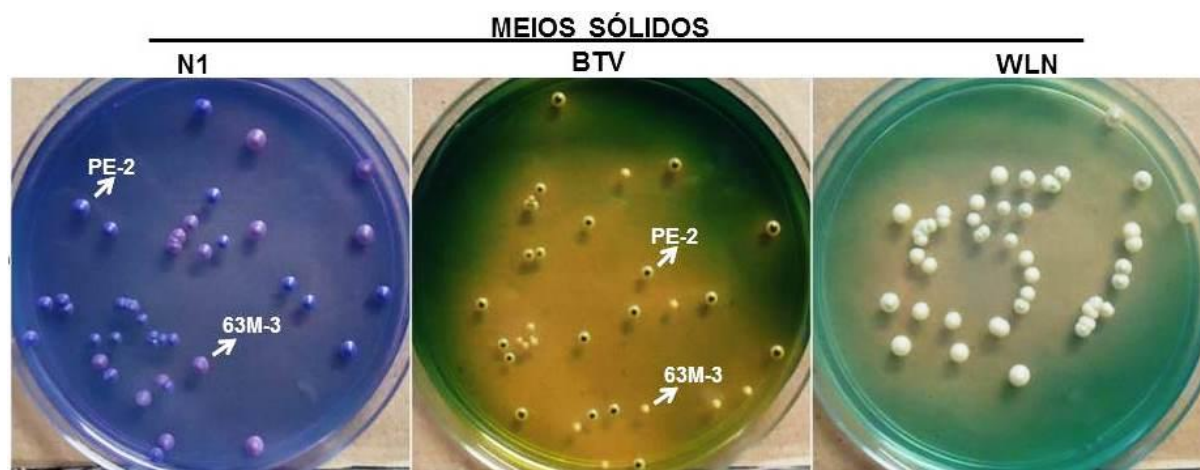


Figura 24. Monitoramento da população mista das leveduras 63M-3 e PE-2 durante ciclos sucessivos de fermentação através de plaqueamentos nos meios N1, BTV e WLN. Placas incubadas durante cinco dias a 30 °C.

O gráfico abaixo (Fig. 25) indica os valores da proporção (UFC/mL e %) das leveduras 63M-3 e PE-2 durante as fermentações mistas. O cálculo foi baseado na média do número de colônias crescidas nos meios N1 e BTV. O gráfico indica que no início do primeiro ciclo de fermentação a levedura PE-2 iniciou o processo com maior proporção (64 %) e esta foi mantida até o final do 5° ciclo fermentativo (68 %). No entanto, no 3° e no 4° ciclo, a proporção da levedura 63M-3 foi elevada, porém, no final do 5° ciclo tanto a levedura 63M-3 quanto a PE-2 tiveram a mesma proporção que deu início ao processo. Com isso, pode-se concluir que as leveduras mantiveram o mesmo grau de permanência e dominância durante os cinco ciclos fermentativos. A escolha do inóculo *starter* é primordial para garantir reprodução no processo. Linhagens que apresentam alta eficiência fermentativa no ambiente

industrial tendem a ser mais robustas e isto prolonga a sua permanência na fermentação (ARGUESSO et al., 2009). Esta característica é de fundamental importância, uma vez que a fermentação é feita com reuso de células (ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013), apresentando vantagens na energia industrial prevenindo a geração excessiva de biomassa celular e garantindo reprodutibilidade do processo.

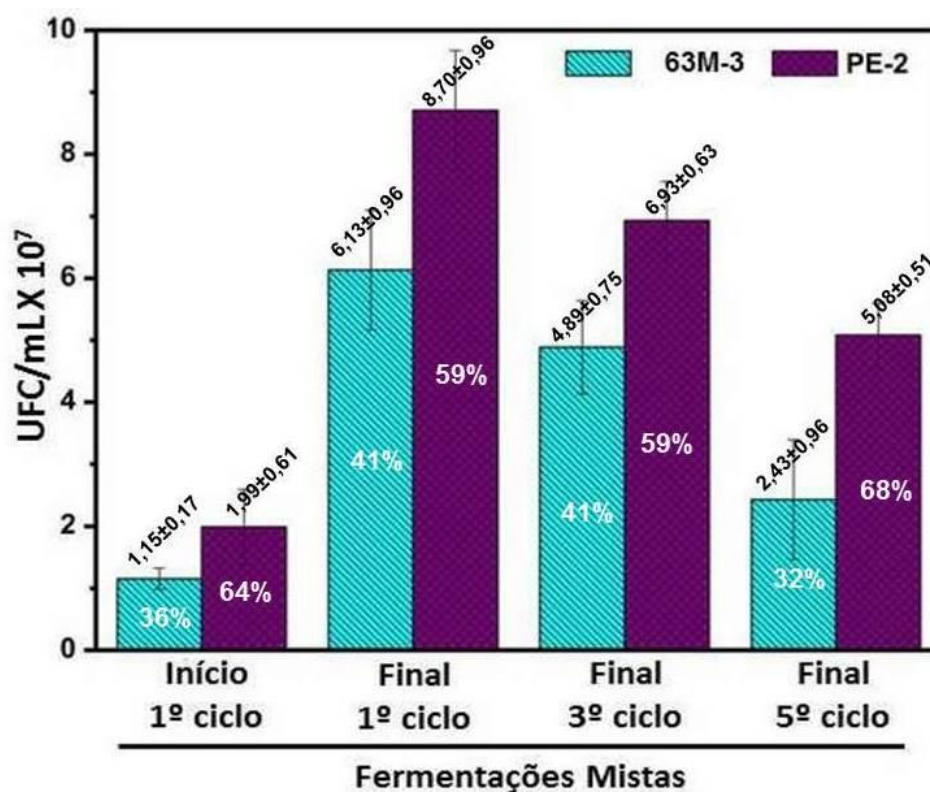


Figura 25. Concentração e proporção do inóculo (UFC/mL x 10⁷) obtidos através de contagem de colônias nos meios sólidos cromogênicos das fermentações sucessivas mistas das leveduras 63M-3 e PE-2 realizadas a 40 °C.

4.3.3. Validação do monitoramento das fermentações sucessivas: análise interdelta

Culturas *starters* de processos fermentativos geralmente são inoculadas em consórcio entre diferentes linhagens de mesma espécie. Nas fermentações mistas do presente estudo utilizando as linhagens de *S. cerevisiae* (63M-3 e PE-2), o monitoramento preliminar para avaliar a proporção destas leveduras foi através de

plaqueamentos nos meios sólidos N1 e BTV (ver Fig. 24). A análise interdelta foi utilizada para confirmar e validar estes resultados. A Fig. 26 mostra os perfis eletroforéticos das colônias de leveduras extraídas dos plaqueamentos nos meios sólidos diferenciais durante a fermentação mista. Os perfis obtidos revelaram que o uso destes meios é uma técnica reprodutível e confiável já que o grau de polimorfismo das bandas obtidas no gel de eletroforese demonstrou ser idênticos aos das leveduras inoculadas (comparar perfil da Fig. 26 com Fig. 22 e 23 $\Delta 2/\Delta 12$), sendo o perfil A correspondente a levedura 63M-3 e o perfil B da levedura industrial PE-2. Xufre et al. (2011) utilizou a técnica interdelta para monitorar a evolução de leveduras durante fermentação de vinho, onde o uso do par de *primers* $\Delta 2/\Delta 12$ permitiu não somente diferenciar as amostras analisadas bem como detectar a proporção relativa de cada linhagem durante o curso fermentativo. Segundo Schuller et al. (2004), a amplificação da sequência delta é um método conveniente, rápido, reprodutível e sensível.

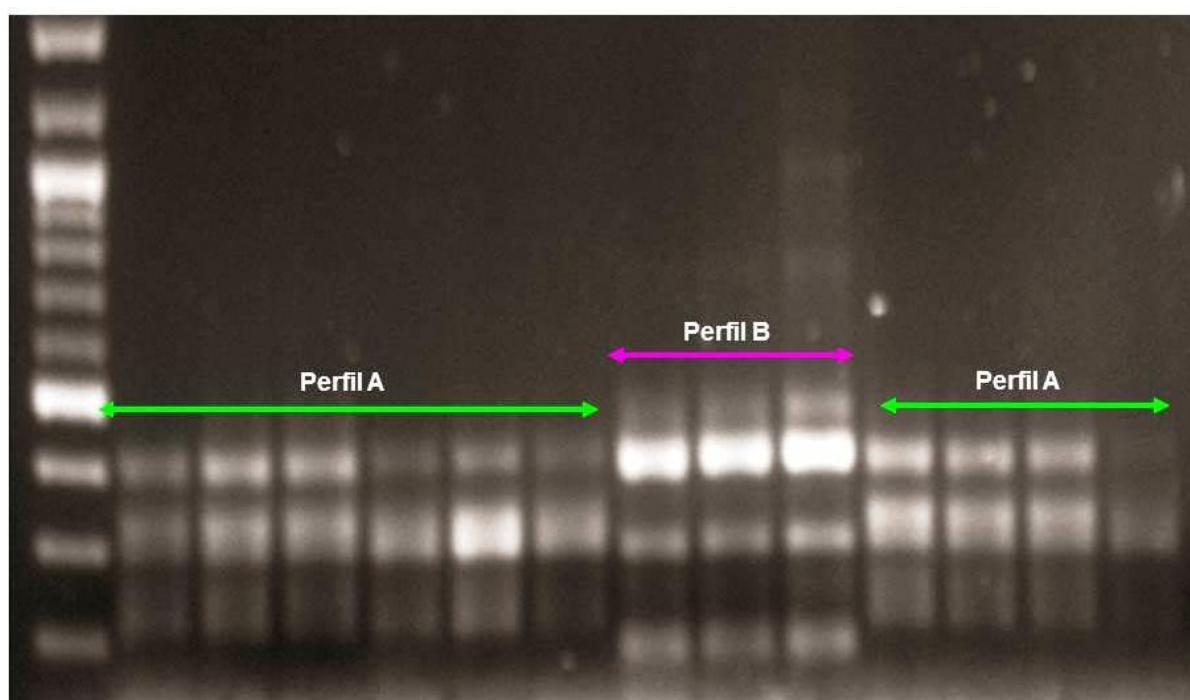


Figura 26. Perfil eletroforético da amplificação por PCR das regiões interdelta utilizando par de *primers* $\Delta 2/\Delta 12$ em gel de agarose 1,2 % (m/v) das colônias de leveduras 63M-3 e PE-2 plaqueadas durante as fermentações mistas.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS INDÍGENAS PARA PRODUÇÃO DE VINHO

A qualidade do vinho é altamente influenciada pelas espécies de leveduras ou linhagens envolvidas no processo fermentativo (CAPECE et al., 2013). Durante doutorado sanduíche, foi proposta a utilização de leveduras *S. cerevisiae* destinadas principalmente à produção de etanol combustível para a produção de vinho. Um total de 9 linhagens de leveduras brasileiras foram utilizadas, sendo 5 da coleção de cultura do nosso laboratório e 4 linhagens de leveduras comerciais (ver tabela 2- Material e Métodos). Como controle dos experimentos, linhagens de *S. cerevisiae* destinadas a produção de vinho foram utilizadas sendo 4 leveduras do laboratório de leveduras fermentadoras da Profa. Patrizia Romano (Itália) e uma linhagem comercial isolada na França.

