

Coleção UAB-UFSCar

Tecnologia Sucroalcooleira

Sandra Regina Ceccato-Antonini

Microbiologia da fermentação alcoólica

A importância do monitoramento
microbiológico em destilarias

Microbiologia da fermentação alcoólica

A importância do monitoramento
microbiológico em destilarias

**Reitor**

Targino de Araújo Filho

Vice-Reitor

Pedro Manoel Galetti Junior

Pró-Reitora de Graduação

Emília Freitas de Lima

**Secretária de Educação a Distância - SEaD**

Aline Maria de Medeiros Rodrigues Reali

Coordenação UAB-UFSCar

Claudia Raimundo Reyes

Daniel Mill

Denise Abreu-e-Lima

Joice Otsuka

Sandra Abib

Valéria Sperduti Lima

**Coordenador do Curso de
Tecnologia Sucroalcooleira**

Miguel Antonio Bueno da Costa

UAB-UFSCar

Universidade Federal de São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235

13565-905 - São Carlos, SP, Brasil

Telefax (16) 3351-8420

www.uab.ufscar.br

uab@ufscar.br



EdUFSCar

Conselho Editorial

José Eduardo dos Santos

José Renato Coury

Nivaldo Nale

Paulo Reali Nunes

Oswaldo Mário Serra Truzzi (Presidente)

Secretária Executiva

Fernanda do Nascimento

EdUFSCar

Universidade Federal de São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235

13565-905 - São Carlos, SP, Brasil

Telefax (16) 3351-8137

www.editora.ufscar.br

edufscar@ufscar.br

Sandra Regina Ceccato-Antonini

Microbiologia da fermentação alcoólica

A importância do monitoramento
microbiológico em destilarias

São Carlos



EdUFSCar

2012

© 2010, Sandra Regina Ceccato-Antonini

Concepção Pedagógica

Daniel Mill

Supervisão

Douglas Henrique Perez Pino

Equipe de Revisão Linguística

Ana Luiza Menezes Baldin

Clarissa Neves Conti

Francimeire Leme Coelho

Jorge Ialanji Filholini

Letícia Moreira Clares

Luciana Rugoni Sousa

Paula Sayuri Yanagiwara

Sara Naime Vidal Vital

Equipe de Editoração Eletrônica

Christhiano Henrique Menezes de Ávila Peres

Izis Cavalcanti

Rodrigo Rosalis da Silva

Equipe de Ilustração

Jorge Luís Alves de Oliveira

Lígia Borba Cerqueira de Oliveira

Priscila Martins de Alexandre

Capa e Projeto Gráfico

Luís Gustavo Sousa Sguissardi

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária da UFSCar

| | |
|-------|---|
| C387m | Ceccato-Antonini, Sandra Regina. Microbiologia da fermentação alcoólica : a importância do monitoramento microbiológico em destilarias / Sandra Regina Ceccato-Antonini. -- São Carlos : EdUFSCar, 2010. 105 p. -- (Coleção UAB-UFSCar). |
| | ISBN – 978-85-7600-222-2 |
| | 1. Microbiologia industrial. 2. Fermentação. 3. Álcool. 4. Levedos. 5. Bactérias. I. Título. |
| | CDD – 660.62 (20ª) CDU – 576.8:66 |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------|---|
| APRESENTAÇÃO | 9 |
|---------------------------|---|

UNIDADE 1: Importância do monitoramento microbiológico no processo fermentativo

| | |
|---|----|
| 1.1 Primeiras palavras | 13 |
| 1.2 Problematizando o tema | 13 |
| 1.3 Fermentação alcoólica: características gerais | 14 |
| 1.4 O monitoramento microbiológico: agentes de contaminação, métodos de detecção e formas de controle | 16 |
| 1.4.1 Bactérias | 16 |
| 1.4.2 Floculação | 18 |
| 1.4.3 Leveduras selvagens | 20 |
| 1.5 Considerações finais | 22 |

UNIDADE 2: Morfologia, estrutura celular, metabolismo, nutrição e multiplicação de bactérias e leveduras

| | |
|--|----|
| 2.1 Primeiras palavras | 25 |
| 2.2 Problematizando o tema | 25 |
| 2.3 Características gerais das bactérias e leveduras | 25 |
| 2.3.1 Bactérias | 25 |
| 2.3.2 Leveduras | 31 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 2.4 Considerações finais | 35 |
|--------------------------------|----|

UNIDADE 3: Técnicas e métodos microbiológicos para avaliação da contaminação microbiana

| | |
|--|----|
| 3.1 Primeiras palavras | 39 |
| 3.2 Problematizando o tema | 39 |
| 3.3 Técnicas para avaliação da viabilidade de leveduras no processo fermentativo | 40 |
| 3.3.1 Contagem direta ao microscópio | 40 |
| 3.3.1.1 Procedimento analítico | 41 |
| 3.3.2 Diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura | 44 |
| 3.3.2.1 Procedimento analítico | 47 |
| 3.4 Técnicas para avaliação da viabilidade de bactérias no processo fermentativo | 51 |
| 3.4.1 Contagem direta ao microscópio | 51 |
| 3.4.1.1 Procedimento analítico | 51 |
| 3.4.2 Diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura | 52 |
| 3.4.2.1 Procedimento analítico | 52 |
| 3.5 Coloração de Gram | 53 |
| 3.5.1 Procedimento | 53 |
| 3.6 Teste de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos | 55 |
| 3.6.1 Procedimento analítico | 56 |
| 3.6.1.1 Preparo do inóculo | 56 |
| 3.6.1.2 Realização do teste | 57 |
| 3.7 Composição dos meios de cultura e soluções | 58 |
| 3.8 Considerações finais | 63 |

UNIDADE 4: Caracterização de leveduras por técnicas tradicionais e moleculares

| | | |
|---------|--|----|
| 4.1 | Primeiras palavras | 67 |
| 4.2 | Problematizando o tema | 67 |
| 4.3 | Técnicas utilizadas na identificação de leveduras | 69 |
| 4.3.1 | Técnicas clássicas ou tradicionais | 69 |
| 4.3.2 | Técnicas de biologia molecular | 71 |
| 4.3.2.1 | Cariotipagem por meio da eletroforese em campo pulsado | 73 |
| 4.3.2.2 | Reação de polimerização em cadeia (PCR) | 76 |
| 4.3.2.3 | DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD) | 79 |
| 4.3.2.4 | Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA mitocondrial (RFLP/mtDNA) | 81 |
| 4.3.2.5 | Microsatélites | 82 |
| 4.4 | Comparação entre as técnicas de tipagem genética | 84 |
| 4.5 | Considerações finais | 86 |

UNIDADE 5: Leveduras selecionadas

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1 | Primeiras palavras | 89 |
| 5.2 | Problematizando o tema | 89 |
| 5.2.1 | Fatores que afetam as leveduras fermentativas | 90 |
| 5.2.2 | Estudo comparativo das linhagens de leveduras utilizadas na fermentação alcoólica | 90 |
| 5.2.3 | Estratégias para seleção de linhagens de leveduras | 92 |
| 5.3 | Considerações finais | 94 |

| | |
|--------------------|----|
| REFERÊNCIAS | 97 |
|--------------------|----|

APRESENTAÇÃO

O setor sucroalcooleiro é uma das indústrias mais representativas do processo de desenvolvimento brasileiro. Desde o Brasil Colônia, em que a cultura da cana-de-açúcar foi uma das primeiras atividades econômicas, sendo até os dias atuais, o nosso país é líder de produção e o mais competitivo na fabricação de açúcar e álcool.

Os produtores sucroalcooleiros enfrentam constante concorrência e não devem medir esforços na procura por elevada competitividade do produto nacional. Além disso, a redução nos custos aumenta a eficiência da cadeia produtiva.

No processamento industrial da cana-de-açúcar para produção de álcool combustível, a fermentação contínua com reciclo celular, da forma como é praticada no Brasil, expõe o processo a uma série de situações que facilitam a contaminação por microrganismos indesejáveis. A própria levedura do processo fica também exposta a situações estressantes, características do processo, que acabam por afetar a viabilidade celular e conseqüentemente o rendimento fermentativo.

Assim é de fundamental importância que a unidade industrial monitore a fermentação, analítica e microbiologicamente, para que a tomada de decisões possa ser feita de forma racional e efetiva. Medições bem feitas permitem avaliar os resultados das medidas adotadas, o retorno dos investimentos e, quando necessário, o ajuste das condições do processo.

Este livro foi então organizado com o objetivo de abordar os principais aspectos relativos à microbiologia do processo fermentativo, apresentando as características das bactérias e leveduras, sua importância no processo, as técnicas e os métodos microbiológicos utilizados no monitoramento e a caracterização de linhagens baseada em testes morfológicos/fisiológicos e moleculares. A importância do uso de leveduras selecionadas é também discutida na unidade final deste livro.

Como a aplicação das técnicas de monitoramento microbiológico exige conhecimentos teóricos e um treinamento prático, procurou-se ainda apresentar em detalhes os procedimentos e protocolos utilizados para a avaliação da contaminação microbiana nas dornas de fermentação, porém, não houve pretensão de esgotar o assunto.

A bibliografia ao final do livro deve servir de ponto de partida para os técnicos buscarem temas pertinentes, pois os desafios ainda são grandes e o conhecimento pode ser mais aprofundado. O setor sucroalcooleiro ainda é altamente carente de mão de obra especializada, e nesse sentido, este livro pretende dar a sua contribuição.

UNIDADE 1

Importância do monitoramento
microbiológico no processo fermentativo

1.1 Primeiras palavras

Nesta unidade serão discutidos a importância do monitoramento microbiológico para o processo fermentativo que vise a produção de etanol e o impacto que contaminações microbianas causam no rendimento fermentativo.

1.2 Problematizando o tema

A produção mundial de álcool combustível representa apenas 2,5% do consumo de gasolina, o que retrata um mercado amplo a ser conquistado, devido aos preços internos do barril de petróleo. Estima-se um custo de cerca de US\$ 80, em 2010, a unidade do barril.

Desde a década de 1970, com a criação do Programa Nacional de Álcool (Proálcool), específico para a produção e uso do álcool como combustível, os produtores de cana e empresários do setor encorajaram-se a aumentar a capacidade operacional das destilarias. Durante trinta e cinco anos, ocorreu um salto marcante na produção de álcool, passando de 0,56 bilhão de litros, em 1975, para mais de 27 bilhões de litros, na safra 2010/2011 (AMORIM, 2010).

Esse período exigiu das destilarias um grande preparo para enfrentar os desafios. Foi necessário investir em pesquisa, capacitação de pessoas e desenvolvimento de novas tecnologias para uma gestão eficaz. Esta se faz com números e informações confiáveis e, para o controle dos processos industriais de fermentação, o controle analítico-químico e microbiológico torna-se de fundamental importância (AMORIM, 2010).

No entanto, a preocupação com a melhoria da eficiência do processo de fermentação é recente, pois este sempre foi tratado como assunto secundário nas destilarias, devido à baixa rentabilidade do etanol. Apesar das muitas tecnologias existentes, ainda é necessário maior conscientização para a prevenção, melhor alternativa para evitar gastos com antimicrobianos e perdas no rendimento fermentativo.

A contaminação por bactérias, fator de maior impacto sobre a produtividade de etanol, pode diminuir a produção de álcool e ainda exigir a aplicação de antibióticos, com custos para a indústria (ALCOOLBRÁS, 2010).

Atentar para a importância do monitoramento microbiológico pode significar a grande diferença entre ganhar ou perder em produtividade, traduzida muitas vezes em milhões de litros de etanol (CECCATO-ANTONINI, 1998).

1.3 Fermentação alcoólica: características gerais

Fermentação alcoólica é o fenômeno por meio do qual os açúcares são transformados em álcool e gás carbônico, principalmente por ação das leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação dos mostos (caldo de cana e/ou melaço) realiza-se em três fases distintas: pré-fermentação ou preliminar, fermentação principal e pós-fermentação ou complementar, segundo Amorim (2005).

A pré-fermentação inicia-se quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado, e caracteriza-se por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio.

Após cinco ou seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida por elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto devido ao desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH (potencial hidrogeniônico). Essa fase termina quando as espumas desaparecem, durando de nove a dez horas.

A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico, momento em que não se formam mais espumas. Essa fase pode durar de seis a oito horas; quanto menor a duração, melhor para evitar a infecção do vinho e do pé de cuba, que será utilizado em uma nova fermentação. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho.

Ao término do processo fermentativo, o vinho é então centrifugado, retirando-se as leveduras (leite ou creme de leveduras), as quais são então tratadas com água e ácido sulfúrico, retornando às dornas para outro ciclo fermentativo. O vinho delevedurado segue então para a destilação para a obtenção do etanol, gerando o resíduo denominado vinhaça.

O esquema representativo do processo de fermentação alcoólica industrial para produção de álcool combustível está mostrado na Figura 1.

O tratamento ácido objetiva a redução da carga bacteriana potencialmente contaminante do processo, advinda do caldo de cana, da água de lavagem da cana, do melaço e do próprio solo. Gallo & Canhos (1991) observaram a redução de 44,3% da microbiota contaminante em função do vigor e tempo do tratamento ácido.

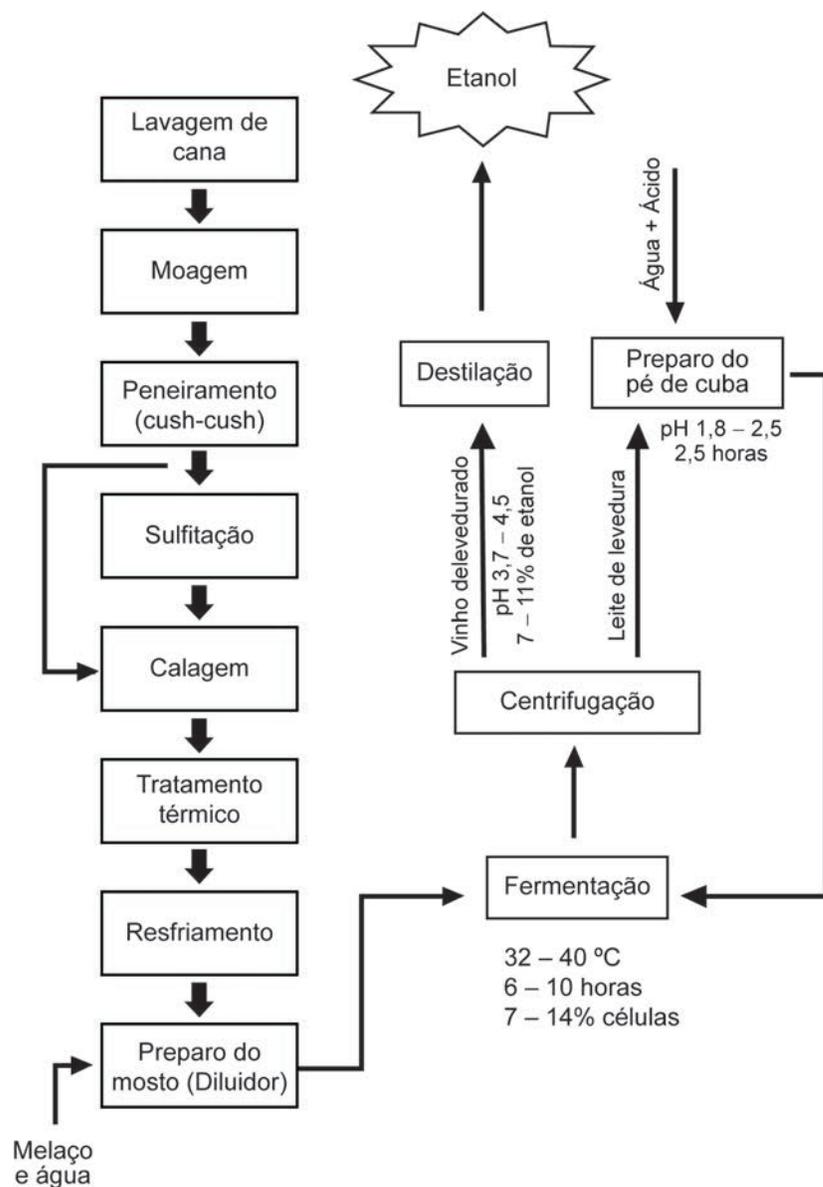


Figura 1 Esquema representativo do processo fermentativo para produção de etanol.