4.4.1. Caracterização de leveduras para produção de vinho: resistência ao dióxido de enxofre, produção de sulfeto de hidrogênio e atividade *killer*

Caracterizações preliminares de aspecto tecnológico relevante para a produção de vinho foram realizadas para discriminar o perfil das leveduras indígenas. A Tab. 5 descreve a resistência de leveduras ao dióxido de enxofre, produção de sulfeto de hidrogênio e presença ou ausência do fenótipo *killer*. Usualmente, dióxido de enxofre é adicionado ao mosto de uva, pois tem um efeito antimicrobiano que auxilia na eliminação e/ou minimização da influência de leveduras não-*saccharomyces* (FLEET, 2008) e bactérias lácticas ao processo fermentativo (FREGONI et al., 2008).

O teste de resistência ao dióxido de enxofre (0-300 ppm) identificou um grupo de leveduras mais resistente na presença do composto SO₂, (crescimento na presença de 300 ppm) sendo este grupo constituído pelas linhagens do nosso laboratório (OSMO-8, 63M-1, 63M-2 e 63M-3) e pelas linhagens de levedura italiana (4LBI-3, 5TB8-60 e RB3-7CS2). Outro grupo de leveduras, contendo leveduras brasileiras industriais com resistência intermediária: PV-2, PE-2, CAT-1, BG-1, FT858 e EC1118. A levedura SC₂-37 apresentou baixa resistência ao SO₂, no entanto, esta sensibilidade não afeta o processo fermentativo, pois a concentração antimicrobiana utilizada é na faixa de 50 ppm de SO₂, a qual apresenta efeito

inibitório para espécies não- *Saccharomyces* (inibição total pela levedura *P. apiculatus* KA-397). Este efeito inibitório geralmente afeta leveduras com baixo grau de fermentação, tais como *Rodhotorula*, *Koeklera*, *Cândida* e *Pichia* (FREGONI et al., 2008). A presença de SO₂ modifica a carga microbiana estimulando a atividade proteásica (FREGONI et al., 2008).

Sabores ruins, denominados de *off-flavors* são devidos aos compostos voláteis derivados do metabolismo da levedura durante a fermentação alcoólica. Estes *off-flavours* são uma grande preocupação na produção de bebidas tais como vinho, cidra e cerveja (UGLIANO et al. 2011). A produção de sulfeto de hidrogênio é um importante contribuinte para o chamado *off-flavour* por apresentar odores de ovo podre e de putrefação (UGLIANO et al. 2011). Testes em meios sólidos (BiGGY) foram realizados para determinar a produção do composto H₂S pelas leveduras, o qual identificou 3 linhagens com produção baixa de H₂S (EC1118, RB3-7CS2 e SC₂-37). As leveduras do Brasil e duas linhagens da Itália apresentaram produção moderada do composto H₂S. Não foi identificado neste teste linhagens com alta produção do composto.

A contaminação de leveduras selvagens e de fungos durante a fermentação de vinho utilizando a levedura *S. cerevisiae* é um sério problema nas indústrias. Para redução na contaminação de espécies indesejáveis, leveduras com fenótipo *killer* são utilizadas como cultura *starter* ou inoculadas durante o processo de fermentação de vinho (MADHUSUDAN; JOISHY, 2005). A tabela abaixo descreve a presença e ausência do fenótipo *killer* onde se detectou a presença do fenótipo *killer* somente duas linhagens (EC1118 e 4LBI-3), sendo este fenótipo mais intenso nestas linhagens que nas linhagens utilizadas como controle (*Killer* 1 e 2). Com isso, linhagens *killer* de *S. cerevisiae* tem a vantagem de permanecer até ao final da fermentação de vinho (FLEET, 2003), pois atuam inibindo linhagens sensíveis ao fenótipo e competindo com linhagens neutras.

Tabela 5. Caracterização tecnológica de leveduras para produção de vinho: resistência ao dióxido de enxofre, produção de sulfeto de hidrogênio e ausência ou presença do fenótipo *killer*.

Linhagens de Levedura	Resistência a SO ₂ (ppm)	Produção H ₂ S	Fenótipo <i>Killer</i>
OSMO-8	300	++	-
PV-2	150	++	-
63M-1	300	++	-
63M-2	300	++	-
63M-3	300	++	-
PE-2	200	++	-
CAT-1	150	++	-
BG-1	150	++	-
FT858	150	++	-
4LBI-3	300	++	++
5TB8-60	300	++	-
RB3-7CS2	300	+	-
SC ₂ -37	100	+	
EC1118	200	+	++
KA-397	0	ND	ND
<i>Killer 1</i>	ND	ND	+
<i>Killer 2</i>	ND	ND	+

ND: não detectado.

4.4.2. Caracterização genética das leveduras: análise interdelta e de agrupamento

O método interdelta é frequentemente utilizado para identificação do perfil polimórfico de leveduras. Este tipo de tipagem molecular em *S. cerevisiae* foi proposto primeiro por Ness et al. (1993). Assim, as linhagens de leveduras descritas na Tabela 2 (ver Material e Métodos) foram identificadas, comparadas e discriminadas através deste método utilizando três *primers* em duas combinações diferentes: delta2/delta12 (Fig. 27) e delta12/delta21 (Fig. 28). Diferentes padrões polimórficos constituíram o perfil eletroforético de cada linhagem de acordo com a combinação de par de *primers* usado (Fig. 27 e 28). Ambas as combinações amplificaram elevado número de fragmentos. Segundo Xufre et al. (2011) os pares de *primers* delta2/delta12 foi a combinação que gerou maior número de fragmentos para as linhagens testadas. Legras e Karst (2003) também obtiveram maior número

de fragmentos da levedura de laboratório S288C usando as combinações delta2/delta12 e delta12/delta21.

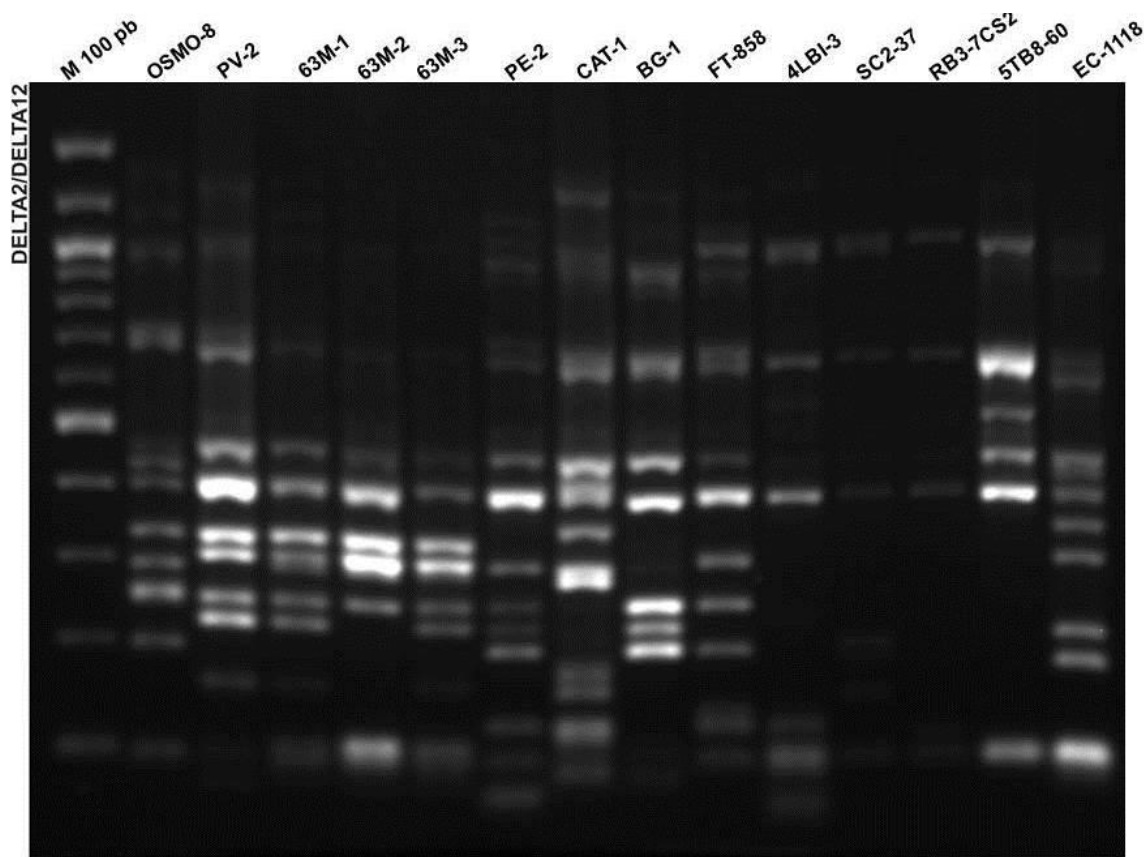


Figura 27. Perfis eletroforéticos de linhagens *S. cerevisiae* obtidos através de amplificação por PCR da análise interdelta com par de *primers* delta2/delta12 em gel de agarose 1,2 % (m/v).

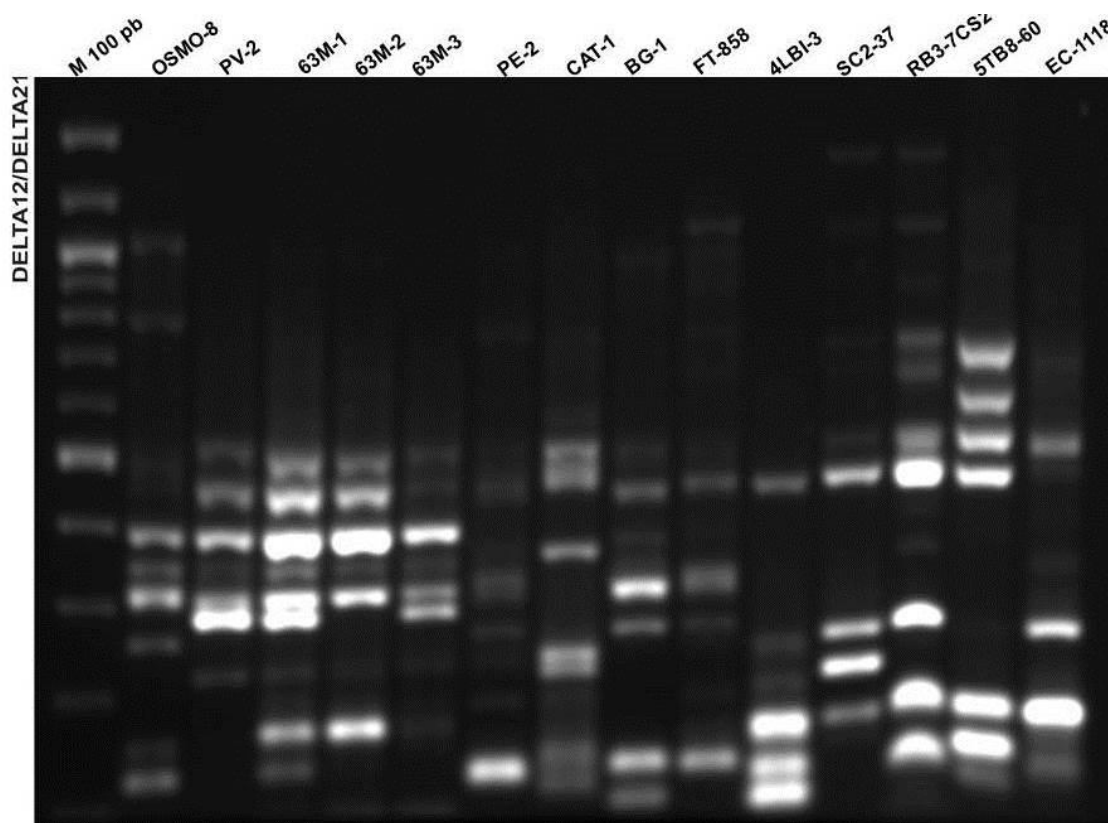


Figura 28. Perfis eletroforéticos de linhagens *S. cerevisiae* obtidos através de amplificação por PCR da análise interdelta com par de *primers* delta12/delta21 em gel de agarose 1,2 % (m/v).

A Fig. 29 ilustra um dendrograma construído com os resultados dos fragmentos obtidos pelo método PCR-interdelta com as diferentes combinações de pares de *primers* (delta2/delta12, delta12/delta21 e delta2/delta21). O dendrograma (Fig. 30) reuniu as 14 linhagens de leveduras em três grupos principais (A, B e C). O grupo A pertencentes às linhagens de leveduras da coleção de cultura do nosso laboratório (OSMO-8; PV-2; 63M-1; 63M-2 e 63M-3). As leveduras OSMO-8 e PV-2 (SOUZA et al., 2007) são os parentais que deram origem a levedura 63M-1. A levedura 63M-2 foi uma linhagem isolada por meio de plaqueamentos da levedura 63M-1 em meios cromogênicos. A linhagem 63M-1 possui em seus segregantes marca de auxotrofia apresentando deficiência heterozigota nos aminoácidos uracila e lisina. Após estocagem (freezer a - 80 °C) foi observado a ocorrência de leveduras auxotróficas, detectadas através de plaqueamentos nos meios cromogênicos. Esta levedura auxotrófica foi denominada de 63M-2 e a sua deficiência no metabolismo de lisina foi identificada pela técnica da análise de esporos ao acaso (dados não mostrados). Já a levedura 63M-3, é um isolado revertente (*LYS*⁺) obtido através de

propagações da levedura 63M-2. O grupo B é um *cluster* de leveduras comerciais (PE-2, CAT-2, BG-1 e FT-858) utilizadas como inóculo *starter* nas destilarias brasileiras de produção de bioetanol. Por fim, o grupo C agrupou as leveduras provenientes da Itália destinadas à produção de vinho. De acordo com os resultados do dendograma, a combinação dos fragmentos da análise interdelta detectou 13 diferentes biótipos dentre as 14 linhagens *S. cerevisiae* analisadas.

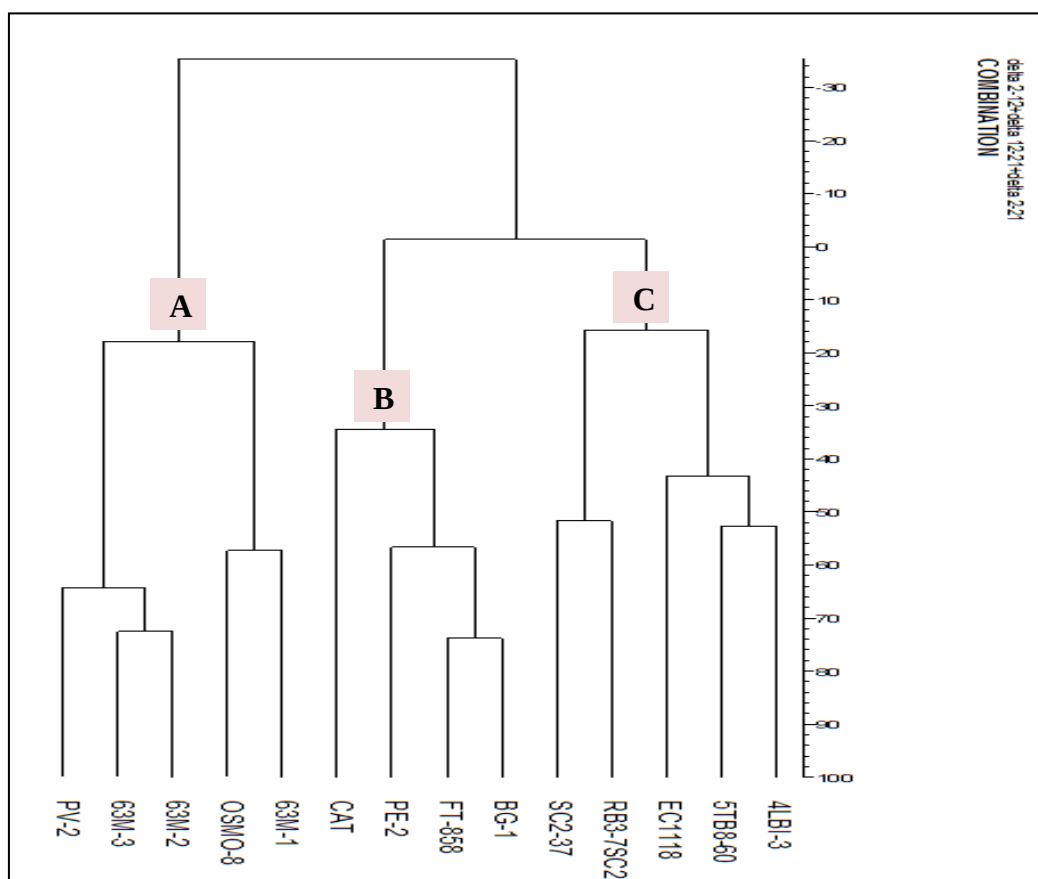


Figura 29. Dendograma da Análise Cluster Combinada dos resultados obtidos da amplificação da região interdelta (pares de *primers* d2/d12, d12/d21 e d2/d21) das linhagens de *S. cerevisiae* provenientes de diferentes países e destinadas a diferentes processos fermentativos.

4.5. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DURANTE FERMENTAÇÃO EM MOSTO NATURAL DE UVA VERMELHA UTILIZANDO INÓCULO PURO: PRODUÇÃO DE CO₂, °BRIX E COMPOSTOS VOLÁTEIS

A vinificação é um processo complexo envolvendo interações entre a flora microbiana e o suco de uva resultando em vinho (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). Os micro-organismos chave são as leveduras fermentadoras que transformam um mosto de uva ácido, doce e pouco saboroso em uma bebida alcoólica altamente saborosa (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). Por isso, para realizar a fermentação de vinho utilizando linhagens indígenas, foi necessário fazer um *screening* (seção 4.4.) dos aspectos tecnológicos relevantes para produção de um vinho de qualidade. Todas as linhagens indígenas e nativas apresentaram resultados de perfil tecnológico aceitável. Com isso, as leveduras foram inoculadas em mosto de uva e os parâmetros utilizados para o monitoramento do curso fermentativo foram: produção de CO₂, consumo de açúcares e a produção de compostos voláteis. O termo linhagens indígenas neste contexto está denominando as leveduras destinadas a produção de etanol de origem brasileira.

4.5.1. Monitoramento da fermentação de mosto natural de uva vermelha utilizando inóculo puro: produção de CO₂

A Tab. 6 mostra os valores obtidos quanto à produção de CO₂ durante a fermentação de vinho. A maioria das leveduras iniciou a fermentação após 24 horas de incubação (fase de adaptação). As leveduras que iniciaram a fermentação mais lentamente, ou seja, aquelas que apresentaram maior fase de adaptação e/ou fase *lag* foram linhagens indígenas: 63M-3 ($1,84 \pm 0,55$ g/100 mL de CO₂), CAT-1 ($1,40 \pm 0,64$ g/100 mL de CO₂) e BG-1 ($1,38 \pm 0,09$ g/100 mL de CO₂) e a linhagem de laboratório para produção de vinho SC₂-37 ($1,88 \pm 0,04$ g/100 mL de CO₂). Estas linhagens também foram sensíveis ao dióxido de enxofre (ver Tab. 5), exceto a levedura 63M-3. Apesar da maior fase *lag* que estas leveduras iniciaram o processo, foi possível observar que no final do 5º dia de fermentação o processo foi estabilizado, onde todas as leveduras tiveram produção de CO₂ semelhantes. Segundo Nerantzis et al. (2007), o dióxido de carbono está diretamente associado com o crescimento celular das leveduras. O curso fermentativo foi monitorado

diariamente e o processo foi completado em 14 dias de fermentação, onde os pesos dos frascos mantiveram constantes (produção > 0,3 g/100mL de CO₂).

Tabela 6 . Produção de dióxido de carbono durante a fermentação de mosto natural de uva vermelha contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.

Leveduras	Produção de CO ₂ (g/100mL)										
	Fermentação (dias)										
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	13	14
OSMO-8	2,91±0,03	5,94±0,03	8,35±0,07	10,04±0,10	12,00±0,05	12,63±0,11	13,06±0,15	13,50±0,12	13,81±0,14	14,50±0,07	14,74±0,09
PV-2	2,37±0,01	4,61±0,04	6,71±0,11	8,82±0,11	11,51±0,13	12,17±0,28	12,54±0,30	12,87±0,15	13,26±0,29	13,94±0,33	14,16±0,33
63M-1	2,78±0,13	5,52±0,06	8,05±0,00	9,99±0,00	11,65±0,39	12,68±0,46	12,87±0,29	12,62±0,00	13,18±0,23	13,55±0,00	13,68±0,00
63M-2	2,60±0,01	5,30±0,06	7,97±0,11	10,10±0,14	12,56±0,44	13,19±0,57	13,57±0,63	14,04±0,71	14,36±0,72	15,07±0,75	15,29±0,76
63M-3	1,84±0,55	4,92±0,91	7,82±0,88	10,05±0,62	12,01±0,43	12,52±0,52	12,88±0,58	13,29±0,67	13,58±0,75	14,29±0,89	14,51±0,93
PE-2	2,45±0,08	5,10±0,12	7,45±0,16	9,29±0,13	10,90±0,05	11,35±0,05	11,65±0,06	12,09±0,06	12,34±0,05	12,96±0,03	13,16±0,02
CAT-1	1,40±0,64	3,99±1,06	6,47±1,34	8,59±1,43	11,62±1,15	12,66±0,62	13,37±0,17	14,00±0,04	14,38±0,11	15,13±0,12	15,38±0,13
BG-1	1,38±0,09	3,88±0,05	6,37±0,07	8,52±0,16	11,53±0,23	12,35±0,31	12,75±0,35	13,15±0,37	13,43±0,38	14,12±0,42	14,12±0,42
FT858	2,22±0,04	4,74±0,12	7,04±0,14	8,97±0,14	11,08±0,18	11,65±0,17	12,01±0,18	12,41±0,14	12,71±0,14	13,38±0,16	13,62±0,19
4LBI-3	2,84±0,11	6,02±0,15	8,71±0,15	10,74±0,11	12,82±0,18	13,42±0,25	13,82±0,28	14,29±0,31	14,60±0,31	15,30±0,30	15,55±0,32
EC1118	2,25±0,04	4,81±0,06	7,21±0,07	9,45±0,08	12,00±0,24	12,48±0,23	12,82±0,25	13,21±0,24	13,47±0,25	14,12±0,25	14,28±0,17
5TB8-60	2,72±0,12	5,55±0,22	8,11±0,29	10,03±0,31	11,46±0,18	11,94±0,25	12,28±0,32	12,68±0,38	12,95±0,41	13,65±0,54	13,89±0,56
SC2-37	1,88±0,04	4,03±0,00	5,90±0,02	7,56±0,03	10,12±0,00	11,27±0,04	12,19±0,09	13,05±0,11	13,62±0,15	14,52±0,18	14,79±0,22
RB3-7SC2	2,04±0,29	4,17±0,61	6,17±0,89	8,00±1,04	10,72±0,95	11,73±0,69	12,38±0,37	12,97±0,21	13,32±0,15	14,55±0,52	14,78±0,53