O processo de fermentação alcoólica predominante no Brasil é o de batelada alimentada com reciclo total do agente da fermentação, o qual permite maior produtividade em relação ao processo descontínuo (batelada simples). O processo de fermentação contínua em múltiplos estágios, com reciclo considerável de fermento, também contribui para aumento da produtividade (AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS, 2010).

O reciclo das leveduras, e com isso o reciclo de contaminantes, causa diversos distúrbios, tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade e morte das células de levedura devido a toxinas lançadas no meio pelo contaminante (ALTHERTUM et al., 1984), fermentações secundárias oriundas da atividade desses microrganismos contaminantes (BOVI & MARQUES, 1983), além do problema de floculação das células de levedura provocada tanto por bactérias como pelas próprias leveduras.

Dessa maneira, o processo de fermentação em uso no Brasil atende a diversos requisitos importantes para a produção de etanol em larga escala, para emprego como combustível. Trata-se de um processo robusto, sem interrupções, capaz de suportar alterações bruscas na matéria-prima e operar em condições de baixo nível de assepsia (AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS, 2010).

No entanto, essa característica – baixo nível de assepsia – pode trazer sérios problemas ao processo, resultando em reduções significativas da eficiência industrial, com queda no rendimento fermentativo, maior tempo de fermentação e maior formação de espumas pelo aumento da viscosidade, entre outros problemas, ocasionados por contaminações bacterianas e por leveduras selvagens (CECCATO-ANTONINI, 1998).

Além disso, em processos de batelada e batelada alimentada, os inconvenientes decorrentes das contaminações microbianas são mais facilmente contornados, enquanto em processos contínuos, podem se tornar um sério problema.

Por esse motivo é que se tem falado muito da necessidade de um acompanhamento microbiológico da fermentação, ou seja, o monitoramento microbiológico, visando a detecção dos contaminantes e o eficiente uso de antimicrobianos e estratégias para contornar o problema sem afetar o processo e o rendimento industrial.

1.4 O monitoramento microbiológico: agentes de contaminação, métodos de detecção e formas de controle

1.4.1 Bactérias

Entre os contaminantes que mais aparecem nos processos fermentativos, ocorrendo inclusive na etapa da fermentação alcoólica, estão as bactérias, com predominância das Gram-positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* (CECCATO-ANTONINI, 1998).

O ambiente propício para a ação das bactérias deriva da grande dificuldade encontrada pelas usinas para operar com um modelo esterilizado, o que ocorre em parte devido às próprias características da cana. A contaminação bacteriana também se prolifera devido às condições operacionais da própria usina, como o sistema de moagem, tratamento térmico muitas vezes ineficiente, pontos mortos no processo, contaminação pelos trocadores de calor, tubulações e caixa de caldo, água utilizada na diluição do fermento, assepsia das dornas e paradas na indústria (ALCOOLBRÁS, 2010).

Os efeitos causados pelas bactérias na fermentação alcoólica estão ilustrados na Figura 2.

Os prejuízos causados pelas bactérias podem ser exorbitantes, pois elas são capazes de dobrar a contaminação em apenas 28 minutos. Além de prejudicar a produção de etanol, o crescimento bacteriano exige aplicação de antibióticos, muitas vezes exagerada. Cerca de 10 quilos podem ser usados por dia para controle do problema, ao custo de US\$ 200 por quilo (ALCOOLBRÁS, 2010).

Além disso, o uso contínuo de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes, as quais se tornam cada vez menos sensíveis à sua ação. Vários outros procedimentos podem ajudar a reduzir os danos causados pelos contaminantes, como limpeza das moendas, tubulações, instalações da fermentação, descarte de fundo de dorna, recentrifugação do fermento e tratamento ácido (CECCATO-ANTONINI, 1998).

Como alternativa ao uso de antibióticos, Meneghin et al. (2008) utilizaram dióxido de cloro para inibir o crescimento de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, encontrando valores de concentração mínima inibitória menores para *Bacillus subtilis* (10 ppm) e *Leuconostoc mesenteroides* (50 ppm) do que para *Lactobacillus fermentum* (75 ppm) e *Lactobacillus plantarum* (125 ppm). Essas concentrações tiveram o mesmo efeito inibidor que 3 ppm de Kamoran®, com exceção de *B. subtilis*, no qual não se observou inibição de crescimento a esta concentração. As leveduras industriais apresentaram inibição no crescimento em concentrações superiores a 50 ppm, porém esta pareceu ser dependente do tipo de linhagem de levedura.

Outros produtos têm sido empregados para o controle bacteriano, como os beta-ácidos do lúpulo, as bacteriocinas e outros procedimentos como a utilização de bacteriófagos, vírus que parasitam bactérias (BASSO, 2006).

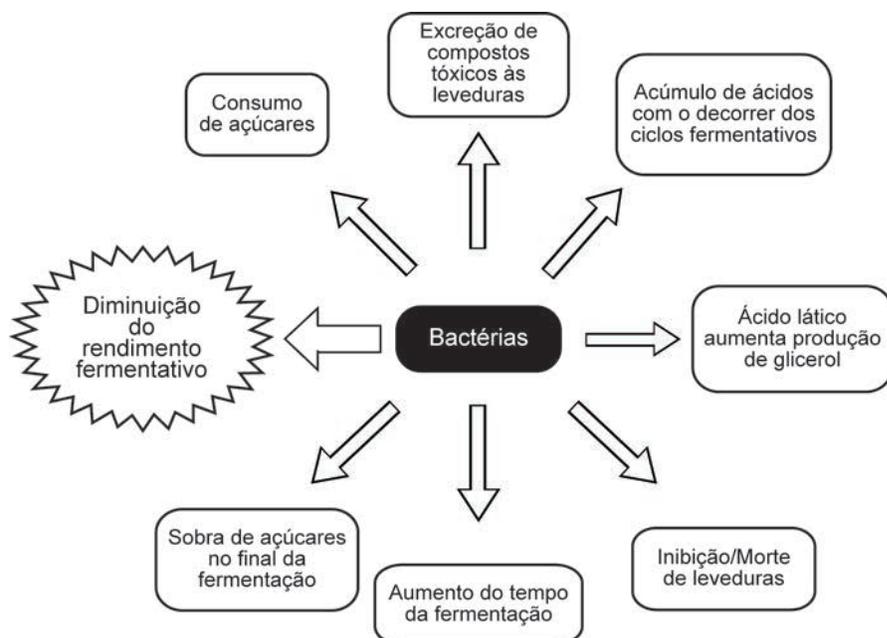


Figura 2 Principais efeitos causados pelas bactérias na fermentação alcoólica.
Fonte: adaptada de Alcoolbrás (2010).

A determinação do número e dos tipos de bactérias presentes no processo é um parâmetro importante para o controle da infecção. O nível considerado mínimo para a prevenção de perdas e obtenção de ganhos de rendimentos é 10^6 bastonetes/mL, mas há apenas oito anos, a contaminação média da fermentação no setor era de 10^7 - 10^8 bastonetes/mL (ALCOOLBRÁS, 2010).

Várias técnicas têm sido propostas para estimar a população bacteriana de amostras coletadas em diversas fases do processo, como a contagem direta ao microscópio e a semeadura em placas (plaqueamento). Porém, o emprego de um ou outro método dependerá das condições e instalações do laboratório da indústria, além de um treinamento específico dos laboratoristas.

Também é fundamental que o laboratório industrial utilize técnicas para detecção da sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos, verificando assim quais são exatamente os antibióticos ou biocidas mais eficientes para a aplicação industrial (CECCATO-ANTONINI, 1998).

As técnicas acima – contagem de bactérias vivas por microscopia (duração de 15 minutos) e os testes de sensibilidade na escolha de antibióticos – permitem melhorar o controle microbiológico, com medidas mais eficazes (AMORIM, 2010).

Poucos trabalhos tratam das relações de coexistência entre leveduras e bactérias, como aquelas que ocorrem no ambiente da fermentação, e a maioria dos relatos tende a explicitar a ação deletéria da bactéria sobre a levedura. No entanto, a levedura igualmente mostra efeitos antagônicos frente às bactérias, sendo tal efeito atribuído, entre outros, pela ação do ácido succínico em sinergismo com o etanol, ambos formados pela levedura (BASSO, 2006).

1.4.2 Floculação

As bactérias podem também induzir à floculação das leveduras do processo, *S. cerevisiae* (Figura 3). Na floculação, as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada. Cessada a fase tumultuosa da fermentação, ou quando a agitação mecânica no fermentador é interrompida, esses flocos sedimentam-se rapidamente ou flutam impulsionados por bolhas de gases. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em etanol e CO_2 pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio. Além disso, nas unidades que realizam o reaproveitamento de células, as operações de recuperação de fermento ficam prejudicadas pela presença dessas estruturas, comprometendo seriamente o desempenho industrial (LUDWIG, OLIVA NETO & ANGELIS, 2001).

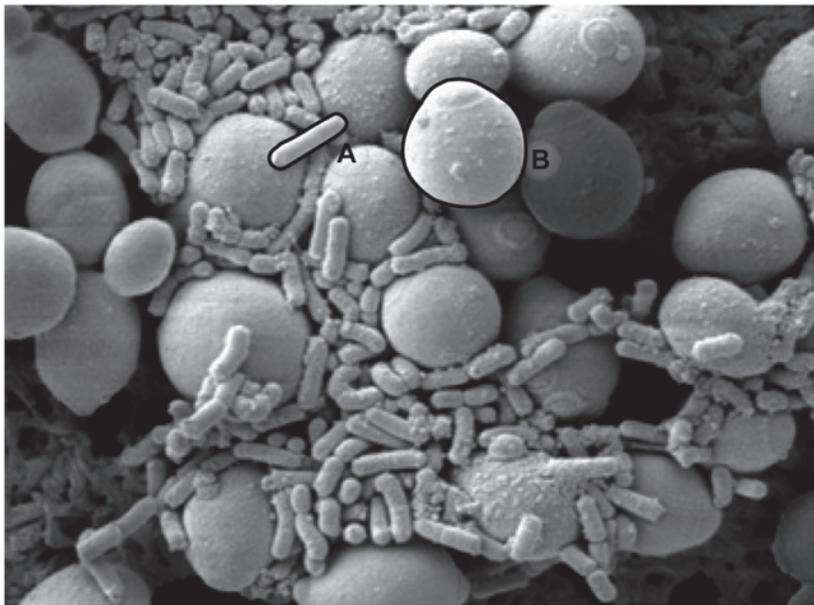


Figura 3 Foto de bactérias (A) e leveduras (B) em microscopia eletrônica de varredura, em flocação.

Bactérias como *Sporolactobacillus* e *Lactobacillus* foram descritas como os agentes causadores da flocação. O isolamento frequente de cepas de *L. fermentum* em fermentações floculadas evidenciou sua importância como contaminante de processos industriais (YOKOYA & OLIVA NETO, 1991; ZARATTINI et al., 1993; GUERRA & ANGELIS, 1998).

A flocação ocorre devido a vários fatores, dentre os quais destacam-se o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias (SERRA et al., 1979); o contato entre bactérias indutoras da flocação e leveduras (YOKOYA & OLIVA NETO, 1991); ou ainda devido à contaminação por leveduras floculantes (STRATFORD, 1989). É necessária ainda a presença de íons cálcio e também a movimentação entre as células para a aceleração do processo de flocação, provavelmente devido ao aumento da colisão entre as células, permitindo a adesão (MILL, 1964; STRATFORD et al., 1988).

A utilização de enzimas – como as proteases – é eficaz na desflocação de leveduras, uma vez que fatores proteicos associados a sais minerais e às mananas parecem estar envolvidos em qualquer tipo de flocação de leveduras (HENRIKSSON, SZEWSYK & CONWAY, 1991; YOKOYA & OLIVA NETO, 1991).

O tratamento ácido do fermento induz à dispersão do fermento e das bactérias, mas não à total eliminação da flocação (GUERRA & ANGELIS, 1998), pois ao retornar à dorna de fermentação, ocorre uma alteração do pH para uma faixa de 3,8 a 4,2, com a mistura da suspensão de leveduras com o mosto, voltando o fermento a flocular.

Ludwig, Oliva Neto & Angelis (2001) verificaram que uma técnica simples e econômica como a utilização de pH abaixo de 3,0, numa faixa de 2,0 a 2,5 com floculação ao redor de 100%, resulta na desfloculação do fermento, permitindo assim o monitoramento da população de bactérias indutoras da floculação.

A floculação das leveduras é um fenômeno que se caracteriza pela adesão entre as células formando aglomerados, finalizando na sedimentação dos flocos em meios onde anteriormente se encontravam em suspensão (SATO, WATARI & SHINOTSUKA, 2001). Esse fenômeno acontece normalmente com as leveduras em condições de estresse que afetam a composição e morfologia da parede celular. Alguns fatores de estresse comuns aos processos fermentativos industriais, e que são promotores de floculação, incluem a diminuição da quantidade de nutrientes, e condições de temperatura, pH e oxigênio não adequados ao crescimento (VERSTREPEN, DERDELINCKX & VERACHTERT, 2003).

1.4.3 Leveduras selvagens

Se para o controle da contaminação bacteriana é possível a utilização de agentes antimicrobianos, o mesmo não pode ser dito em relação às leveduras selvagens ou “invasoras”. Algumas unidades industriais têm se deparado com problemas atribuídos à presença de leveduras contaminantes que, altamente competitivas dentro das condições existentes, passam a predominar na população de células presentes. A ocorrência dessas leveduras tem sido frequentemente associada a ocasiões em que se verificam reduções significativas da eficiência industrial, com queda no rendimento fermentativo, maior tempo de fermentação e maior formação de espumas pelo aumento da viscosidade (CECCATO-ANTONINI, 1998).