4.5.2. Monitoramento da fermentação de mosto natural de uva vermelha utilizando inóculo puro: °Brix

Durante as fermentações de vinho do presente estudo, os açúcares totais foram determinados através de um refratômetro, equipamento que afere o grau de sólidos totais dissolvidos suspensos em uma amostra, ou seja, o grau Brix (°Bx). Esta técnica é frequentemente utilizada por ser uma análise simples que estima de forma instantânea a concentração de açúcares presente em mostos de uva. Estas medidas tem papel importante no monitoramento do processo fermentativo, pois indica a velocidade da fermentação, a duração e o seu término. A Tab. 7 mostra os valores em °Bx obtidos durante a fermentação das diferentes leveduras. Foi possível observar que algumas das leveduras produtoras de etanol combustível (63M-1, PE-2 e FT858) apresentaram um consumo mais acelerado de açúcar quando comparadas com leveduras produtoras de vinho após 24 horas de fermentação. No Brasil, as fermentações de caldo de cana e melaço tem um período de 6-11 h (BASSO et al., 2008), e isto pode ser um dos fatores associados as linhagens destinadas a produção de etanol terem um consumo de açúcar maior quando comparadas as outras linhagens. A linhagem nativa 5TB8-60 também apresentou consumo de açúcares equivalente aos das leveduras produtoras de etanol combustível.

Tabela 7. Medidas dos sólidos totais dissolvidos durante a fermentação do mosto natural de uva vermelha contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.

Leveduras	Grau Brix (g/100mL)					
	Fermentação (dias)					
	1	3	6	8	10	13
OSMO-8	18.90±1.30	12.65±0.90	7.75±1.00	7.40±0.85	6.60±0.00	6.70±0.98
PV-2	17.90±0.10	13.15±0.40	7.20±0.14	7.15±0.07	7.10±0.14	6.80±0.28
63M-1	16.80±0.00	10.20±0.00	6.50±0,00	6.20±0.00	6.20±0.00	6.00±0,00
63M-2	19.00±1.10	13.65±0.90	7.00±0.70	6.80±0.14	6.60±0.57	6.60±0.42
63M-2	19.00±1.10	12.25±1.10	7.00±0.14	6.80±0.00	6.60±0.57	6.50±0.28
PE-2	17.35±0.50	10.70±0.40	6.35±0.21	6.30±0.35	6.20±0.00	6.00±0.14
CAT-1	21.00±1.40	15.30±2.10	9.15±2.33	7.60±1.06	7.00±0.57	6.05±0.14
BG-1	19.60±0.80	14.15±0.50	7.25±0.35	7.00±0.42	6.40±0.00	6.00±0.14
FT858	17.35±0.50	12.35±0.50	6.40±0.14	6.00±0.14	5.80±0.14	5.60±0,00
4LBI-3	19.65±0.20	12.80±0.00	7.80±0.70	7.20±0.35	7.00±0.00	7.00±0.00
EC1118	18.65±0.50	130±0.00	7.00±0.07	6.50±0.35	6.30±0.14	7.00±0,00
5TB8-60	17.05±0.40	10.60±0.60	6.80±0.07	6.70±0.14	6.40±0.00	6.00±0.42
SC2-37	20.90±0.80	16.40±0.60	10.50±0.00	8.10±0.35	7.80±0.14	7.30±0.14
RB3-7SC2	19.40±0.60	14.95±1.30	8.75±1.76	7.00±1.06	6.80±0.14	6.40±0,00

O sabor do vinho é uma percepção sensorial que varia com o indivíduo, com o contexto e experiência do consumidor e a composição química do produto (FLEET, 2003). Os micro-organismos desempenham papel proeminente na composição química do vinho. Eles afetam a qualidade da uva antes da colheita, e durante a fermentação os açúcares são metabolizados convertendo-se em outros componentes, como o etanol, o dióxido de carbono e vários produtos secundários, que coletivamente conferem a sutileza e as características individuais dos vinhos (PRETORIUS, 2000). A Tab. 8 mostra os valores obtidos no final da fermentação do vinho quanto à produção de compostos voláteis onde todas as leveduras tiveram produção semelhante. O ácido acético foi o composto que levou a maiores diferenças entre as leveduras, porém todas as linhagens produziram valores abaixo do permitido (600 mg/L) para vinhos em geral (ROMANO et al., 1990). Quanto à produção de etanol, as leveduras CAT-1, BG-1 e SC2-37 foram às linhagens que mais produziram etanol quando comparadas com as outras leveduras. Os valores obtidos indicam boa produção de etanol pelas leveduras, pois o controle comercial utilizado no presente estudo (EC1118) teve valores equivalentes aos das outras linhagens de levedura.

Tabela 8. Produção de compostos voláteis após a fermentação (14 dias) do mosto natural de uva vermelha contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.

Leveduras	Produção de compostos voláteis							
	Acetaldeído (mg/L)	Metanol (mg/L)	N-propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Ácido Acético (mg/L)	D-amílico (mg/L)	Isoamílico (mg/L)	Etanol (g/L)
OSMO-8	34,35±1,19	40,15±0,36	18,09±0,36	38,59±2,08	188,93±14,18	107,40±1,76	298,30±12,47	75,70±0,00
PV-2	50,55±7,84	42,42±0,70	21,33±0,73	36,47±0,73	208,09±15,36	122,33±2,25	256,99±4,61	70,30±0,72
63M-1	59,10±3,66	38,11±2,06	17,47±1,03	43,56±3,00	313,57±21,37	112,08±7,23	259,42±21,01	66,00±0,75
63M-2	48,44±2,06	46,11±4,27	21,17±2,27	44,72±5,92	315,15±69,71	120,48±5,38	289,11±22,78	88,20±1,66
63M-3	55,69±5,81	41,13±0,71	22,44±0,39	58,09±1,05	344,79±19,23	104,88±5,67	276,41±25,25	69,80±0,30
PE-2	34,98±16,40	39,53±6,03	16,28±2,73	37,79±7,39	220,41±41,80	92,75±13,95	216,10±43,84	88,00±0,88
CAT-1	49,86±7,93	49,68±1,76	23,18±0,18	73,27±4,69	427,66±7,95	111,49±11,89	300,28±15,15	108,20±0,62
BG-1	62,98±0,50	46,43±0,83	21,02±0,35	49,41±1,74	326,81±16,59	94,58±4,33	204,04±9,48	101,00±0,27
FT858	48,14±4,84	44,45±0,59	18,70±0,98	27,42±2,32	256,99±0,54	94,97±4,55	174,14±7,00	93,40±0,07
4LBI-3	43,87±0,98	46,64±1,99	18,06±0,72	38,22±0,63	188,54±26,75	127,20±12,03	253,20±12,45	77,70±0,72
EC1118	73,91±13,73	42,45±0,46	20,96±0,62	22,24±0,15	177,64±17,16	91,52±2,02	139,39±1,96	71,40±0,09
5TB8-60	40,69±2,80	39,89±0,23	15,86±0,17	28,94±0,38	153,98±0,95	87,07±0,85	176,00±1,65	73,90±0,09
SC2-37	26,39±1,77	47,24±0,44	31,09±0,96	73,95±2,19	267,21±21,10	111,42±2,11	241,00±9,53	103,50±1,22
RB3-7SC2	36,00±8,57	44,68±4,64	19,13±3,01	30,94±6,98	164,44±13,21	98,48±15,59	160,69±29,44	82,30±0,85

4.6. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DURANTE FERMENTAÇÃO EM MOSTO NATURAL DE UVA VERMELHA UTILIZANDO INÓCULO MISTO: INTERAÇÕES ENTRE LEVEDURAS INDÍGENAS E NATIVAS

A utilização de linhagens isoladas de *S. cerevisiae* nos dias de hoje é uma prática comum. Três leveduras foram selecionadas para as fermentações mistas sendo 63M-1 (linhagem de laboratório isolada para produção de etanol); PE-2 (linhagem comercial para produção de etanol) e 4LBI-3 (linhagem de laboratório isolada de fermentação de vinho). As fermentações foram conduzidas com combinações diferentes das leveduras. As análises descritas na seção 4.5 também foram realizadas nesta seção e plaqueamentos no final de cada fermentação mista foi realizado nos meios cromogênicos para detectar a proporção das leveduras na fermentação mista. A análise interdelta feita diretamente das colônias crescidas nos meios cromogênicos foi realizada a fim de correlacionar e identificar os fenótipos (cor das colônias) com os perfis polimórficos.

4.6.1. Fermentações do mosto de uva utilizando inóculo misto: interações entre leveduras destinadas a produção de bioetanol (63M-1 e PE-2) e de vinho (4LBI-3)

O critério para seleção e desenvolvimento de leveduras para fermentação de vinho podem ser considerados em três categorias: 1. Propriedades que afetam o desempenho do processo fermentativo; 2. Propriedades que determinam a característica e qualidade do vinho e; 3. Propriedades associadas com a produção comercial de leveduras de vinho (FLEET, 2008). Nas fermentações mistas três linhagens foram utilizadas com as seguintes combinações: 63M-1:PE-2; 63M-1:4LBI-3; PE-2:4LBI-3 e 63M-1:PE-2:4LBI-3, todas inoculadas com a mesma proporção. A Fig. 30 (parte A) ilustra a produção de CO₂ (g/100mL) e (parte B) as medidas de sólidos totais dissolvidos (°Bx) pela cultura mista e pela cultura pura de cada levedura. Quanto à produção de CO₂, a levedura 4LBI-3 isoladamente foi a que obteve maior produção partir do 4º dia de fermentação. Foi observado efeito sinérgico para a levedura PE-2 quando inoculada na cultura mista entre 63M-1:PE-2 e PE-2:4LBI-3, onde a produção de CO₂ de 13,16 ± 0,02 pela cultura pura foi aumentada para 14,54 ± 0,19 e de 14,63 ± 0,80 (g/100mL) respectivamente. No

entanto, efeito antagônico foi observado em todas as combinações de cultura mista para a levedura de vinho 4LBI-3, havendo um decréscimo na produção de CO₂. Quanto as medidas de °Brix, não foi observado efeitos sinérgico ou antagônico pelas culturas puras e mistas.