Ceccato-Antonini & Silva (2000) verificaram a eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras da fermentação alcoólica e isolaram gêneros como *Candida*, *Brettanomyces*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Dekkera*, *Hansenula* e outros. O gênero *Candida* tem sido comumente isolado de processos fermentativos para produção de etanol (CASTRO, 1995; CABRINI & GALLO, 1999), mas é a levedura *Dekkera* ou *Brettanomyces* (fase teleomórfica e fase anamórfica, respectivamente) que tem causado mais problemas no processo fermentativo. Souza-Liberal (2007) identifica e caracteriza, por meio de métodos moleculares, a principal levedura contaminante das plantas de produção de álcool combustível do nordeste brasileiro como sendo *Dekkera bruxellensis*, responsável pela diminuição na produção de etanol.

Isso ocorre porque quando as células dessa levedura se reproduzem no processo industrial, substituem as células de *S. cerevisiae*. Com isso, o processo

industrial se torna mais lento e a destilaria acaba por produzir menor quantidade de etanol por dia, em comparação com os dias em que não há esse tipo de contaminação. Dessa forma, uma fermentação mais lenta impõe uma diminuição da moagem da cana, que, por sua vez, diminui o descarregamento desta no pátio da indústria, causando problemas no cronograma de colheita. Tudo isso provoca custos diretos e perda de receita diária para a indústria (AGROSOFT BRASIL, 2010).

Ensaio fermentativos realizados com uma linhagem de *D. bruxellensis* (CCA059), em fermentações puras e mistas com *S. cerevisiae*, mostraram que a levedura contaminante foi capaz de crescer em meio ao caldo de cana, independentemente do tamanho do seu inóculo inicial (10^1 a 10^3 células/mL), impactando negativamente a fermentação etanólica. Tal processo causou a diminuição da viabilidade de *S. cerevisiae*, diminuindo o pH do meio, decréscimo na produção de etanol e na eficiência fermentativa, possivelmente devido à produção de ácido acético a partir do açúcar redutor do meio de fermentação. Extrapolando-se os resultados obtidos em escala de laboratório para a escala industrial de uma destilaria de médio porte, a contaminação por *D. bruxellensis* acarretaria uma perda de 6 a 15 milhões de litros de álcool na safra, que deixariam de ser produzidos, dependendo do nível de contaminação (MENECHIN, 2007).

Ceccato-Antonini & Parazzi (2000) relataram um caso de contaminação da fermentação por um biótipo de *S. cerevisiae* que apresentava colônias opacas, enrugadas e células dispostas em aglomerados, numa destilaria paulista na safra 1997/1998. Essa levedura apresentou crescimento nas condições de fermentação e devido à sua morfologia, tendeu a permanecer na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma (*scum*) grossa, pegajosa, a qual causava extravasamento de mosto das dornas e conseqüentemente perda de açúcar e álcool. Além disso, apresentavam uma alteração na morfologia, com células alongadas, a qual normalmente é verificada nessa levedura em condições de estresse (CECCATO-ANTONINI, 2008). Como não há substâncias inibidoras do crescimento que afetem exclusivamente esse biótipo, sem impacto sobre a levedura do processo, estratégias como a utilização de dornas adicionais para “sangrar” o fermento, e até mesmo o descarte de parte do fermento, têm sido utilizadas para minimizar o impacto na fermentação.

Outros relatos da presença desse biótipo de levedura na fermentação etanólica já foram apontados (OLIVEIRA & SILVA, 1993; CECCATO-ANTONINI & PARAZZI, 1996).

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

A detecção das leveduras contaminantes no processo e a diferenciação destas em relação à levedura do processo não são tarefas fáceis. Vários métodos têm sido propostos, como o uso de meios de cultura diferenciais, testes fermentativos e de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, parâmetros cinéticos e de produção específica, além de técnicas de biologia molecular como cariotipagem e análise de polimorfismos de DNA (Ácido Desoxirribonucleico). A utilização de uma ou várias técnicas concomitantemente depende das condições de trabalho nas destilarias e de pessoal treinado não só para executar como também para interpretar os resultados (CECCATO-ANTONINI & PARAZZI, 2000).

1.5 Considerações finais

O monitoramento microbiológico não pode ser esporádico e realizado somente no momento em que os problemas se apresentam, mas deve ser constante e a partir do início da safra, analisando-se o fermento de partida e os vários pontos do processo fermentativo, como caldo, água de diluição, mosto, melaço, fermento antes e depois do tratamento ácido (CECCATO-ANTONINI & PARAZZI, 2000).

Com os dados fornecidos pelo monitoramento microbiológico, a unidade produtora consegue prevenir os problemas advindos da contaminação descontrolada. Outro fator importante é a manutenção da temperatura de fermentação a níveis inferiores a 33 °C, pois temperaturas elevadas afetam a levedura e favorecem a multiplicação das bactérias (ALCOOLBRÁS, 2010; AMORIM, 2010).

O monitoramento constante da operação compreende todas as fases do processo, a partir da matéria-prima, passando pelo setor de extração, tratamento térmico, decantação, resfriamento e distribuição do mosto e, finalmente, a fermentação (ALCOOLBRÁS, 2010). O tempo decorrido entre o corte da cana até sua moagem é um dos fatores que mais afeta a qualidade da cana e, por sua vez, o rendimento de uma destilaria (AMORIM, 2010). A cana deve chegar isenta de matéria orgânica, nova, com baixa infestação de broca, cuidando para que o tempo de queima não ultrapasse 36 horas (ALCOOLBRÁS, 2010).

UNIDADE 2

Morfologia, estrutura celular, metabolismo,
nutrição e multiplicação de bactérias e leveduras

2.1 Primeiras palavras

Nesta unidade serão apresentados os conceitos fundamentais relacionados à morfologia, à estrutura celular, ao metabolismo, à nutrição e à multiplicação de bactérias e leveduras, visando a compreensão e o desenvolvimento das técnicas de monitoramento microbiológico.

2.2 Problematizando o tema

A fermentação alcoólica é realizada por leveduras, as quais convertem o açúcar da cana em etanol. Mas, pelo fato de o processo não ser asséptico, outros microrganismos podem contaminar o processo e causar queda no rendimento industrial. Várias técnicas e métodos têm sido propostos para o monitoramento dos contaminantes durante o processo fermentativo, baseados em características morfológicas, fisiológicas e genéticas dos microrganismos.

Todas as células microbianas apresentam estruturas básicas em comum, tais como a membrana citoplasmática, os ribossomos e normalmente uma parede celular. Duas categorias estruturais de células são reconhecidas, os procariontos e os eucariotos, as quais diferem quanto à organização do genoma.

A forma de obtenção de energia entre os microrganismos pode variar, mas as opções podem ser sumarizadas em três, sendo a partir de compostos químicos orgânicos, de compostos químicos inorgânicos ou da energia luminosa. A energia é utilizada para o crescimento, que é definido como o aumento do número de células, e, dessa forma, o conhecimento sobre como as populações microbianas podem rapidamente se expandir é de muita utilidade no desenvolvimento de métodos de controle do crescimento microbiano (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

Para o desenvolvimento e aplicação das técnicas e métodos de monitoramento microbiológico nas destilarias, é importante que se conheça as características dos microrganismos mais importantes envolvidos no processo de fermentação, as bactérias e as leveduras.

2.3 Características gerais das bactérias e leveduras

2.3.1 Bactérias

A partir da análise comparativa de sequências de RNA ribossomal, três linhagens celulares filogeneticamente distintas foram identificadas, sendo duas delas compostas somente por procariontos, enquanto a terceira é constituída

por eucariotos. Essas linhagens, designadas de domínios evolutivos, foram denominadas *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

O domínio *Bacteria* compreende uma enorme variedade de procariotos, desde os causadores de doenças até as milhares de espécies não patogênicas. Uma grande variedade de tipos morfológicos e fisiológicos é encontrada nesse domínio. O domínio *Archaea* é constituído na sua maioria por bactérias de ambientes extremos, como as metanogênicas, halófilas e termófilas (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

Embora existam milhares de espécies bacterianas diferentes, os organismos isolados apresentam uma das três formas gerais: elipsoidal ou esférica, cilíndrica ou em bastonete e espiralada ou helicoidal (Figura 4). As bactérias medem aproximadamente 0,5 a 1,0 µm por 2,0 a 5,0 µm.

O exame da célula bacteriana revela certas estruturas externas e internas à parede celular, esquematizadas na Figura 5. As estruturas externas compreendem os flagelos, os pelos (fímbrias) e a cápsula, quando presente.

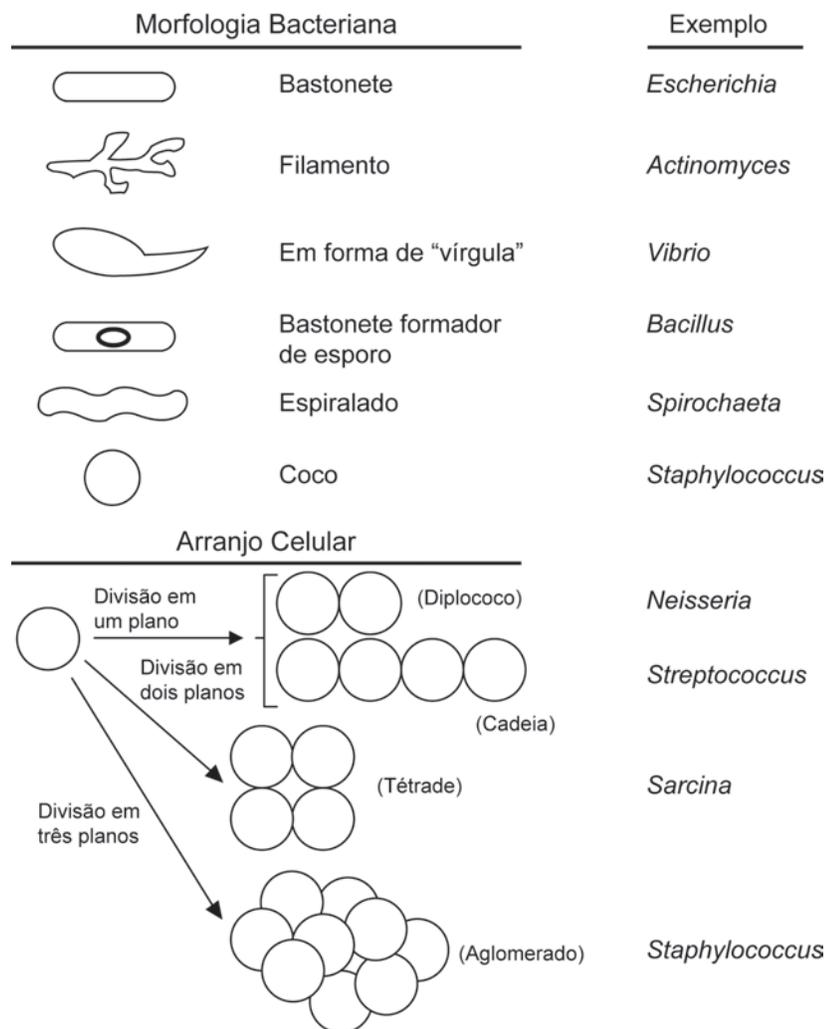


Figura 4 Tipos morfológicos de bactérias.

A parede celular é uma formação rígida que dá forma à célula e essa rigidez pronunciada pode ser facilmente demonstrada submetendo bactérias de formas diferentes a condições físicas extremas, tais como pressões osmóticas muito elevadas ou muito baixas ou temperatura abaixo de zero seguidas de aquecimento. Mesmo nessas condições, as células manterão sua forma original devido à parede celular. As paredes celulares bacterianas parecem ser indispensáveis ao crescimento das bactérias e à sua divisão. Células cujas paredes foram removidas especificamente, isto é, protoplastos, são incapazes de efetuar divisões ou crescimento normais.

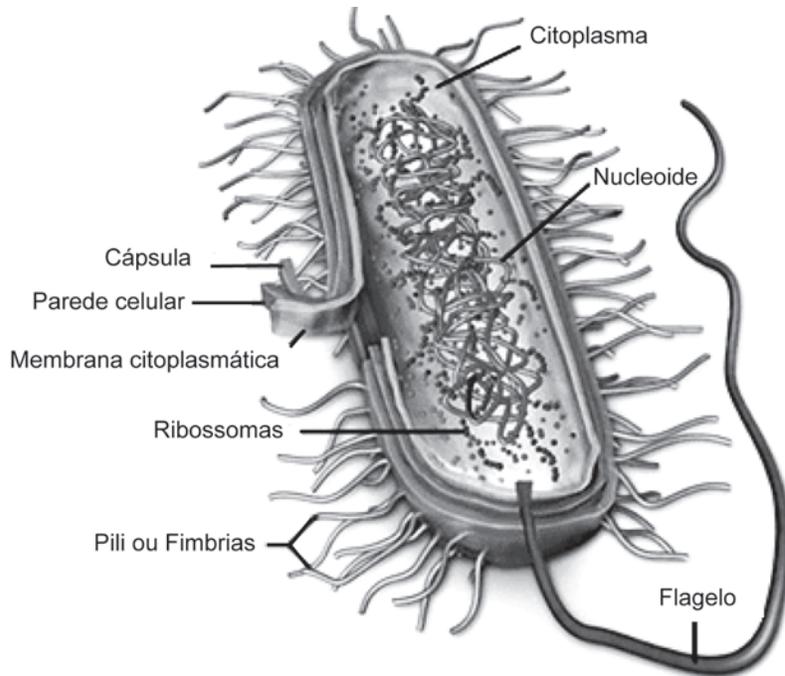


Figura 5 Representação esquemática da organização estrutural de uma célula bacteriana.

As paredes celulares de *Bacteria* contêm um polissacarídeo chamado peptidoglicano, formado por cadeias com repetições alternadas de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, além de um pequeno conjunto de aminoácidos como a L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico e lisina, e ainda ácido diaminopimélico. As diferentes cadeias são interligadas por meio de ligações peptídicas cruzadas, que unem os resíduos de ácido murâmico.

No entanto, há diferenças entre as paredes celulares das bactérias. Este é o motivo pelo qual as bactérias podem reagir diferentemente à coloração de Gram, permitindo a separação das mesmas em bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.

A coloração de Gram é um dos procedimentos de coloração mais úteis no laboratório de microbiologia, pois, além de permitir a diferenciação das bactérias em Gram-positivas ou negativas, possibilita também a avaliação da morfologia das células. É o ponto de partida para a identificação das bactérias.

Em bactérias Gram-positivas, cerca de 90% da parede celular corresponde ao peptidoglicano, embora outro tipo de constituinte, o ácido teicoico, também seja normalmente encontrado em pequenas quantidades. Nas bactérias Gram-negativas, apenas 10% da parede corresponde ao peptidoglicano. Além deste, tais bactérias contêm uma camada adicional de parede, composta por lipopolissacarídeos (LPS). A Figura 6 mostra as diferenças na constituição da parede das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Assim, em uma coloração de Gram, o cristal violeta e o iodo, quando aplicados, formam um complexo insolúvel no interior da célula. Em células Gram-negativas, o complexo é extraído pelo tratamento com álcool, enquanto em células Gram-positivas esse complexo permanece no interior da célula. Estas, que apresentam espessas paredes celulares com várias camadas de peptidoglicano, são desidratadas pelo álcool, resultando no fechamento dos poros da parede celular e impedindo a remoção do complexo insolúvel de cristal violeta-iodo da célula.

Em contrapartida, nas Gram-negativas, o álcool penetra rapidamente na membrana externa, rica em LPS, e a fina camada de peptidoglicano é incapaz de impedir a passagem desse solvente, promovendo assim a fácil remoção do complexo cristal violeta-iodo. O contracorante safranina cora então as Gram-negativas de vermelho, enquanto as Gram-positivas permanecem roxas (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

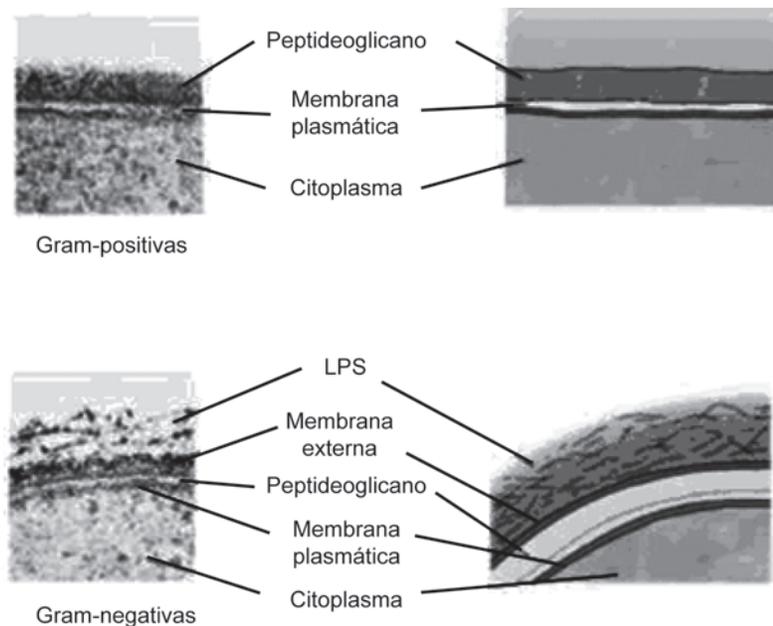


Figura 6 Parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Imediatamente abaixo da parede celular existe uma fina membrana, ou cobertura, chamada membrana citoplasmática, às vezes também conhecida como membrana protoplasmática ou, simplesmente, membrana plasmática. As formações da membrana, como as intrusões e extrusões, desempenham papel variado nos processos de metabolismo e de reprodução, envolvendo-se, por exemplo, na formação do septo durante o processo de divisão celular das bactérias.

O material celular, contido dentro da membrana citoplasmática, constitui o citoplasma, onde podem ser identificados depósitos concentrados de certas substâncias, como volutina, ácido, entre outros.

As células bacterianas não contêm o núcleo típico das células de animais e vegetais superiores. O DNA está presente na forma de uma grande molécula de fita dupla, o cromossomo bacteriano, que se condensa formando uma massa visível denominada nucleóide, sem uma membrana nuclear separando o material genético do citoplasma.

A Figura 7 mostra o processo geral de reprodução nas bactérias, a fissão binária. Na maioria dos procariotos, o crescimento de uma célula individual ocorre até que esta se divida, originando duas novas células. O tempo necessário para que um ciclo completo de crescimento (tempo de geração) ocorra é altamente variável, dependendo tanto de fatores nutricionais quanto genéticos. Algumas bactérias podem apresentar um tempo de geração de 1 a 3 horas, enquanto outras podem necessitar de 24 horas.

Certos tipos de bactérias Gram-positivas têm a capacidade de produzir um corpo oval de parede espessa (um por célula), que é uma célula altamente resistente. Essas formas resistentes são chamadas de endósporos ou, mais comumente, esporos. São extremamente resistentes aos agentes físicos e químicos adversos.

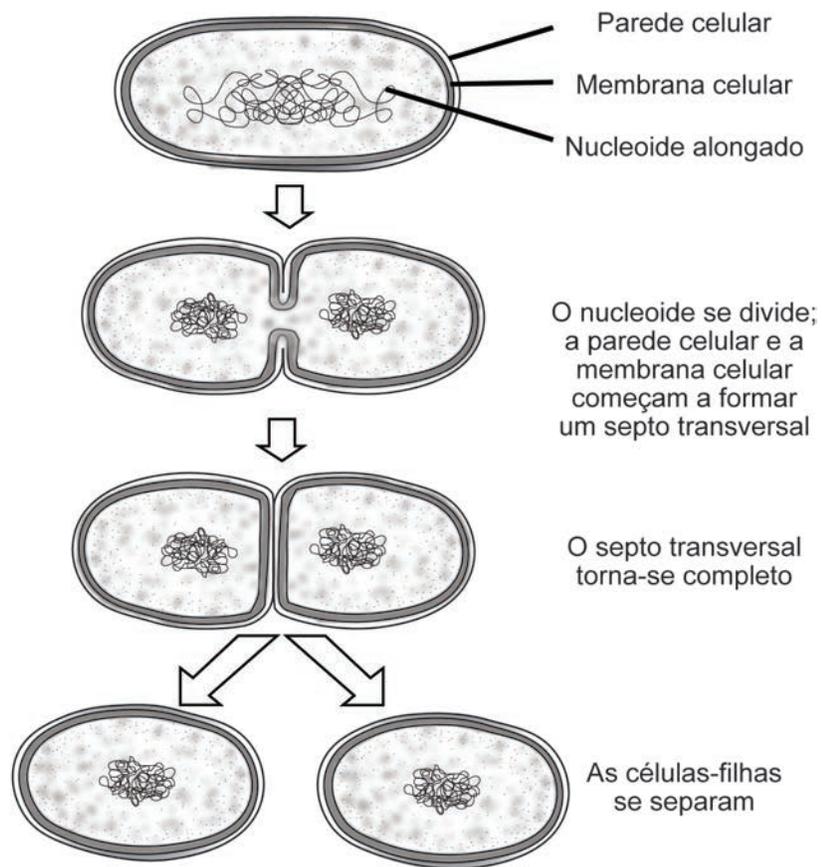


Figura 7 Processo geral da fissão binária em bactérias.

Fonte: adaptada de Tortora, Funke & Case (2003).

A formação do esporo origina uma capa praticamente desidratada, contendo as macromoléculas essenciais e outras substâncias, como o dipicolinato de cálcio e as pequenas proteínas solúveis em ácido, ausentes em células vegetativas. Os esporos podem permanecer indefinidamente em estado de dormência, porém podem ser ativados facilmente pelo aquecimento por vários minutos, a uma temperatura elevada (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

Para o crescimento de bactérias no laboratório há uma grande variedade de meios de cultura. Algumas bactérias podem crescer normalmente em qualquer meio de cultura, porém outras necessitam de meios especiais, e há ainda aquelas que não são capazes de crescer em nenhum meio de cultura já desenvolvido. Para permitir o crescimento, o meio deverá conter uma fonte de energia, uma fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e todos os fatores orgânicos que o organismo não é capaz de sintetizar. Além disso, o pH deve ser ajustado e, em seguida, o meio deve ser esterilizado. Finalmente, a cultura deve ser incubada na temperatura adequada para seu crescimento.

Em sua maioria, são utilizados meios complexos para o crescimento das bactérias heterotróficas, os quais são compostos de nutrientes como extratos de levedura, de carne ou de plantas ou de produtos de digestão proteica destas

ou de outras fontes. Quanto à temperatura, cada espécie bacteriana apresenta, para seu crescimento, uma temperatura mínima, máxima e ótima. Os microrganismos mais comumente encontrados são os mesófilos, os quais apresentam a temperatura ótima de crescimento entre 25 e 40 °C.

Quanto ao pH, a maioria das bactérias cresce melhor quando há variações pequenas de valor, sempre perto da neutralidade, entre 6,5 e 7,5. Poucas bactérias são capazes de crescer em pH na faixa ácida, como em 4,0.

Os microrganismos capazes de utilizar o oxigênio molecular (aeróbios) podem produzir mais energia a partir do uso de nutrientes que os organismos que não usam o oxigênio (anaeróbios). Entre as bactérias, encontram-se os aeróbios estritos (necessitam de oxigênio), anaeróbios facultativos (crescem na ausência e presença de oxigênio), anaeróbios estritos (não toleram oxigênio) e microaerófilos (necessitam de baixas concentrações de oxigênio), segundo Tortora, Funke & Case (2003).

O entendimento das condições necessárias para o crescimento bacteriano ajuda a determinar como o controle ou o estímulo do crescimento do microrganismo pode ser feito, dependendo do objetivo do trabalho. A escolha do meio de cultura é essencial para o acompanhamento microbiológico de processos fermentativos, como será estudado na próxima unidade.

2.3.2 Leveduras

Leveduras são microrganismos cujo crescimento dominante é na forma unicelular. A reprodução é assexuada, por brotamento multilateral e polar ou por fissão, e sexuada, por meio de ascósporos. As características morfológicas das leveduras determinadas por microscopia mostram formas esférica e ovoide, pera, cilíndrica e mesmo alongadas em pseudomicélio (Figura 8).

Outra característica importante desses microrganismos é a composição da parede celular, que consiste basicamente de polissacarídeos de glicose, manose ou N-acetilglicosamina. Os polissacarídeos de glicose, compostos de β -1,3- e β -1,6-glucanas, são os principais componentes da parede celular de leveduras. Os polissacarídeos de manose são ligados a proteínas, formando as manoproteínas, e localizam-se na parte externa da parede. Já os de N-acetilglicosamina ocorrem em pequenas quantidades, formando a quitina, com função primordial na septação e no brotamento. Observa-se que, ao contrário das plantas, a parede celular das leveduras não é composta de celulose. Os fungos também não armazenam amido, e sim glicogênio, assemelhando-se, assim, mais aos animais.

A gemulação ou brotamento é o modo de crescimento vegetativo mais comum em leveduras. Nas leveduras que se reproduzem por brotamento, a célula

parental forma uma protuberância (broto) na sua superfície externa. À medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. O material da parede celular é então sintetizado entre o broto e a célula parental, e o broto eventualmente se separa da célula-mãe (TORTORA, FUNKE & CASE, 2003).

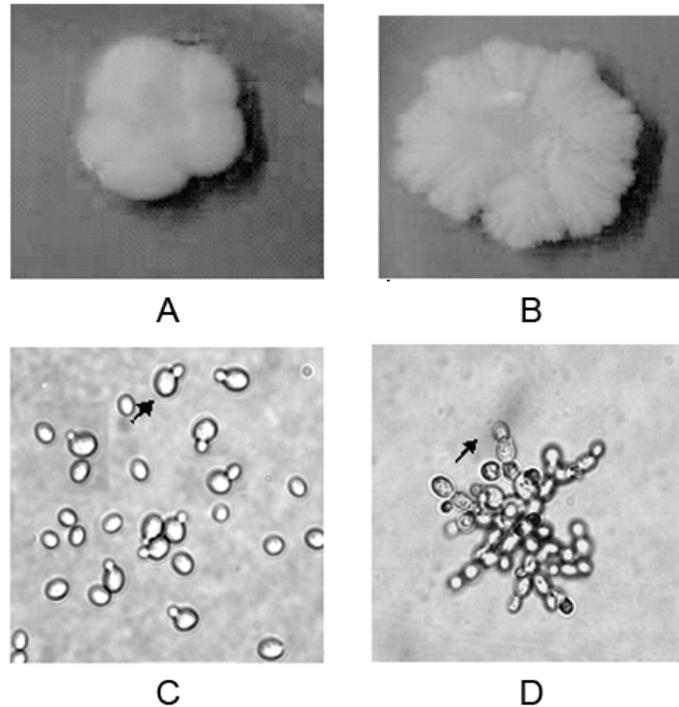


Figura 8 Morfologia das colônias (A, B) e das células (C, D) de *S. cerevisiae*. As células em C (dispersas, ovoides) formam colônias mucosas, bordos regulares, como em A, enquanto as células em D (pseudohifas) formam colônias rugosas, bordos irregulares, como em B. Observar células em brotamento em C e D (setas).

Uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células-filhas por brotamento. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam uns dos outros; esses brotos formam uma pequena cadeia de células chamada de pseudohifa (Figura 8).

A reprodução sexual em leveduras é uma via alternativa e normalmente ocorre em situações de limitado suprimento nutricional. Ocorre assim a conjugação de células de tipo sexual oposto, originando uma célula diploide capaz de se reproduzir por gemulação. Em *S. cerevisiae*, sob condições de falta de nutrientes, a meiose é induzida, conduzindo à esporulação e finalmente à propagação de quatro esporos haploides, os quais segregam 2:2, ou seja, dois esporos de *mating type* α e dois esporos de *mating type* β (Figura 9).

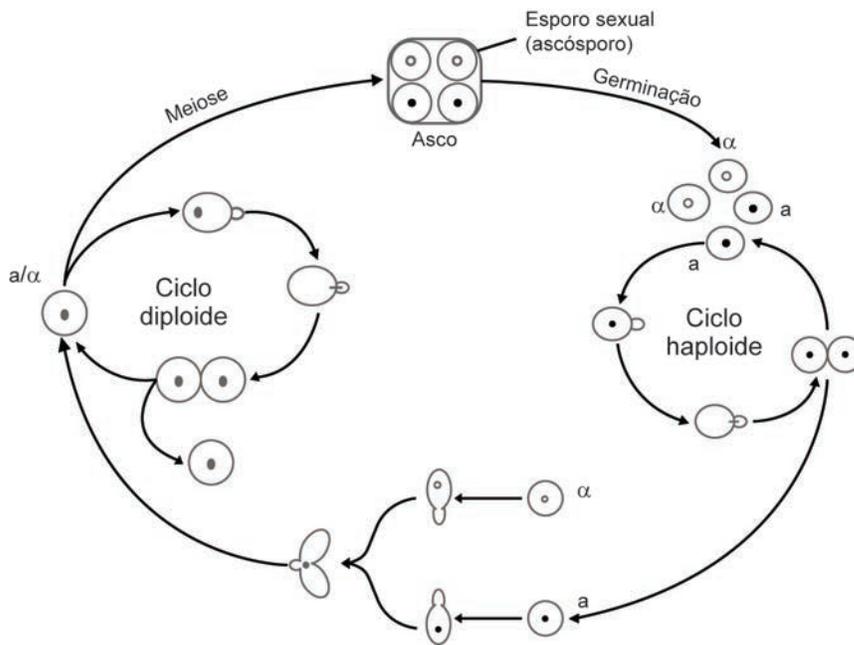


Figura 9 Ciclo de vida das leveduras, mostrando células haploides de *mating type* a e célula diploide a/α .

Fonte: adaptada de Pelczar, Reid & Chan (1980).