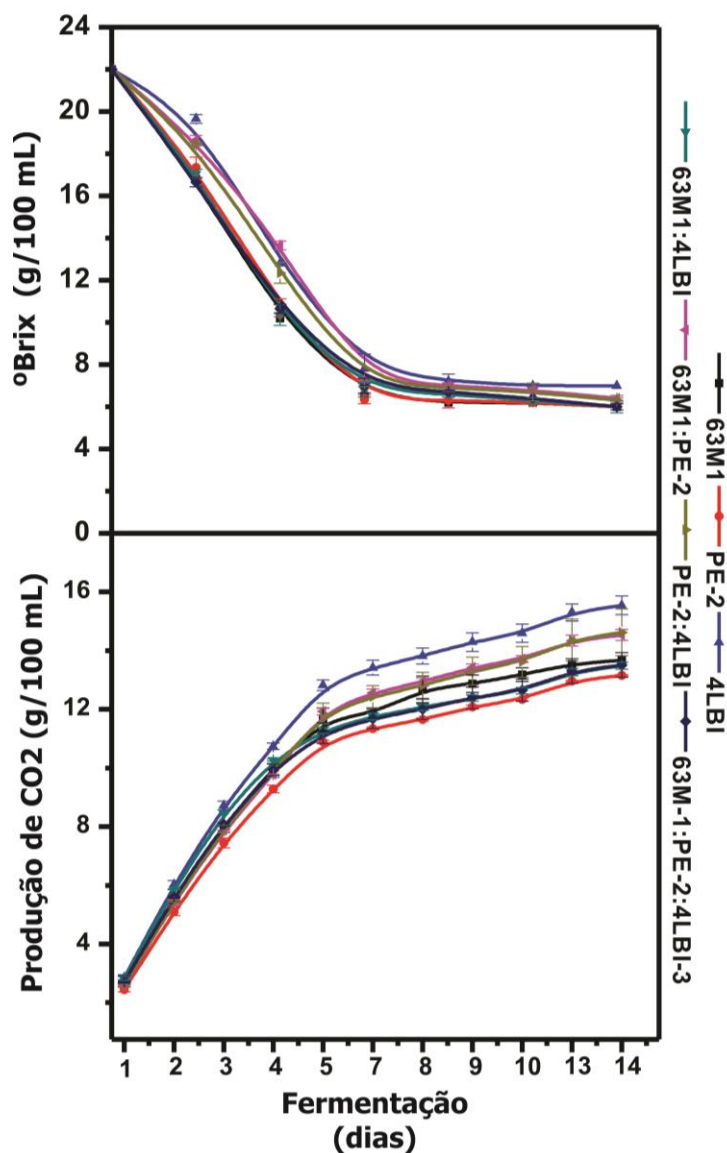


Figura 30. Produção de CO₂ e medidas dos sólidos totais dissolvidos (°Brix) durante a fermentação de vinho utilizando inóculo puro e misto (proporção 1:1) das leveduras: 63M-1, PE-2 e 4LBI-3. Fermentação contendo concentração inicial de 22,2 °Brix, 1×10^7 céls/mL, pH 3,8. A fermentação foi realizada durante 14 dias a 26 °C.

Subprodutos relacionados à qualidade organoléptica em vinhos foram determinados no final da fermentação. A Tab. 9 mostra a produção dos compostos voláteis produzidos pelas leveduras na fermentação simples e na fermentação mista. Foi possível verificar que não houve diferença na produção na maioria dos compostos voláteis (comparar fermentação simples com fermentação mista) nas diferentes combinações de inóculo utilizada nas fermentações mistas. O ácido acético foi o composto que apresentou diminuição na produção quando a fermentação foi realizada em consórcio com a levedura 4LBI-3. A produção de álcool foi o composto que apresentou maior efeito quando a levedura 4LBI-3 foi inoculada com a levedura comercial PE-2, onde tiveram produção de etanol de $92,90 \pm 0,53$ g/L enquanto que isoladamente a levedura 4LBI-3 teve produção de $77,70 \pm 0,72$ g/L.

Tabela 9. Produção de compostos voláteis obtidos no final de fermentação de mosto natural de uva vermelha utilizando inóculo misto (proporção 1:1) contendo 22,2 °Brix, concentração celular de 1×10^7 céls/mL, pH inicial 3,8 a 26 °C.

Leveduras	Produção de compostos voláteis							
	Acetaldeído (mg/L)	Metanol (mg/L)	N-propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Ácido Acético (mg/L)	D-amílico (mg/L)	Isoamílico (mg/L)	Etanol (g/L)
63M-1	59,10±3,66	38,11±2,06	17,47±1,03	43,56±3,00	313,57±21,37	112,08±7,23	259,42±21,01	66,00±0,75
PE-2	34,98±16,40	39,53±6,03	16,28±2,73	37,79±7,39	220,41±41,80	92,75±13,95	216,10±43,84	88,00±0,88
4LBI-3	43,87±0,98	46,64±1,99	18,06±0,72	38,22±0,63	188,54±26,75	127,20±12,03	253,20±12,45	77,70±0,72
Mista 1	75,79±21,79	41,03±1,15	17,56±0,38	38,34±2,29	247,47±83,47	120,86±5,56	248,79±12,41	77,20±0,55
Mista 2	35,68±0,23	43,61±0,27	17,23±0,39	41,26±2,16	198,89±19,38	100,01±1,24	241,83±6,62	89,40±0,40
Mista 3	57,65±2,25	41,56±1,25	17,01±0,64	35,25±1,49	215,02±1,25	108,11±4,43	224,47±11,97	92,90±0,53
Mista 4	66,28±4,40	42,82±2,93	19,35±1,69	43,78±4,00	157,12±18,76	114,80±7,65	269,82±23,19	86,90±0,42

Mista 1: fermentação entre 63M1:4LBI-3; **Mista 2:** fermentação entre 63M-1:PE-2; **Mista 3:** fermentação entre PE-2:4LBI-3; e **Mista 4:** fermentação entre 63M-1:PE-2:4LBI-3. As células foram inoculadas na mesma proporção no frasco de fermentação.

4.6.2. Monitoramento da fermentação de vinho utilizando inóculo misto: análise interdelta *versus* plaqueamentos

Como já mencionado, no presente trabalho dois meios de cultura foram elaborados e selecionados. Estes meios permitiram controlar instabilidade em processos fermentativos e quantificar a proporção de leveduras durante o mesmo. Tais meios (N1 e BTV) foram utilizados tanto nas fermentações com inóculo puro (dados não mostrados) quanto nas fermentações mistas. As Figuras. 31, 32, 33 e 34 ilustram os plaqueamentos das fermentações mistas utilizando 2 e 3 linhagens *starters*. Na Fig. 31, o meio BTV não foi um meio seletivo para diferenciar as colônias entre as leveduras 63M-1 e 4LBI-3, ao passo que o meio N1 e o meio WLN demonstraram diferenças entre as colônias. Na Fig. 32 foi possível distinguir as leveduras 63M-1 da levedura PE-2 nos meios N1 e BTV. Na Fig. 33 também foi possível visualizar boa distinção entre as leveduras PE-2 e 4LBI-3 nos meios N1 e BTV, e na Fig. 34 o melhor meio para diferenciar a fermentação mista inoculada com três leveduras *starters* (63M-1:4LBI-3:PE-2) foi o meio N1.

O uso dos meios desenvolvidos N1 e BTV teve aplicabilidade e reprodutibilidade em diferentes processos fermentativos (fermentação a partir de melaço e mosto de vinho). No entanto, o meio N1 foi o que melhor diferenciou as colônias entre as diferentes leveduras plaqueadas, sendo este meio mais seletivo para processos de fermentação de vinho. Mais uma vez o uso da análise da sequência interdelta utilizando par de *primers* delta2/delta12, revelou a eficiência do uso destes meios onde o DNA extraído diretamente das colônias plaqueadas nos meios sólidos teve como produto amplificado o perfil eletroforético das leveduras utilizadas como *starters*, ou seja, esta técnica confirmou o uso dos meios N1 e BTV no monitoramento da população de leveduras em diferentes processos fermentativos.

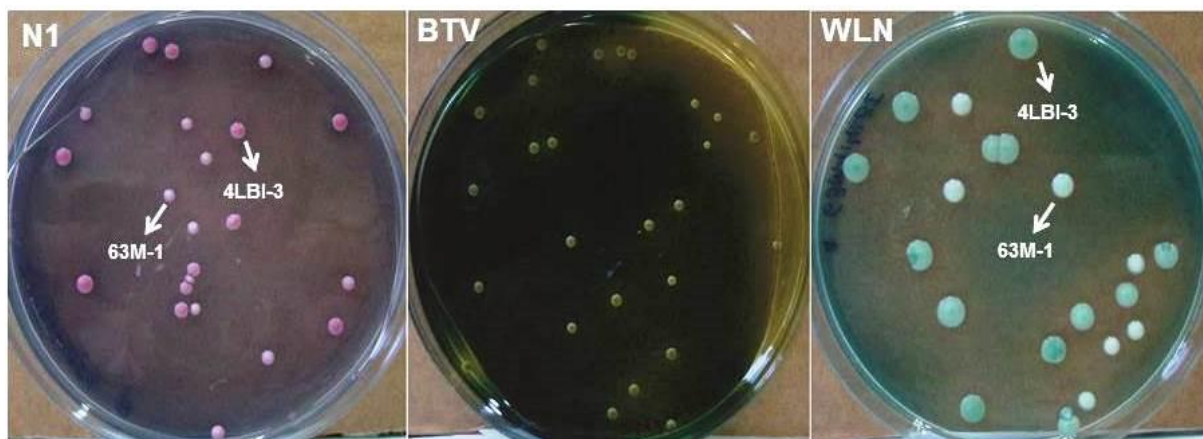


Figura 31. Plaqueamento da cultura mista 63M-1:4LBI-3 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

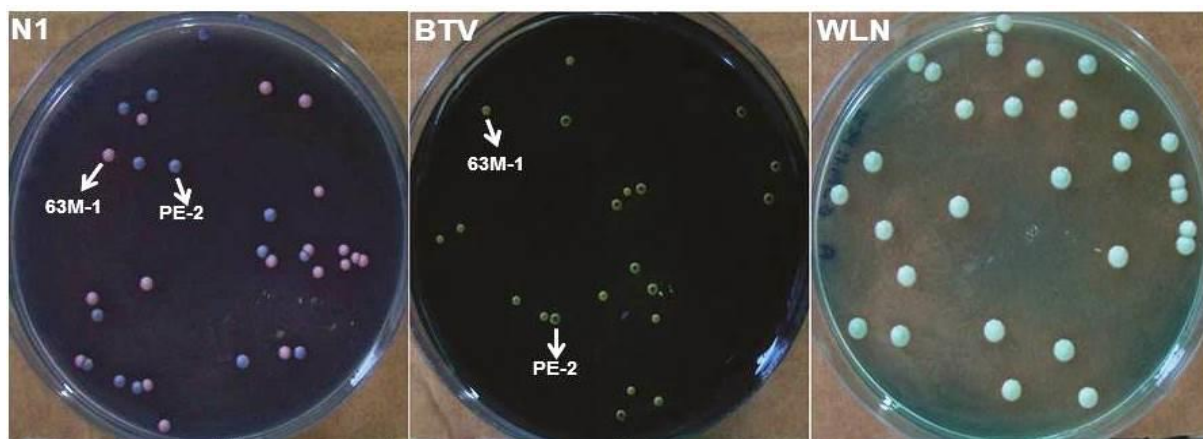


Figura 32. Plaqueamento da cultura mista 63M-1:PE-2 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

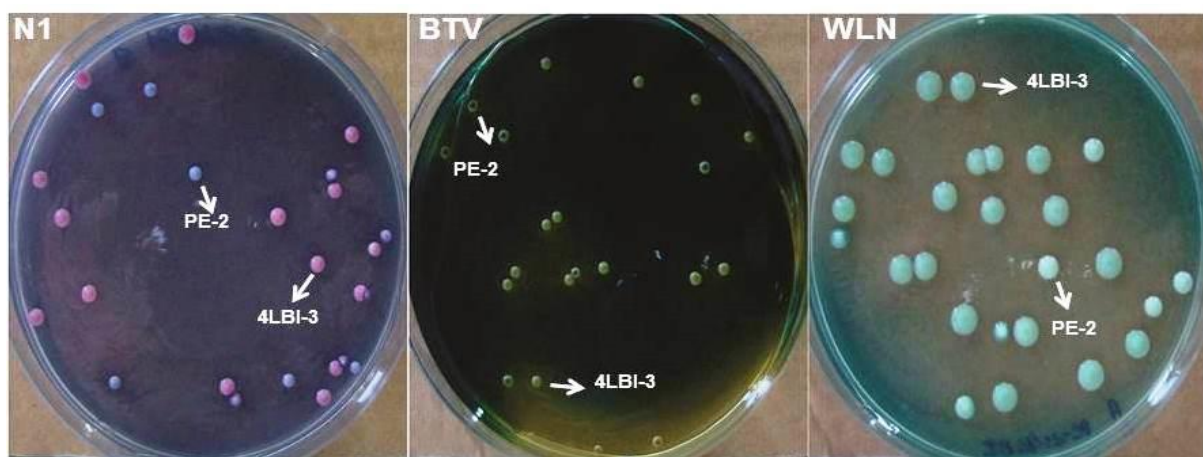


Figura 33. Plaqueamento da cultura mista PE-2:4LBI-3 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

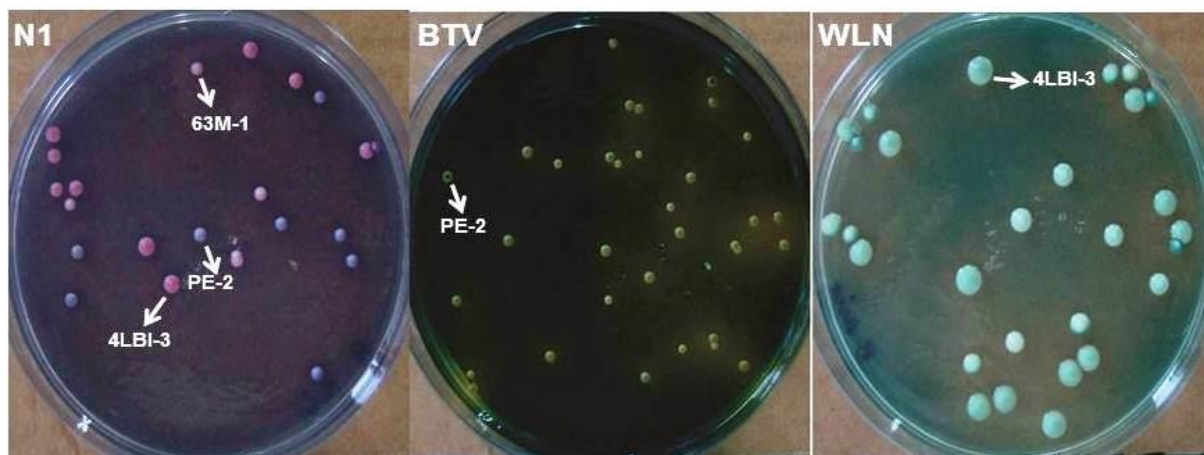


Figura 34. Plaqueamento da cultura mista 63M-1:PE-2:4LBI-3 nos meios sólidos diferenciais N1, BTV e WLN após a fermentação em mosto de uva. Placas incubadas durante 5 dias a 26 °C.

Conclusões

Conclusões

Alternativas simples de monitoramento de leveduras em processos fermentativos foi o principal alvo de pesquisa deste trabalho. A partir disso foram concluídos os seguintes tópicos:

- a) O *screening* de corantes utilizado como via de identificação preliminar de instabilidade fenotípica de leveduras em processos fermentativos revelou que os corantes floxina B e eosina e azul de tripano foram os mais discriminatórios permitindo identificar e diferenciar linhagens de leveduras auxotróficas e prototróficas bem como deficientes respiratórios;
- b) O esgotamento de fontes de nitrogênio identificou diferentes capacidades de esporulação entre as leveduras. As linhagens mais estáveis apresentaram alta eficiência na esporulação após dois dias de incubação;
- c) Nos ciclos sucessivos de fermentação de melaço de cana-de-açúcar a 40 °C utilizando inóculo simples à levedura 63M-1 foi a que teve maior produção de etanol e manutenção da viabilidade; a levedura 63M-2 foi a mais sensível e instável do processo; a levedura 63M-3 obteve o maior acúmulo de biomassa para reutilização de células. A menor produção de etanol foi obtida com a levedura PE-2;
- d) Nas fermentações sucessivas mistas a 40 °C, o consórcio entre as leveduras 63M-3 e PE-2 resultou em efeito sinérgico quanto à produção de etanol. A utilização da linhagem que obteve maior acúmulo de biomassa nas fermentações simples não resultou em levedura dominante no processo e sim em linhagem persistente;
- e) O uso de linhagens indígenas (destinadas à produção de bioetanol) na fermentação de mosto natural de uva resultou em leveduras de perfil tecnológico desejável para este setor fermentativo, onde não foram constatadas diferenças nos parâmetros fermentativos entre leveduras indígenas e nativas;

- f) O desenvolvimento e padronização dos meios sólidos N1 e BTV permitiram monitorar a proporção de leveduras bem como a estabilidade fenotípica de forma simples e eficaz. Na fermentação de melaço de cana-de-açúcar, os dois meios permitiram controlar a fermentação, no entanto, na fermentação de vinho o meio N1 mostrou-se mais discriminatório no monitoramento de fermentações mistas.

Por fim, o estabelecimento e elucidação da nova estratégia de monitoramento de leveduras em processos fermentativos reduziu o uso corrente das análises moleculares de identificação na presente pesquisa. Uma vez padronizado os inóculos *starters* (leveduras com colônias de coloração diferente) a técnica apresentou aplicabilidade e reprodutibilidade. Outro aspecto relevante foi quanto à escolha definida de colônias de leveduras para análise molecular de identificação. A facilidade atribuída à nova técnica reduziu o tempo e o custo operacional da pesquisa para determinação da dinâmica populacional. O seu emprego nos diferentes setores fermentativos pode aumentar autonomia nas indústrias, reduzindo o contrato com mão de obra especializada.

Referências

Referências

- ABREU-CAVALHEIRO, M.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, p. 665-671, 2013.
- ALDIGUIER, A. S. et al. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, p. 217-222, 2004.
- ALENCAR, E. M. B. et al. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* culture. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, p. 819-824, 2009.
- AMBERG, D. C.; BURKE, D. J.; STRATHERN, J. N. **Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- AMBRONA, J. et al. Rhodamine-pink as a genetic marker for yeast populations in wine fermentation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2977-2984, 2006.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol - what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? In: BERNARDES, M. A. S. (Ed). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Chap. 4, p. 67- 84.
- ARGUESO, J. L. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Res.**, v. 19, p. 2258-2270, 2009.
- ARGUESSO, J. L. et al. Perspective: indigenous sugarcane yeast strains as ideal biological platforms for the delivery of next generation biorefining technologies. **Int. Sugar J.**, v. 112, p. 86-89, 2010.
- BANDAS, E. L.; ZAKHAROV, I. A. Induction of *rho*⁻ mutations in yeasts *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. **Mutat. Res.**, v. 71, p. 193-199, 1980.
- BARRAJÓN, N. et al. Competition between spontaneous and commercial yeasts in winemaking: study of possible factors involved. **Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.**, v. 2, p. 1035-1041, 2010.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Chap. 5, p. 85-100.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4th ed. Berlin: Springer- Verlag Heidelberg, 2009.

CAPECE, A. et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area”. **Food Microbiol.**, v. 31, p. 159-166, 2012.

CAPECE, A. et al. Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional “Kakhetian” method. **Food Microbiol.**, v. 36, p. 477-455, 2013.

CARVALHO NETO, O. V. et al. A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. **J. Biotechnol.**, v. 168, p. 701-709, 2013.

CASALONE, E. et al. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. **Res. Microbiol.**, v. 156, p. 191-200, 2005.

CHAMBERS, P. J.; PRETORIUS, I. S. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. **EMBO Rep.**, v. 11, p. 914-920, 2010.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars. **Tropical Plant Biol.**, v. 4, p. 62-68, 2011.

CLEMENTE, T. et al. Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 17, p. 42-49, 2011.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 189, p. 81-87, 2000.

CORADELLO, L. F. C. **Condições de propagação e armazenamento da levedura IQAr/45-1 para a produção de etanol combustível**. 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 979-991, 2013.

DIDERICH, J. A. et al. Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 1587-1593, 2001.

DIVIES, C. Bioreactor technology and wine fermentation. In: FLEET G. H. (Ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Philadelphia: Harwood Academic Publishers, 1993. Chap. 16, p. 449-476.

ERNANDES, J. R. et al. Respiratory deficiency in brewing yeast strains - effects on fermentation, flocculation, and beer flavor components. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 51, p. 16-20, 1993.

FERRARI, S. E. et al. Industrial efficiency of alcohol fermentation: the comparative study. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ALCOHOL FUELS TECHNOLOGY, 4., 1980, Guarujá. **Proceedings...** São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1980. v. 4, p. 139-141.

FIDALGO, M.; BARRALES, R. R.; JIMENEZ, J. Coding repeat instability in the FLO II gene of *Saccharomyces* yeasts. **Yeast**, v. 25, p. 879-889, 2008.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 86, p. 11-22, 2003.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **Fems Yeast Res.**, v. 8, p. 979-995, 2008.

FRANCO DUARTE, R. et al. Genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains by interdelta sequence typing using automated microfluidics. **Electrophoresis**, v. 32, p. 1447-1455, 2011.