Em geral, as células de leveduras são maiores do que as bactérias, mas as menores leveduras não são tão grandes como as maiores bactérias. Tais microrganismos variam consideravelmente no que se refere às suas dimensões, com limites de 1 a 5 μm de largura e 5 a 30 μm de comprimento. Cada espécie tem uma forma característica, mas, mesmo em culturas puras, há consideráveis variações de tamanho e de forma das células individuais, dependendo da idade e do ambiente. As leveduras não possuem flagelos ou outros órgãos de locomoção.

Apresentam partes visíveis como parede celular, citoplasma, vacúolos, glóbulos de gordura, grânulos e núcleo (Figura 10).

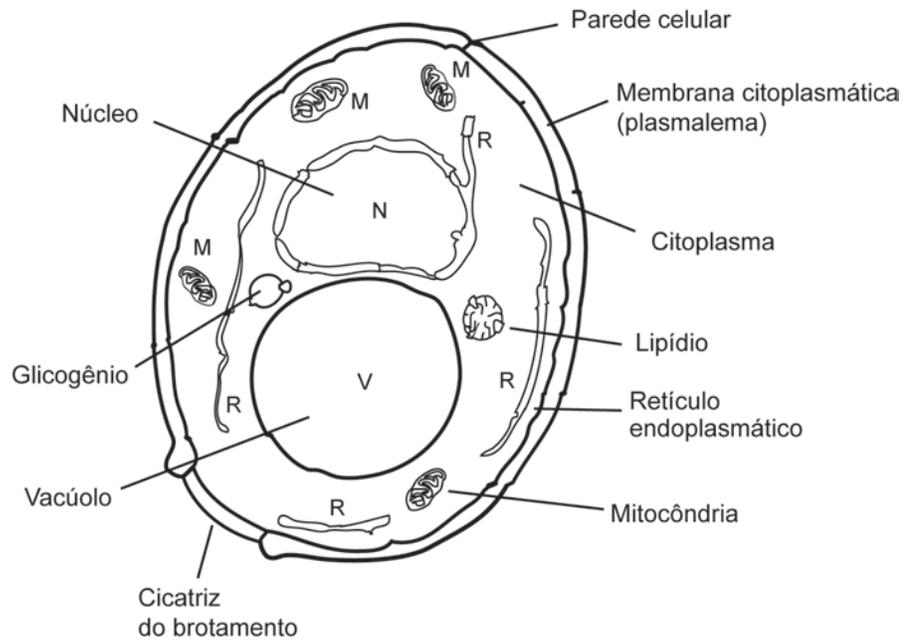


Figura 10 Esquema de uma célula de levedura.

As leveduras obtêm sua energia da quebra de compostos orgânicos, sendo capazes de sobreviver em condições aeróbias se suplementadas com glicose, sais de amônio, íons inorgânicos e poucos fatores de crescimento.

As leveduras são capazes também de crescimento anaeróbio facultativo. Podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico comoceptor final de elétrons, sendo um atributo valioso que permite que as leveduras sobrevivam em vários ambientes. Se é dado acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono. Essa fermentação é usada na fabricação de cerveja, de vinho e nos processos de panificação. Espécies de *Saccharomyces* produzem etanol nas bebidas fermentadas e dióxido de carbono para fermentar a massa de pão.

Entretanto, em *Saccharomyces*, a fermentação predomina sobre a respiração quando as concentrações de açúcares estão altas, mesmo sob condições aeróbias (FERNANDES et al., 2009).

Quanto ao pH, as leveduras preferem meios ácidos, com pH em torno de 4,0-4,5. Os limites de tolerância estão situados entre pH 2,2 e 8,0, de acordo com as diversas espécies (PELCZAR, REID & CHAN, 1980).

Até o final dos anos 1980, a taxonomia das leveduras estava baseada nos métodos de coloração, formação da brotação, produção de urease e análise da morfologia da ultraestrutura da parede celular. Os testes taxonômicos clássicos baseiam-se também em testes fermentativos e de assimilação de uma variedade de compostos de carbono e nitrogênio, associados às avaliações da forma das células, estruturas de reprodução e tolerância osmótica. Esses testes consomem tempo e mão de obra, não sendo possível obter resultados antes de 20 dias. Além disso, nem sempre são fornecidos resultados inequívocos, capazes de discriminar em nível intraespecífico.

A classificação das leveduras segue três grupos principais, de acordo com o tipo de reprodução sexuada que apresentam: ascomicéticas, basidiomicéticas ou deuteromicéticas.

As ferramentas moleculares permitem a realização de análises filogenéticas, de identificação e de tipagem das leveduras, e são baseadas principalmente na amplificação de genes ribossomais e sequenciamento do DNA, como será visto mais adiante.

2.4 Considerações finais

A caracterização e a classificação dos microrganismos são muito importantes para a determinação de semelhanças e diferenças entre os organismos. Num ambiente com alta biodiversidade como o encontrado no processo de fermentação alcoólica, em que organismos tão diversos como bactérias e leveduras convivem, o conhecimento das características morfológicas e fisiológicas desses microrganismos ajuda na escolha dos métodos e técnicas para o controle ou estímulo do crescimento microbiano.

UNIDADE 3

Técnicas e métodos microbiológicos para
avaliação da contaminação microbiana

3.1 Primeiras palavras

Nesta unidade serão apresentados e discutidos os métodos e técnicas utilizados para a avaliação da contaminação microbiana na fermentação alcoólica. Será também apresentado o teste de sensibilidade a antimicrobianos utilizado para determinar a suscetibilidade de bactérias e leveduras a agentes antimicrobianos, por meio da concentração inibitória mínima (CIM, ou MIC, *minimum inhibitory concentration*).

3.2 Problematizando o tema

O permanente monitoramento microbiológico e o aperfeiçoamento de seus métodos permitem o acompanhamento da qualidade do fermento e a detecção de leveduras selvagens, ou seja, a diferenciação entre a levedura do processo e a levedura contaminante (selvagem), o que nem sempre é muito fácil.

Os meios de cultura diferenciais ou seletivos para isolamento e quantificação de populações de leveduras contaminantes baseiam-se em características fisiológicas comuns às leveduras selvagens, mas ausentes em leveduras do processo, iniciadoras da fermentação. Entre essas, destacam-se as nutricionais (variações nas fontes de carbono, nitrogênio e nos fatores de crescimento) e a resistência a certos compostos como antibióticos e corantes. Entretanto, um único meio não é totalmente satisfatório para a avaliação de todas as leveduras presentes, sendo, portanto, necessário o emprego de vários tipos de meios quanto se pretende detectar a maioria das leveduras presentes.

De modo geral, os meios seletivos ou diferenciais podem ser classificados em meios para detecção de leveduras contaminantes não *Saccharomyces* e meios para detecção de leveduras contaminantes do gênero *Saccharomyces*, podendo citar, no primeiro caso, os meios Ágar-Lisina e WLN + actidione e, no segundo caso, o meio de Lin (*Lin Wild Yeast Medium*).

A determinação do número de bactérias presentes nos vários pontos do processo industrial é importante para avaliar a eficiência do tratamento do caldo e os pontos de recontaminação.

A utilização de agentes antimicrobianos reduz os danos causados pelos contaminantes, porém há necessidade de determinar qual é o antimicrobiano e a dosagem mais corretos, visando a aplicação racional desses produtos.

Uma população de até 10^6 bactérias/mL não tem levado a indústria a recorrer aos antimicrobianos, pois o uso contínuo de antibióticos, por exemplo, pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes, as quais se tornam cada vez menos sensíveis à sua ação, além do alto custo (CECCATO-ANTONINI, 1998).

A escolha do método de monitoramento microbiológico vai depender da facilidade de implantação deste na unidade industrial. É muito importante o treinamento dos analistas/laboratoristas na realização adequada das técnicas no período de entressafra, além de uma supervisão constante de especialistas durante a safra. Além disso, o trabalho deve ser feito no decorrer de toda uma safra, avaliando-se desde o fermento de partida.

3.3 Técnicas para avaliação da viabilidade de leveduras no processo fermentativo

3.3.1 Contagem direta ao microscópio

Não existe um método absoluto para determinação da viabilidade celular de uma população de células de levedura. Para estimar a proporção de células viáveis em uma cultura ou processo fermentativo, métodos baseados no plaqueamento ou observação microscópica têm sido utilizados. Os métodos de contagem direta são rápidos e simples, exigem um mínimo de equipamento, permitindo que seja observada, simultaneamente, a morfologia celular.

Tal aspecto é extremamente importante porque a tolerância da levedura ao seu produto de fermentação, o etanol, é bastante significativa em relação à eficiência de produção de álcool em fermentações em escala industrial. Tem sido verificado também que a presença de álcoois superiores (n-butanol, isoamílico), ácidos graxos e seus ésteres, mesmo em baixas concentrações, juntamente com o etanol, agem de maneira sinérgica intoxicando a célula da levedura, levando-a à morte e conseqüentemente diminuindo a viabilidade celular.

No controle da viabilidade celular nos processos de produção de levedura (fermento prensado) e fermentação alcoólica (álcool), a coloração das células da levedura com azul de metileno ou eritrosina tem sido extensivamente empregada, pela facilidade e rapidez de análise.

A técnica de coloração com azul de metileno (LEE, ROBINSON & WONG, 1981) consiste em misturar partes iguais da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e da solução corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) irão se apresentar coloridas de azul (Figura 11). A porcentagem ou o número de células viáveis é determinado transferindo-se a amostra com o auxílio de uma pipeta para a câmara de Neubauer. Trata-se de uma lâmina especial, precisamente dividida em quadrados de 1 mm² de área (Figura 12); a lâmina é coberta com uma lamínula, que deixa um volume, sobre cada quadrado, de 10⁻⁴ cm³ ou 0,1 mm³ (equivalente a 0,0001 mL ou 10⁻⁴ mL).

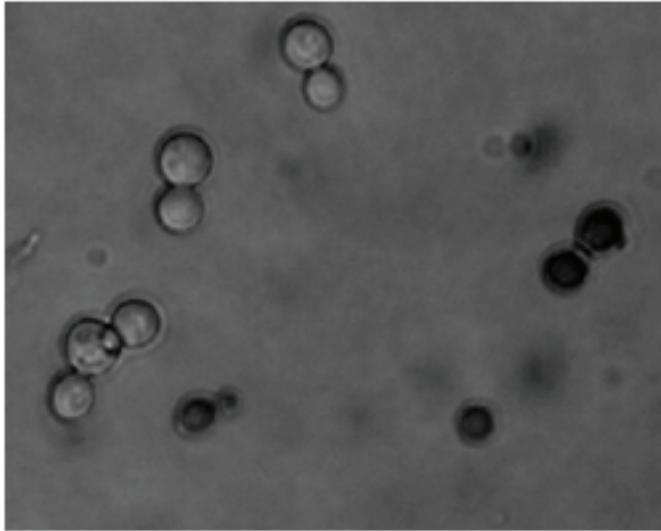


Figura 11 Determinação da viabilidade celular de leveduras com azul de metileno. As células coradas de azul (escuras na foto) são células mortas, enquanto as incolores são células viáveis (aumento de 400X).

3.3.1.1 Procedimento analítico

1. Homogeneizar a amostra em agitador de tubos. Se estiver floculada, adicionar papaína (5 mg) e deixar em repouso por 5 minutos.
2. Fazer a diluição conveniente em um tubo de ensaio com água destilada.
3. Após a diluição, transferir 1 mL para um tubo de ensaio e adicionar 1 mL da solução de azul de metileno-citrato de sódio. Aguardar 5 minutos.
4. Homogeneizar a mistura em agitador de tubos.

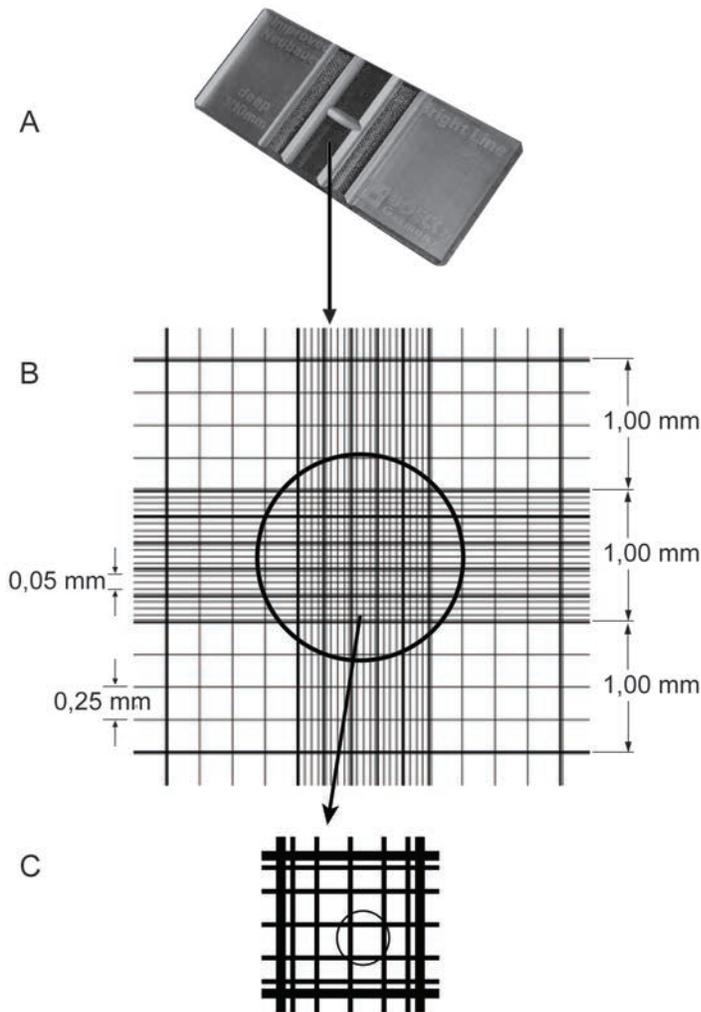


Figura 12 A. Câmara de Neubauer. **B.** O círculo indica a área aproximada coberta pelo aumento de 100 vezes ao microscópio (10X ocular e 10X objetiva) de uma câmara de contagem padrão. **C.** Aspecto de um quadrículo integrante do quadrado médio, como visto no aumento de 400X ao microscópio. O círculo indica um retículo.

5. Colocar a lamínula na Câmara de Neubauer e com auxílio da pipeta Pasteur transferir um pequeno volume da amostra preparada com corante.
6. Levar ao microscópio óptico e com a objetiva de 40X fazer a contagem das células nos quadrículos de uma das seguintes formas: 5 quadrículos na segunda coluna e 5 quadrículos na quarta coluna (total de 10 quadrículos); ou os 4 retículos centrais em cada um dos 25 quadrículos (total de 100 retículos); ou 5 quadrículos, sendo um de cada canto e um central. Escolher 2 limites em cada quadrículo nos quais serão desprezadas as células que forem encontradas em cima desses limites. Por exemplo, contar as células que estão nos limites superior e lateral esquerdo do quadrículo e desprezar as do limite inferior e lateral direito.