FREGONI, M. et al. **Chimica viticolo-enologica**. Con elementi di genetica e genomica della vite. 2ª edizione. Torino: REDA, 2008. 241 p.

GARAY-ARROYO, A.; COVARRUBIAS, A. A. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, p. 879-892, 1999.

GERKE, J. P. et al. Natural isolates of *Saccharomyces cerevisiae* display a complex genetic variation in sporulation efficiency. **Genetics**, v. 174, p. 985-987, 2006.

GODOY, A. et al. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **Int. Sugar J.** v. 110, p. 175-181, 2008.

GRANEK, J. A.; MAGWENE, P. M. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. **PLoS Gen.**, v. 6, 2010. doi: 10.1371/journal.pgen.10008023.

HALL D, W.; JOSEPH, S. B. A high frequency of beneficial mutation across multiple fitness components in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genet. Soc. Am.**, v. 185, p. 1397-1409, 2010.

HERSKOWITS, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v. 52, p. 536-553, 1988.

HEUX, S. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 5822-5828, 2006.

HIERRO, N. et al. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7148-7155, 2006.

JABBAR, A.; AL-SA'ADY, R. Optimization of invertase production from *Saccharomyces cerevisiae* by solid state fermentation. **Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.**, v. 2, p. 373-377, 2014.

JAQUET, L.; JAUNIAUX, J. Yeast functional analysis reports. **Yeast**, v. 15, p. 51-61, 1999.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. London: Elsevier, 2011. v. 1, chap. 3, p. 21-44.

JOHNSTON, J. R.; BACCARI, C.; MORTIMER, R. K. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 583-590, 2000.

KOLODNER, R. D.; PUTNAM, D. C.; MYUNG, K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 297, p. 551-557, 2002.

KRON, S. J. Filamentous growth in budding yeast. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 450-454, 1997.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 37, p. 528-536, 1991.

LANDOLFO, S. et al. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1780, p. 892-898, 2008.

LE JEUNE, C. et al. Evolution of the population of *S. cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. **Food Microbiol.**, v. 23, p. 709-716, 2006.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LEGRAS, J.; KARST, F. optimization of interdelta analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 249-255, 2003.

LODOLO, E. J. et al. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1018-1036, 2008.

LOPANDIC, K. et al. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1063-1075, 2008.

LÓPEZ, V. et al. Simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 68, p. 75-81, 2001.

MADHUSUDAN, P. D.; JOISHY, K. N. Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia Kuyveri* on sensitive yeasts and fungal pathogens. **Indian J. Biotechnol.**, v. 4, p. 290-292, 2005.

MARQUES, M. P. T. **Oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae***: the key role of Isc1p sphingomyelinase in cell resistance, and molecular mechanisms associated to the recovery from hydrogen peroxide stress. 2004. 201 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2004.

MIDDELHOVEN, W. J.; BROEKHUIZEN, B.; EIJK, J. Detection, with the dye phloxine B, of yeast mutants unable to utilize nitrogenous substances as the sole nitrogen source. **J. Bacteriol.**, v. 128, p. 851-852, 1976.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MIURA, S. et al Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 97, p. 19-23, 2004.

MOLINA, A. M. et al. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. **Food Chem.**, v. 117, p. 189-195, 2009.

MORAIS, M. R. **Estudo das interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas**. 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MORTIMER, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. **Gen. Res.**, v. 10, p. 403-409, 2000.

MORTIMER, R. K. et al. Genome renewal - a new phenomenon revealed from a genetic-study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. **Yeast**, v. 10, p. 1543-1552, 1994.

NAGAI, S. Diagnostic color differentiation plates hereditary respiration deficiency in yeast. **J. Bacteriol.**, v. 86, p. 299-302, 1963.

NELSON, D. L.; COX. M. M. Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses fosfato. In: _____. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre; São Paulo: Artmed, 2014. Cap. 14. p. 543-585.

NERANTZIS, E. T. Winemaking process engineering: on line fermentation monitoring - sensors and equipment. **e-JST**, v. 2, p. 29-36, 2007.

NESS, F. et al. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. **J. Sci. Food Agric.**, v. 62, p. 89-94, 1993.

OLIVA NETO, P. et al. The brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Materials and processes for energy**: communicating current research and technological developments. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. p. 371-379. (Energy book series, 1).

ÖSCANZ, S.; JONHSTON, M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. **Mol. Cel. Biol.**, v. 15, p. 1564-1572, 1995.

PALMANN, C. L. et al. Use of WLN medium to profile native flora fermentations. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 52, p. 198-203, 2001.

PEETERS, K.; THEVELEIN, J. M. Glucose sensing and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. In: PISKUR, J.; COMPAGNO, C. (Ed.). **Molecular mechanisms in yeasts carbon source**. New York: Springer, 2014. Chap. 2, p. 21-56.

PELCZAR, M. J.; CHANE, C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1996. v. 1.

PÉREZ, F.; RAMÍREZ, M.; REGODÓN, J. A. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. **Anton. Leeuw.**, v. 79, p. 393-399, 2001.

PLESSET, J.; PALM, C.; McLAUGHLIN, C. S. Induction of heat and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 108, p. 1340-1345, 1982.

POWELL, C. D.; DIACETIS, A. N. Long term serial repitching and the genetic and phenotypic stability of brewer's yeast. **J. Inst. Brew.**, v. 113, p. 67-74, 2007.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeasts for the new millennium: novel approaches to ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, p. 675-729, 2000.

PUIG, S. et al. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2057-2061, 2000.

QUEROL, A. et al. Adaptive evolution of wine yeast. **Inst. J. Food Microbiol.**, v. 86, p. 3-10, 2003.

RAMÍREZ, M. et al. Genetic instability of heterozygous, hybrid, natural wine yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 4686-4691, 2004.

RAO, N. N. et al. Continuous biocatalytic processes. **Org. Proc. Res. Develop.**, v. 13, p. 607-616, 2009.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p. 310-317, 2001.

ROMANO, P. La purezza fermentativa in *Saccharomyces cerevisiae*. **Ind. Bevande**, v. 19, p. 320-321, 1990.

SCHULLER, D. et al. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 231, p. 19-26, 2004.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, G.; FINK, G. R. (Ed.). **Methods enzymology**. New York: Academic Press, 1991. v. 194, p. 21-37.

SHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Anton. Leeuw.**, v. 79, p. 89-96, 2001.

SIA, E. A. et al. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, p. 250-255, 2000.

SOUZA, C. S. et al. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population propagated at increasing temperatures. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 1667-1677, 2007.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M.; BRUCE, I. J. **Yeast genetics**: a manual of methods. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1989.

STEELE, D. F.; JINKS-ROBERTSON, S. An examination of adaptive reversion in *Saccharomyces cerevisiae*. **GSA**, v. 9, p. 9-21, 1992.

TECLU, D. et al. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **J. Hazard. Mater.**, v. 161, p. 1157-1165, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UGLIANO, M.; HENSCHKE, P. A. Yeasts and wine flavor. In: MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. (Ed.). **Wine chemistry and biochemistry**. New York: Springer, 2009. Chap. 8D, p. 313-374.

UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 423-429, 2011.

VALDES, C. Ethanol demand driving the expansion of Brazil's sugar industry. **Econ. Res. Serv.**, p. 31-38, 2007. Special article. Disponível em: <www.ersd.usda.gov/media/579465/ethanoldemandsss246_1_.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2015.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 1998. 362 p.

XUFRE, A. et al. Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 127-132, 2011.

YAMAZAKY, T.; OSHIMA, Y. Direct diploidization and occurrence of polyploidy in *Sacchamoryces ludwigii*. **J. General Microbiol.**, v. 111, p. 271-281, 1979.

ZEYL, C.; DeVISSER, J. A. G. M. Estimates of rates and distribution of fitness effects of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 157, p. 53-61, 2001.

Apêndice

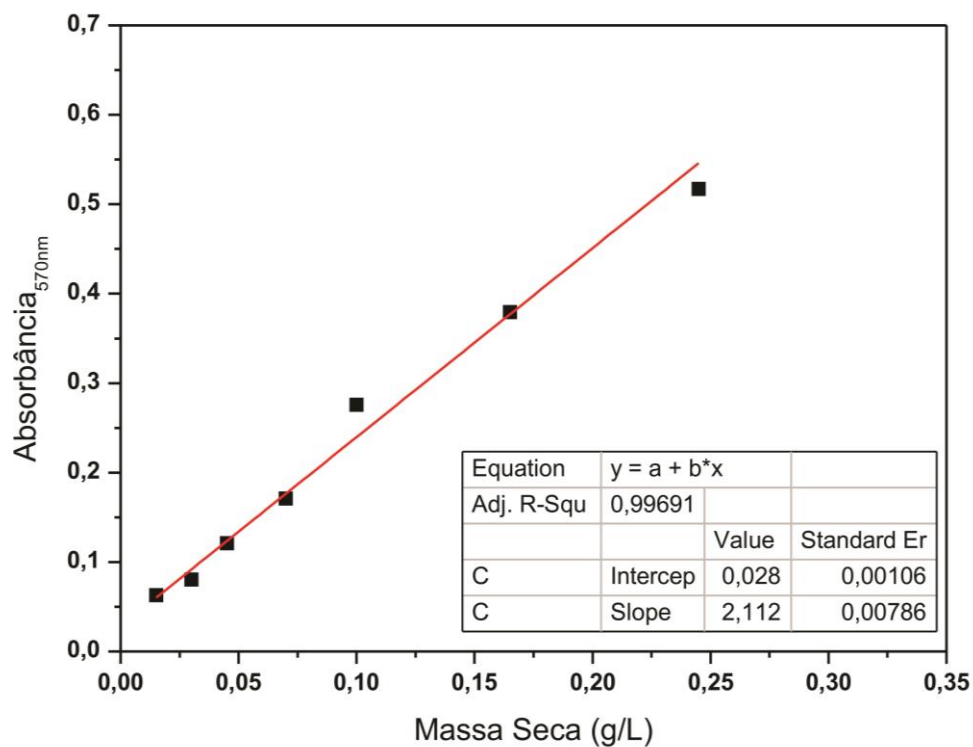


Figura 1. Curva de calibração para análise de medidas de biomassa da levedura 63M-1. A equação da reta $y = a + bx$ apresentou o seguinte coeficiente angular: $b=2,1125$, o intercepto da reta $=0,0284$ e o fator de correlação ($R^2=0,99691$) para o espectrofotômetro Biospectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = a + b \cdot massa$$

$$\frac{Abs - a}{b} = g/L$$

$$g/L = \frac{Abs - 0,0284}{2,1125} \cdot dil$$

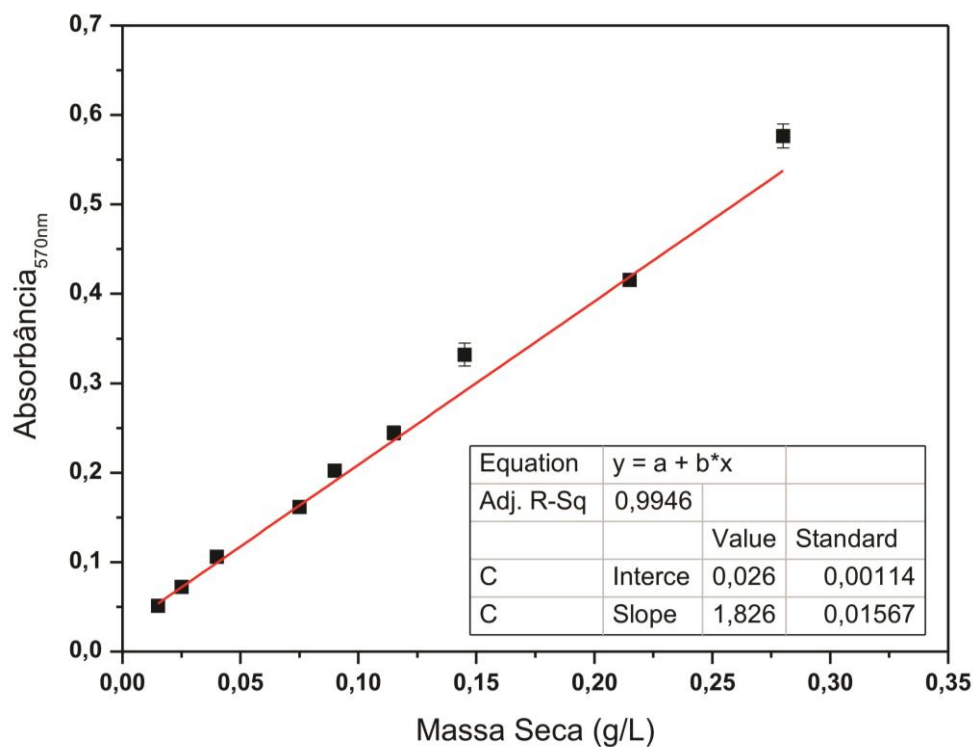


Figura 2. Curva de calibração para análise de medidas de biomassa da levedura 63M-2. A equação da reta $y = a + bx$ apresentou o seguinte coeficiente angular: $b=1,826$, o intercepto da reta= $0,026$ e o fator de correlação ($R^2=0,9946$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = a + b.massa$$

$$\frac{Abs - a}{b} = g/L$$

$$g/L = \frac{Abs - 0,026}{1,826} . dil$$

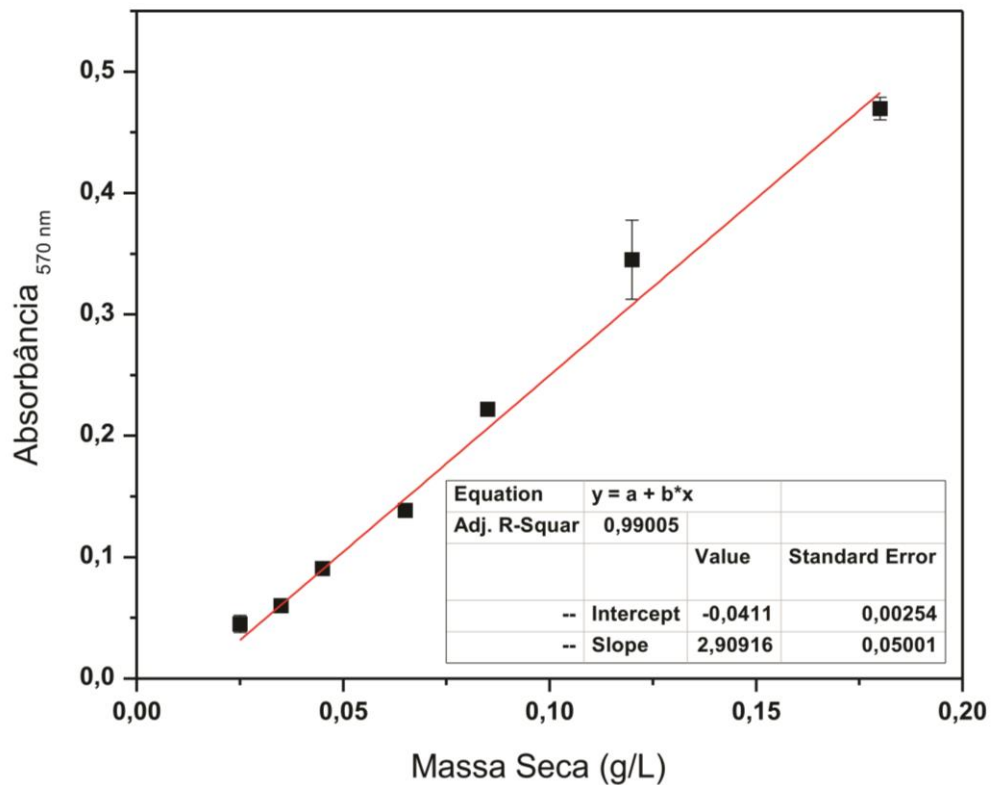


Figura 3. Curva de calibração para análise de medidas de biomassa da levedura 63M-3. A equação da reta $y = a + bx$ apresentou o seguinte coeficiente angular: $b=2,90916$, o intercepto da reta $=-0,0411$ e o fator de correlação ($R^2=0,990$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = a + b \cdot massa$$

$$\frac{Abs - a}{b} = g/L$$

$$g/L = \frac{Abs + 0,04115}{2,90916} \cdot dil$$

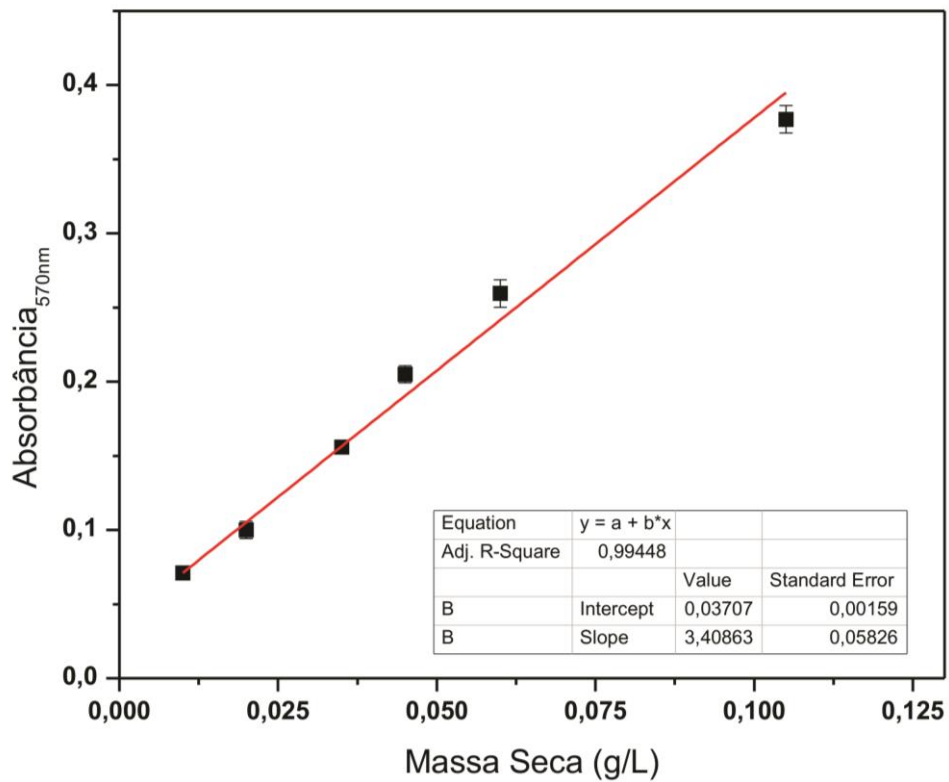


Figura 4. Curva de calibração para análise de medidas de biomassa da levedura PE-2 (industrial). A equação da reta $y = a + bx$ apresentou o seguinte coeficiente angular: $b=3,40863$, o intercepto da reta $=0,03707$ e o fator de correlação ($R^2=0,99448$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = a + b \cdot massa$$

$$\frac{Abs - a}{b} = g/L$$

$$g/L = \frac{Abs - 0,03707}{3,40863} \cdot dil$$

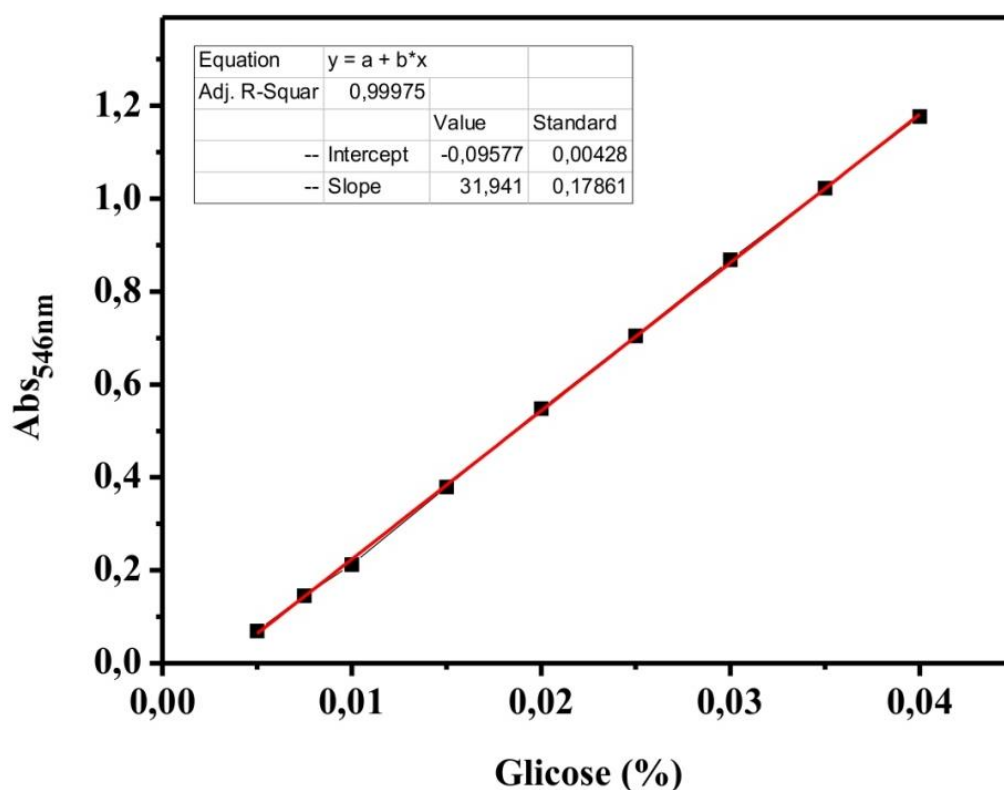


Figura 5. Curva padrão de calibração de glicose 0,2% (m/v) para dosagens de açúcares redutores totais pelo método DNS (MILLER, 1959). A equação da reta $y = a + b \cdot x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=31,941$, intercepto da reta $a=-0,096$ e fator de correlação ($R^2=0,999$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$y = a + bx$$

$$Abs = -0,096 + 31,941 \cdot glic$$

$$\% Glic = \left(\frac{Abs + 0,096}{31,941} \right)$$