7. Anotar o número de células viáveis (células que não se colorem com azul de metileno), de células não viáveis (células coloridas de azul intenso) e de células viáveis em brotamento.
8. A viabilidade celular indica a porcentagem de células em atividade na população de leveduras da amostra considerada e pode ser assim calculada:

Viabilidade (%) = (Número de células vivas/Número de células vivas + células não viáveis) × 100.

9. A contagem de células em brotamento indica a porcentagem de leveduras em atividade que estão se multiplicando, e é assim calculada:

Brotamento (%) = (Total de células viáveis em brotamento/Total de células viáveis) × 100

10. A população de leveduras da amostra considerada é calculada da seguinte forma:

Número de células viáveis/mL = (Total de células viáveis × 4000/Total de retículos contados) × 1000 × Diluição

ou

Número de células viáveis/mL = (Total de células viáveis nos 10 quadrículos) × 2,5 × Diluição × 10⁴

ou

Número de células viáveis/mL = (Total de células viáveis nos 5 quadrículos/5) × 25 × Diluição × 10⁴

Observações:

- não pode haver formação de bolhas na câmara de Neubauer sob a lamínula após a colocação da amostra;
- a diluição é realizada para que o número de células seja adequado para a faixa de maior precisão da metodologia, ou seja, devem ser contadas

entre 300 e 500 células por câmara e não menos que 80 retículos. A diluição da amostra deve ser tal que se conte ao redor de 60 células por quadrículo ou 3 células por retículo;

- considerar a diluição da amostra com o corante, ou seja, um fator de diluição 2 (1 parte da amostra:1 parte do corante) nos cálculos. Esse fator deve ser multiplicado pelo fator de diluição da amostra inicialmente em água destilada. Exemplo: uma diluição na proporção de 1 mL da amostra para 9 mL de água destilada (fator 10) X diluição da amostra com corante (fator 2) β diluição total: 20.

3.3.2 Diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura

Os métodos de contagem de colônias em placas baseiam-se no princípio de que cada colônia surgida é considerada originária de uma única célula viável. O número de células viáveis presentes em uma suspensão é genericamente chamado de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), ou *Colony Forming Units* (CFU).

A quantificação de UFC necessariamente envolve o preparo, com toda a assepsia, de uma suspensão de células, que a seguir sofre diluições em série, e uma alíquota de cada diluição é semeada em placa. Após a incubação, conta-se o número de colônias, sempre assumindo ser cada colônia originária de uma única célula (Figura 13).

A semeadura em placas ou plaqueamento revela o número de células de leveduras capazes de se multiplicar e formar colônias em meios de cultivo apropriados e sob condições de incubação adequadas. Para maior precisão da análise, somente deverão ser contadas as placas com número de colônias entre 30 e 300; uma diluição da amostra deverá ser feita antes de proceder à sua mistura com o meio de cultura.

A vantagem da contagem padrão em placa é que somente células viáveis são contadas, permitindo o isolamento das colônias, as quais podem ser subcultivadas em culturas puras, facilitando o estudo e a identificação. No entanto, algumas desvantagens são apresentadas, como: não existir um meio que permita o crescimento de todos os microrganismos; é necessária a incubação apropriada para permitir o desenvolvimento das colônias; usa-se muita vidraria e é relativamente trabalhoso; além da necessidade de muita manipulação, o que pode originar contagens errôneas devido a erros de diluição e/ou plaqueamento.

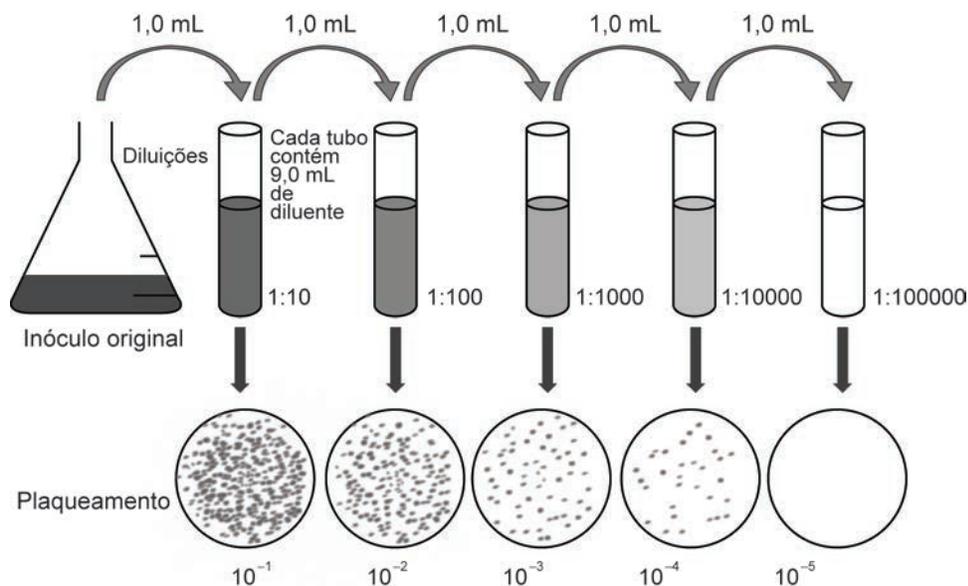


Figura 13 Esquema do procedimento da diluição seriada e plaqueamento.

Fonte: adaptada de Madigan, Martinko & Parker (2004).

Meios seletivos têm sido desenvolvidos com o objetivo de selecionar e diferenciar leveduras de processos fermentativos. Entre eles, o meio *Wallerstein Laboratory Nutrient Medium* (WLN) contém um indicador de pH, o verde de bromocresol, que colore diferencialmente as colônias como resultado dos graus variáveis de afinidade entre os microrganismos e o corante. Oliveira & Pagnocca (1988) e Castro (1995) utilizaram o WLN para avaliação da diversidade de leveduras em usinas de açúcar e álcool. No entanto, esse meio, por não ser seletivo, permite o desenvolvimento de qualquer espécie de levedura.

A diferenciação entre a levedura alcoólica (inoculada no processo) e a levedura contaminante (selvagem) não é muito fácil, e a presença desta pode ser detectada utilizando-se meios seletivos, isto é, o meio empregado deve permitir somente o desenvolvimento da levedura contaminante. Entretanto, um único meio não é totalmente satisfatório para a avaliação de todas as leveduras presentes, sendo, portanto, necessário o emprego de vários tipos de testes quando se pretende detectar, se não todas, a maioria das leveduras contaminantes presentes.

Os meios seletivos para isolamento e quantificação de populações de leveduras contaminantes baseiam-se em características fisiológicas comuns às leveduras selvagens, mas ausentes em linhagens utilizadas em processos fermentativos para a produção de álcool. Dentre essas características, destacam-se as nutricionais (variações nas fontes de carbono, nitrogênio e nos fatores essenciais de crescimento) e a resistência a certos compostos como antibióticos, corantes, etc.

Vários são os meios propostos para a detecção de leveduras contaminantes, *Saccharomyces* ou não *Saccharomyces*. Entretanto, todos apresentam variações, o que demonstra que, para conhecer melhor a presença de leveduras contaminantes durante o decorrer de uma safra, o uso de um só meio diferencial não será suficiente, principalmente quando se trata de leveduras contaminantes pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

Linhagens de *Saccharomyces* não pertencentes à espécie *cerevisiae* são detectadas em meios com cristal violeta em suas formulações, como o *Lin Wild Yeast Medium* (LWYM). Para diferenciar leveduras não *Saccharomyces*, o meio Ágar Lisina é amplamente usado em processos fermentativos, por conter lisina como única fonte de nitrogênio, o que impede o crescimento da maioria das espécies de *Saccharomyces*, pois esta não consegue assimilar lisina como fonte de nitrogênio.

O meio WLD (WLN + actidione) é também indicado para detecção de leveduras selvagens não *Saccharomyces*, uma vez que essa espécie é sensível a concentrações de actidione (ou cicloheximida), um antifúngico.

A Tabela 1 e a Figura 14 mostram os meios de cultura de contagem geral e seletivos utilizados no isolamento e contagem de leveduras da fermentação alcoólica.

Em trabalho realizado por Ceccato-Antonini & Silva (2000), concluiu-se que os meios acima citados foram eficientes no isolamento de leveduras selvagens, embora o meio de Lisina tenha propiciado o isolamento de *Saccharomyces*. A contagem de colônias no meio LWYM mostrou-se difícil, devido ao grande número de microcolônias desenvolvidas, possivelmente resistentes à concentração de cristal violeta utilizada.

Tabela 1 Eficiência dos meios de cultura diferenciais/seletivos no isolamento de leveduras da fermentação alcoólica.

| Meios | <i>S. cerevisiae</i> | Outras <i>Saccharomyces</i> | Não <i>Saccharomyces</i> |
|-------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| WLN | (+) | (+) | (+) |
| WLD | (-) | (-) | (+) |
| LWYM | (-) | (+) | (+) |
| Ágar Lisina | (-) | (-) | (+) |

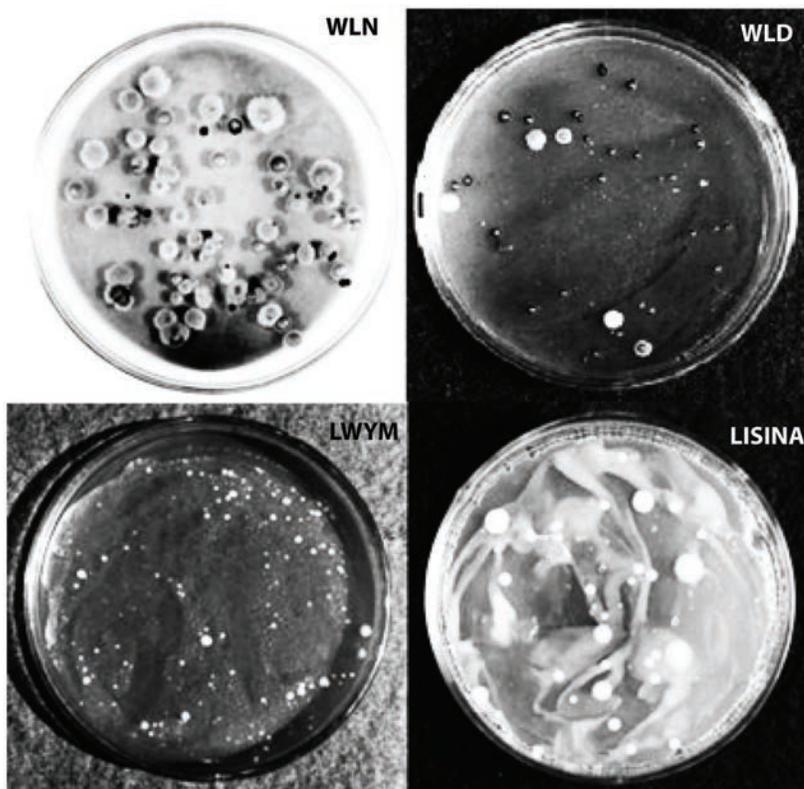


Figura 14 Fotos das placas inoculadas com amostra de fermento nos meios seletivos (WLD, Ágar Lisina e LWYM, sem diluição) e de contagem geral (WLN, diluição 10^{-10}).

Tosta & Ceccato-Antonini (2005) analisaram a eficiência dos meios seletivos Ágar Lisina, LWYM e WLD no isolamento de leveduras selvagens por meio de testes de taxonomia clássica e de biologia molecular (PCR). Linhagens isoladas de vinho e fermento a partir dos meios seletivos pertenceram exclusivamente a gêneros não *Saccharomyces*, com bandas de DNA da região ITS entre 420 e 550 bp. Linhagens de *S. cerevisiae* isoladas exclusivamente de WLN apresentaram ITS acima de 800 bp, característico desta e das demais espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Os meios seletivos testados permitiram a distinção entre linhagens selvagens e do processo.

3.3.2.1 Procedimento analítico

1. Centrifugar 10 mL da amostra a 4000 rpm por 5 minutos.
2. Descartar o sobrenadante, acrescentar água destilada ou solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), homogeneizar e centrifugar novamente sob as mesmas condições.
3. Ressuspender as células até 10 mL com água ou solução salina esterilizada.

4. Transferir 1 mL da amostra centrifugada para um tubo de cultura com 9 mL de água ou solução salina esterilizada (diluição 1:10 ou 10^{-1}).
5. Homogeneizar em agitador de tubos.
6. Pipetar 1 mL da diluição anterior para outro tubo com 9 mL de água ou solução salina esterilizada e será obtida uma diluição 1:100 ou 10^{-2} . Diluições maiores podem ser obtidas tomando-se 1 mL de cada diluição sucessiva e colocando em tubos com 9 mL de água ou solução salina, até se atingir a diluição desejada.
7. Fazer a semeadura em placas de Petri, pipetando 1 mL e adicionando o meio de cultivo adequado liquefeito e resfriado a uma temperatura de 45-46 °C. Agitar a placa com movimentos horizontais para distribuir as células com uniformidade (plaqueamento em profundidade ou também chamado *pour plate*). Semear no mínimo 2 placas para cada uma das 3 diluições escolhidas.
8. Como alternativa pode-se inicialmente colocar o meio de cultura nas placas de Petri, esperar a solidificação e, a seguir, pipetar 0,1 mL espalhando o inóculo com a alça de Drigalsky (plaqueamento em superfície). A Figura 15 mostra a metodologia utilizada para contagem em placas, comparando as técnicas de plaqueamento em superfície e em profundidade (*pour plate*).
9. Incubar a 30-32 °C por 48-72 horas.
10. Fazer a contagem de cada placa e para estimar o número de colônias, escolher as placas que apresentem de 30 a 300 colônias. A contagem de leveduras é assim calculada:

Plaqueamento em profundidade:

$$N^{\circ} \text{ UFC leveduras/mL} = \text{Média das duas placas/diluição}$$

Plaqueamento em superfície:

$$N^{\circ} \text{ UFC leveduras/mL} = (\text{Média das duas placas/diluição}) \beta 10$$

A Tabela 2 traz as regras para interpretar e reportar a contagem em placas.

Observações:

- a escolha das diluições a serem plaqueadas depende da amostra considerada e do número de leveduras que esta contém. De forma geral, para amostras do vinho, utilizam-se as seguintes diluições para cada meio: WLN, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} ; WLD, Lisina e LWYM, direto (sem diluição), 10^{-1} e 10^{-2} . Para amostras de caldo ou mosto, usar as mesmas diluições para WLD, Lisina e LWYM, mas para WLN, plaquear as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Para amostras do fermento, utilizar as diluições de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} para WLN, e as mesmas diluições acima para os meios seletivos;
- a centrifugação da amostra antes da diluição seriada é extremamente importante devido aos meios seletivos, pois há necessidade de lavagem das células para retirada de resíduos da amostra que possam interferir no crescimento das leveduras, levando a resultados errôneos;
- é comum o crescimento de colônias bem pequenas, em grande quantidade, nas placas com Ágar Lisina, constituídas de células de *S. cerevisiae* que conseguiram crescer pela existência de reservas celulares ou de traços de impurezas no meio de cultura, uma vez que não conseguem assimilar a lisina presente no meio como única fonte de nitrogênio.

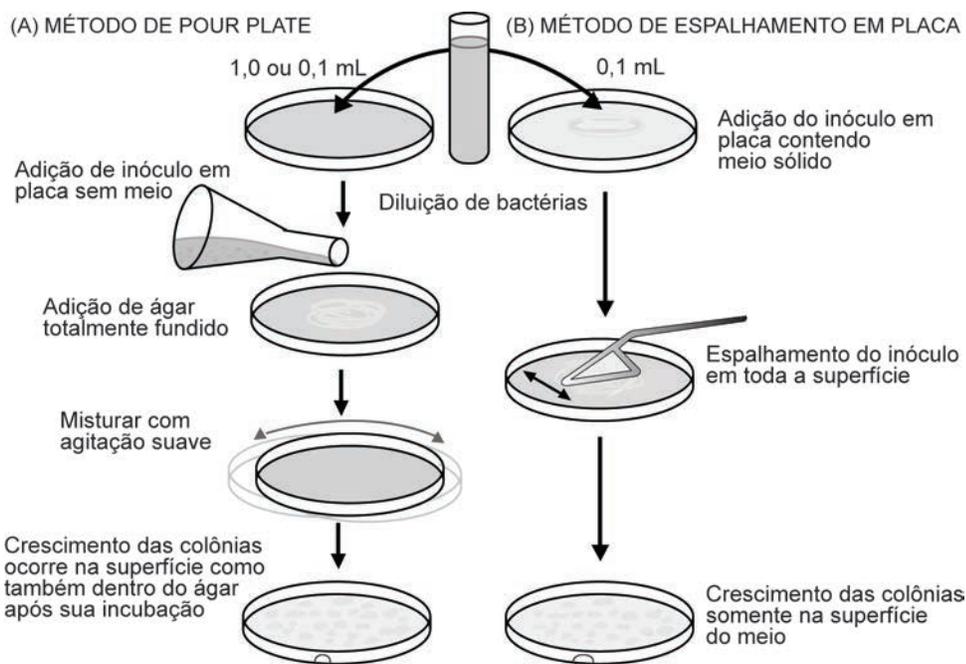


Figura 15 Métodos de plaqueamento em superfície e *pour plate*.

Fonte: adaptada de Tortora, Funke & Case (2003).

Tabela 2 Normas para interpretar e reportar a contagem em placas.

| Interpretação | Exemplo | Cálculo | Reporte |
|---|--|--|---|
| 1. Duas placas da mesma diluição apresentam entre 30 e 300 colônias. | Diluição 10^{-2} Placa 1 = 180 Placa 2 = 140 | Média aritmética $X = 160$ | Contagem <i>standard</i> em placa: $16 \beta 10^3$ |
| 2. Em uma mesma diluição, uma placa apresenta entre 30 e 300 colônias e a outra < 30 ou > 300. Contar as duas placas. | Diluição 10^{-2} Placa 1 = 70 Placa 2 = 26 | Média aritmética $X = 48$ | Contagem <i>standard</i> em placa: $48 \beta 10^2$ |
| 3. As placas de 2 diluições consecutivas apresentam entre 30 e 300 colônias. Contar as 4 placas. | a) $X \text{ Dil. } 10^{-3} = 35$ $X \text{ Dil. } 10^{-2} = 250$ | Relação $10^{-3}/10^{-2}$ $35000/25000 =$ se < que 2, tomar a média | Contagem <i>standard</i> em placa: $30 \beta 10^3$ |
| | b) $X \text{ Dil. } 10^{-3} = 38$ $X \text{ Dil. } 10^{-2} = 150$ | Relação $10^{-3}/10^{-2}$ $38000/15000 =$ se > que 2, tomar o número maior | Contagem <i>standard</i> em placa: $15 \beta 10^3$ |
| 4. Não tem colônias nas placas da suspensão mais concentrada. | Diluição 10^{-1} Placa 1 = < 1 Placa 2 = < 1 | $X = < 1$ | Contagem estimada em placa: $< 1 \beta 10^1$ |
| 5. Duas placas da diluição mais alta apresentam mais de 300 colônias. Dividir as placas de forma radial (2, 4, 8) e contar o número de colônias por secção. | a) Diluição 10^{-3} Placa 1 = 180 em 1/4 Placa 2 = 160 em 1/4 | Média aritmética $180 \beta 4 = 720$ $160 \beta 4 = 640$ $X = 680$ | Contagem estimada em placa: $68 \beta 10^4$ |
| | b) mais de 200 em 1/8 | $> 200 \text{ em } 8 = 1600$ | Contagem estimada em placa: $> 16 \beta 10^5$ |
| 6. Presença de colônias disseminadas em uma área menor que a metade da placa. Contar a outra metade. | Diluição 10^{-2} Placa 1 (metade) = $60 \beta 2$ Placa 2 = 180 | Média aritmética $X = 150$ | Presença de colônias disseminadas: $15 \beta 10^3$ |

3.4 Técnicas para avaliação da viabilidade de bactérias no processo fermentativo

3.4.1 Contagem direta ao microscópio

A contagem direta ao microscópio de bactérias tem sua maior aplicabilidade para quantificação de bastonetes em amostras de caldo primário e misto e vinho. Para caldo clarificado e mosto em que a população normalmente é inferior a 10^4 – 10^5 bastonetes/mL, essa técnica apresenta menor precisão. Maior precisão e reprodutibilidade são conseguidas quando o número de bastonetes/mL da amostra está entre 10^6 – 10^7 . Deve-se diluir convenientemente a amostra para que não mais que 3 a 5 bastonetes sejam encontrados por campo de microscópio.

Realiza-se a coloração das células bacterianas com azul de Nilo + azul de metileno, de forma que as células viáveis aparecerão incolores enquanto as não viáveis estarão coloridas de azul (FERMENTEC, 200-?)

3.4.1.1 Procedimento analítico

1. Para amostras de caldo primário ou misto, inicialmente realizar a homogeneização.
2. Se necessário, filtrar a amostra em algodão para eliminar as impurezas sólidas em suspensão.
3. Diluir a amostra com água destilada (a diluição é realizada para que o número de células bacterianas não seja maior que 3 a 5 por campo de microscópio) se necessário.
4. Transferir 1 mL de amostra filtrada e diluída para um tubo de ensaio.
5. Transferir 1 mL da solução corante (azul de Nilo + azul de metileno) para o tubo de ensaio que contém 1 mL da amostra filtrada.
6. Homogeneizar em agitador para tubos.
7. Transferir 2 μ L (lamínula de 20 \times 20 mm), ou 3 μ L (lamínula de 22 \times 22 mm), ou 4 μ L (lamínula de 24 \times 24 mm) da amostra corada para uma lâmina de vidro.
8. Colocar a lamínula sobre a preparação, tomando o cuidado para não formar bolhas.
9. Realizar a contagem de bastonetes não corados presentes em 70 campos, uniformemente distribuídos em toda a área da lamínula, utilizando a objetiva de imersão (100X).

10. Se for amostra de vinho bruto que apresente floculação, é necessário acrescentar papaína na amostra. Deixar em repouso por 5 minutos antes de diluir.

11. O número de bastonetes/mL pode ser assim calculado:

$$N^{\circ} \text{ bastonetes/mL} = FM_{\beta} (1/\text{volume amostra})_{\beta} M_{\beta} D$$

FM = fator do microscópio (dependerá do tipo de microscópio utilizado na contagem, pois para microscópios policromáticos é 15.000, enquanto para monocromáticos é 20.000).

M = número total de bastonetes não corados/número de campos contados.

D = diluição final (considerar a diluição com o corante, de 2X, a qual deve ser multiplicada pelo fator de diluição em água destilada).

3.4.2 Diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura

Para evitar erros de contagem de bactérias, recomenda-se o uso de meios de culturas pobres em carboidratos, para que não ocorra grande produção de cápsula e eventual aderência de células umas às outras. Um dos meios mais utilizados para cultivo de bactérias é o Ágar Nutriente, constituído por peptona, extrato de carne e ágar. Essa formulação simples fornece os nutrientes necessários para o cultivo de um grande número de bactérias que não sejam muito exigentes. O extrato de carne possui substâncias solúveis em água, incluindo carboidratos, vitaminas, compostos orgânicos de nitrogênio e sais. As peptonas são a principal fonte de nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos de cadeia longa), e o ágar é o agente de solidificação.

Outro meio muito utilizado para o cultivo de bactérias é o Ágar Padrão de Contagem (*Plate Count Agar*), constituído de triptona, vitaminas do extrato de levedura e glicose, o qual favorece o crescimento da maioria das bactérias.

3.4.2.1 Procedimento analítico

Proceder como descrito no item 1.4.1.1, porém não há necessidade de centrifugar a amostra inicialmente. As diluições podem ser feitas diretamente a partir da amostra.

Os meios de cultura utilizados são o Ágar Padrão de Contagem ou o Ágar Nutriente, em diluições que variam de 10^{-2} a 10^{-7} , dependendo da amostra (caldo primário, misto, mosto, vinho, fermento, etc.).

3.5 Coloração de Gram

A coloração de Gram é um método muito utilizado na identificação de bactérias. É um método de coloração diferencial que utiliza um corante primário (cristal violeta) e um contracorante (safranina). Após o uso do cristal violeta, segue-se com a aplicação de uma solução de lugol, a qual é chamada de mordente, pois combina com o corante para formar um composto colorido insolúvel. Após a descolorização com álcool, aplica-se o contracorante safranina.

Os organismos que resistem à descolorização e retêm o complexo cristal violeta apresentam cor púrpura e são chamados Gram-positivas. Aquelas células que descolorizam e perdem o complexo cristal violeta-iodo aceitam o corante safranina e ficam vermelhas. São as Gram-negativas.

O esquema do procedimento de coloração de Gram encontra-se na Figura 16.

A maioria das células vivas, incluindo tecidos animais, é Gram-negativa. É a característica Gram-positiva que é distintiva. Algumas bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos são Gram-positivos.

A coloração de Gram não é executada rotineiramente, mas sim quando são detectados problemas de contaminação. Além da determinação da coloração de Gram, essa técnica permite também que se avalie a morfologia das células (coco, bastonete, presença de esporos, etc.) com maior facilidade.

3.5.1 Procedimento

1. Colocar uma gota de água sobre uma lâmina de vidro, previamente limpa com álcool para desengordurar.
2. Com a alça de platina, retirar assepticamente uma pequena porção da cultura de bactéria isolada e emulsioná-la na gota, a fim de obter uma suspensão uniforme. Espalhar suficientemente para obter um esfregaço fino. Não esquecer de anotar na lâmina a procedência do esfregaço.
3. Secar a preparação ao ar ou na chama do bico de gás.
4. Fixar o esfregaço, passando a lâmina três vezes diretamente na chama.
5. Antes de corar, deixar que a lâmina esfrie completamente.
6. Para a coloração, cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta. Aguardar 1 minuto.
7. Lavar cuidadosamente o excesso de corante com água destilada.

8. Cobrir o esfregaço com solução de lugol. Aguardar 1 minuto.
9. Remover o corante, lavando a lâmina com água fria.
10. Descolorir com etanol absoluto durante 10 segundos.
11. Lavar cuidadosamente com água fria.
12. Cobrir o esfregaço com solução de safranina. Aguardar 1 minuto.
13. Remover o excesso de corante com água fria.
14. Aguardar a preparação secar em temperatura ambiente, ou secar cuidadosamente (sem esfregar) a lâmina entre duas folhas de papel absorvente.
15. Examinar ao microscópio óptico utilizando a objetiva para imersão (100X), pingando uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina, sem colocar a lamínula.
16. Verificar a coloração das bactérias, se azul-violeta (Gram-positivas) ou vermelho (Gram-negativas).

Observações:

- deve-se utilizar culturas de bactérias com 18 a 24 horas de cultivo, pois as células jovens têm maior afinidade para os corantes do que as células velhas;
- dependendo do estágio de desenvolvimento, as bactérias podem apresentar reação de Gram variável.



Figura 16 Procedimento para coloração de Gram. As fotos foram tiradas em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

3.6 Teste de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos

A finalidade desse teste é determinar a mais baixa concentração do agente antimicrobiano (concentração inibitória mínima ou CIM) que, sob condições definidas, inibe o crescimento da bactéria a ser investigada. Os valores de CIM são usados para determinar a suscetibilidade da bactéria às drogas e também para avaliar a atividade de novos agentes antimicrobianos. O teste pode ser realizado em meio sólido, onde diferentes concentrações da substância antimicrobiana

são incorporadas no meio de cultivo, seguindo-se a aplicação de um número padrão de células na superfície do meio de cultura. Em meio líquido, as bactérias são inoculadas no caldo de crescimento na presença de concentrações diferentes do agente antimicrobiano. O crescimento é determinado após incubação por um determinado período de tempo (16-20 horas) e o valor da CIM é verificado.

A ação dos antimicrobianos pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica da densidade óptica (absorbância) de uma suspensão microbiana inoculada com ou sem o produto em teste. Quanto maior o desenvolvimento bacteriano, maior será a turbidez do meio e conseqüentemente maior será a leitura da absorbância. Assim sendo, quanto maior for o efeito antimicrobiano do produto testado, menor será a turbidez e menor a leitura de absorbância.

Alternativamente, essa avaliação pode ser feita por meio da variação da acidez do meio onde se desenvolvem os contaminantes. Esse método baseia-se no fato de que as bactérias contaminantes normalmente produzem ácidos, que causam decréscimo no valor do pH. Assim, o tratamento que apresentar a menor variação de acidez corresponde ao antimicrobiano mais recomendado para ser utilizado na fermentação (FERMENTEC, 200-?).

O teste pode ser realizado diretamente a partir da amostra do vinho, caldo ou mosto, ou ainda a partir das culturas isoladas das bactérias.

3.6.1 Procedimento analítico

3.6.1.1 Preparo do inóculo

1. Coletar uma amostra de vinho bruto (dornas em final de fermentação) e homogeneizar.
2. Transferir 5 mL da amostra para tubo de cultivo e adicionar papaína (aproximadamente 5 mg).
3. Homogeneizar em agitador de tubos e aguardar 5 minutos.
4. Transferir 1 mL da amostra para tubo de ensaio contendo 15 mL de meio de cultivo esterilizado.
5. Transferir 0,15 mL da solução estoque de actidione e incubar o tubo a 35 °C por aproximadamente 12 horas.
6. Adicionar papaína e homogeneizar em agitador de tubos.

3.6.1.2 Realização do teste

1. Transferir com pipeta 0,15 mL da solução estoque de actidione para cada tubo com 15 mL do meio de cultivo esterilizado.
2. Transferir o volume necessário de antimicrobiano a ser testado para atingir a concentração desejada.
3. Transferir 0,15 mL do inóculo preparado e homogeneizar em agitador de tubos.
4. Retirar uma amostra assepticamente de cada tubo e fazer a leitura (inicial) da absorbância da amostra testemunha (sem adição do antimicrobiano, colocando o mesmo volume em água destilada) e dos tratamentos (nas várias concentrações do antimicrobiano) no espectrofotômetro a 540 nm logo após a homogeneização.
5. Transferir os tubos com as amostras testemunha e tratamentos para estufa a 35 °C por 6 horas. Os tubos devem ser tamponados com algodão.
6. Retirar os tubos da estufa e homogeneizar em agitador de tubos.
7. Fazer a leitura (final) da absorbância nos tubos testemunha e tratamentos logo após a homogeneização.
8. A eficiência do produto testado por essa metodologia pode ser avaliada pela variação na absorbância (ΔABS) da seguinte forma:

$$\Delta ABS = (ABS \text{ final} - ABS \text{ inicial}) \times 100$$

Quanto menor for a variação da absorbância, mais eficiente será o produto no controle da microbiota bacteriana presente na amostra testada.

9. A eficiência pode ser também avaliada construindo-se um gráfico, como ilustrado na Figura 17. No eixo das abscissas (X), devem ser colocadas as concentrações utilizadas do antimicrobiano, e no eixo das ordenadas (Y), os valores de absorbância (absorbância final – absorbância inicial) relativos a cada concentração do antimicrobiano. A concentração mínima inibitória (CIM) é a menor concentração que inibe completamente o crescimento da bactéria ou que mantém a população em nível constante.

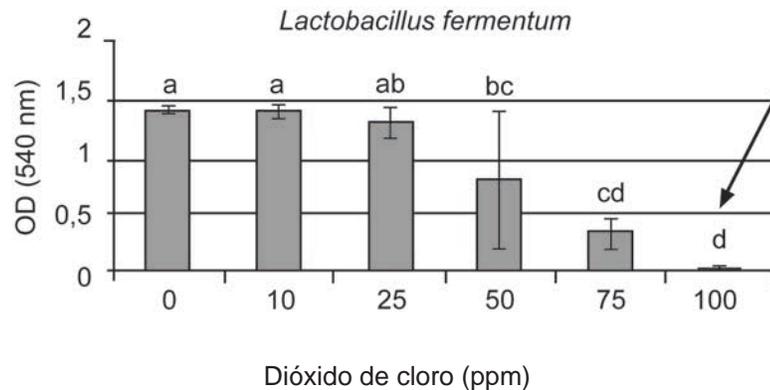


Figura 17 Valores de absorvância (OD) a 540 nm da cultura de *Lactobacillus fermentum* (meio MRS, 37 °C, 24 horas) em várias concentrações de dióxido de cloro. A seta indica a concentração mínima inibitória do antimicrobiano para essa bactéria.

Fonte: adaptada de Meneghin et al. (2008).

Observações:

- se o teste for realizado com culturas puras de bactérias, isoladas das dornas de fermentação, há necessidade de realizar o crescimento da mesma no meio de cultura (inóculo) e transferir cerca de 10% (vol/vol) nos frascos contendo o meio + antimicrobianos. Não há necessidade de acrescentar papaína e actidione, pois esses produtos são utilizados para desflocular a amostra e inibir o desenvolvimento das leveduras do processo, respectivamente;
- é recomendável utilizar três repetições para cada tratamento e trabalhar com as médias para cada tratamento e testemunha;
- o espectrofotômetro deve ser calibrado para zero de absorvância com o meio de cultura utilizado, sem inóculo e antimicrobianos;
- a cubeta do espectrofotômetro deve ser lavada com a própria amostra a ser lida, para evitar efeito de diluição quando se utiliza a lavagem com água destilada;
- há vários meios de cultura que podem ser utilizados, como o Caldo Nutriente, GLT e MRS (este último para bactérias lácticas).

3.7 Composição dos meios de cultura e soluções

- Solução de azul de metileno + citrato de sódio

Pesar 0,01 g de azul de metileno, dissolver em uma pequena quantidade de água destilada esterilizada, adicionar 2 g de citrato de sódio, homogeneizar e

completar o volume para 1000 mL com água destilada esterilizada. Armazenar em um frasco limpo e escuro, de preferência.

- Solução salina

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio, dissolver em água destilada, completar o volume para 1 litro, dispensar em tubos ou frascos e esterilizar a 120 °C, 1 atm, por 15 minutos.

- Solução de azul de Nilo + azul de metileno

Solução A: sulfato azul de Nilo 2% – pesar 2 g de sulfato azul de Nilo e dissolver em 100 mL de água destilada esterilizada.

Solução B: azul de metileno 0,2% – pesar 0,2 g de azul de metileno e dissolver em 100 mL de água destilada esterilizada.

Solução de trabalho: misturar partes iguais das soluções A e B, deixar em repouso por 24 horas e filtrar em papel de filtro. Essa solução pode ser armazenada por 12 meses em frasco fechado, mas caso seja detectada contaminação microbiana, ela deve ser imediatamente descartada.

- Solução de cristal violeta

Solução A: pesar 2 g de cristal violeta e acrescentar 20 mL de álcool 95%.

Solução B: pesar 0,8 g de oxalato de amônio e dissolver em 80 mL de água destilada esterilizada.

Misturar as duas soluções e armazenar em frasco escuro e limpo.

- Solução de lugol

Dissolver 2 g de iodeto de potássio em uma pequena porção de água esterilizada, adicionar 1 g de iodo e completar o volume para 300 mL de água destilada esterilizada. Armazenar em frasco limpo e escuro.

- Solução de safranina

Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool 95%. Diluir 10 mL dessa solução para 100 mL de água destilada esterilizada. Armazenar em frasco limpo e escuro.

- Solução de actidione (cicloheximida)

Pesar 0,1 g de actidione, transferir para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em uma porção de água destilada esterilizada e completar o volume para 100 mL com água destilada esterilizada. Conservar em geladeira por um prazo máximo de 30 dias.

- Solução estoque do antimicrobiano

Pesar 0,01 g do antimicrobiano, transferir para um balão volumétrico de 100 mL, acrescentar algumas gotas de álcool para solubilizar, se necessário (verificar as recomendações do fabricante para a solubilização do produto), dissolver com água destilada esterilizada e completar o volume para 100 mL. A solução deve ser preparada no dia em que será realizado o teste ou no máximo um dia antes e armazenar sob refrigeração. Após o uso, descartar a solução. Essa solução estoque tem a concentração de 100 ppm.

Para se testar a dosagem de 3 ppm, por exemplo, é necessário transferir 0,45 mL da solução estoque do antimicrobiano para cada tubo contendo 15 mL do meio de cultivo.

- Meio de cultivo GLT

Pesar 2,5 g de extrato de levedura, 5 g de triptona, 1 g de dextrose (glicose), dissolver totalmente e completar para 1000 mL de água destilada. Transferir 15 mL para tubos de ensaio e tampar com algodão. Esterilizar os tubos na autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos. Para preparar o meio para plaqueamento, acrescentar 20 g de ágar para 1 litro de meio antes da esterilização.

- Meio Caldo Nutriente ou Ágar Nutriente

Pesar 5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 1 g de cloreto de sódio, dissolver totalmente e completar para 1000 mL de água destilada. Transferir 15 mL para tubos de ensaio e tampar com algodão. Esterilizar os tubos na autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos. Para preparar o meio Ágar Nutriente para plaqueamento, acrescentar 20 g de ágar para 1 litro de meio antes da esterilização.

- Meio MRS

Pesar 10 g de peptona, 10 g de extrato de carne, 5 g de extrato de levedura, 20 g de glicose, 1 mL de Tween 80, 2 g de fosfato monoácido de potássio, 5 g de acetato de sódio, 2 g de citrato de diamônio, 0,2 g de sulfato de magnésio, 50 mg de sulfato de manganês, dissolver totalmente, adicionar 20 g de ágar e completar o volume para 1000 mL. Esterilizar na autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos.

- Meio Ágar Padrão de Contagem

Pesar 5 g de peptona de caseína, 2,5 g de extrato de levedura, 1 g de glicose, dissolver totalmente, acrescentar 20 g de ágar e completar o volume para 1000 mL. Esterilizar na autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos.

- Meio WLN (*Wallerstein Laboratory Nutrient Medium*), de acordo com Green & Gray (1950), modificado por Oliveira & Pagnocca (1988).

Pesar 4 g de extrato de levedura, 5 g de caseína hidrolisada, 50 g de glicose, 0,55 g de fosfato monopotássico*, 0,425 g de cloreto de potássio*, 0,125 g de cloreto de cálcio di-hidratado*, 0,125 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado*, 2,5 g de cloreto férrico hexa-hidratado*, 2,5 g de sulfato de manganês tetra-hidratado*, 22 mg de verde de bromocresol*, dissolver totalmente e completar para 1000 mL de água destilada. Acrescentar 20 g de ágar, os antibióticos ampicilina* e ácido nalidíxico* na concentração final de 5 ppm, e esterilizar na autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos.

Os reagentes indicados com * devem ser acrescentados na forma de soluções preparadas da seguinte forma:

- Solução de fosfato monopotássico – 5,5 g/100 mL, usar 10 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de cloreto férrico hexa-hidratado – 4,25 g/100 mL, usar 10 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de cloreto de cálcio di-hidratado – 1,25 g/100 mL, usar 10 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de sulfato de magnésio hepta-hidratado – 1,25 g/100 mL, usar 10 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de cloreto férrico hexa-hidratado – 0,5 g/200 mL, usar 1 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de sulfato de manganês tetra-hidratado – 0,5 g/200 mL, usar 1 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de verde de bromocresol – 0,2 g/100 mL, dissolver em 5 ml de álcool e completar para 100 mL com água. Usar 10 mL para 1000 mL de meio.
- Solução de ácido nalidíxico – triturar um comprimido de 500 mg de ácido nalidíxico farmacêutico em um almofariz. Dissolver em solução de NaOH 0,05 N, completando o volume para 100 mL. Guardar em geladeira. Usar 10 mL para cada 1000 mL de meio de forma a obter 50 ppm. A solução de ácido nalidíxico é autoclavável, podendo ser acrescentada ao meio antes da esterilização. A solução desse antibiótico pode ser adquirida pelo nome de *Wintomylom*, na concentração de 50 mg/mL. Utilizar 1 mL dessa solução para 1000 mL de meio de cultura.
- Solução de ampicilina – triturar um comprimido de 500 mg de ampicilina farmacêutica em um almofariz. Dissolver em água destilada, completando

o volume para 100 mL. Usar 10 mL para 1000 mL de meio, de forma a obter a concentração final de 50 ppm. Pode ser autoclavado.

Esse meio de cultura pode ser adquirido da Acumedia (*WL Nutrient Medium*, referência 7488 A), devendo somente serem acrescentados os antibióticos.

- Meio WLD, de acordo com Walters & Thiselton (1953), modificado por Morris & Eddy (1957).

Adicionar actidione na forma de solução, ao meio WLN, para uma concentração final de 5 ppm.

A solução de actidione deve ser assim preparada:

- Solução estoque – pesar 0,2 g e dissolver em 1 mL de acetona. Juntar 9 mL de água e esterilizar por filtração em membrana Millipore de porosidade 0,22 μ . Essa solução terá a concentração de 20 mg/mL. Guardar em geladeira.
- Solução de trabalho – transferir 5 mL da solução A para um frasco e adicionar 95 mL de água destilada estéril. A solução de trabalho terá a concentração de 1 mg/mL. Usar 5 mL para 1000 mL de meio já esterilizado e fundido. Guardar a solução em geladeira.
- Meio de Ágar Lisina, de acordo com Walters & Thiselton (1953), modificado por Morris & Eddy (1957).

Esse meio de cultura tem a seguinte composição: 11,7 g de *Yeast Carbon Base* (YCB), 1 g de lisina, 20 g de ágar, 50 mg de ampicilina e 50 mg de ácido nalidíxico; completar para 1000 mL de água destilada.

O preparo do meio deve ser feito da seguinte maneira:

- Solução de YCB concentrada 10 vezes – dissolver 11,7 g de YCB para 100 mL de água destilada morna. Esterilizar em membrana Millipore de porosidade 0,22 μ . Utilizar 100 mL para 1000 mL de meio.
- Preparo do meio sólido – dissolver 20 g de ágar e 1 g de lisina para 880 mL de água destilada em banho-maria. Adicionar 10 mL de solução de ampicilina e 10 mL de solução de ácido nalidíxico, como descrito anteriormente, autoclavando por 10 minutos a 1 atm e 121 °C. Após autoclavagem, adicionar assepticamente 100 mL da solução de YCB concentrada 10 vezes.
- Meio *Lin Wild Yeast Medium* (LWYM), de acordo com Lin (1975), modificado por Longley et al. (1978).

Pesar 2 g de extrato de malte, 4 g de extrato de levedura, 2 g de peptona, 10 g de glicose, 1 g de fosfato de potássio bibásico, 0,5 g de cloreto de amônio, 6 mg de cristal violeta*, 0,1 g da mistura fucsina-sulfito e dissolver completamente em 1000 mL de água destilada. Acrescentar 20 g de ágar e esterilizar na autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos. Antes de distribuir o meio de cultura nas placas, liquefazer, resfriar a 55 °C e acrescentar os antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico, na concentração final de 50 ppm cada, no meio de cultura.

O reagente indicado com * deve ser acrescentado na forma de solução preparada da seguinte forma: pesar 0,6 g de cristal violeta e dissolver em 100 mL de água destilada. Utilizar 1 mL dessa solução para 1000 mL de meio de cultura.

A mistura fucsina-sulfito é composta de 1 parte, em peso, de dextrina, 4 partes de fucsina básica e 25 partes de sulfito de sódio anidro.

3.8 Considerações finais

Segundo Amorim (2010), ao longo de 30 anos de Proálcool, o setor passou por períodos críticos de queda nos preços do álcool, crises políticas e liberalização do mercado. Para enfrentar esses desafios, houve necessidade de investimento em pesquisa, capacitação de recursos humanos e desenvolvimento de novas tecnologias. Para uma gestão eficaz, é fundamental que se faça um controle do processo industrial – analítico e microbiológico –, pois sem números e informações confiáveis, não há como avaliar adequadamente o desempenho do processo, o que prejudica o avanço da indústria.

As medições devem ser bem feitas, de forma a permitir a avaliação dos resultados das medidas adotadas, o retorno dos investimentos e, quando necessário, ajustar as condições do processo, em busca de qualidade e economia.

As técnicas microbiológicas descritas nesta unidade são essenciais para subsidiar a tomada de decisões na fábrica, exigindo, portanto, o treinamento de pessoal para executá-las. As técnicas moleculares, que serão discutidas na próxima unidade, possibilitam a identificação e discriminação de linhagens de *S. cerevisiae* e não *Saccharomyces* de forma inequívoca, porém é de alto custo para a indústria e, nesse sentido, a parceria entre universidade e empresa pode ajudar.

UNIDADE 4

Caracterização de leveduras por técnicas tradicionais e moleculares

4.1 Primeiras palavras

Durante a produção de etanol pode ocorrer a substituição da levedura do processo (*S. cerevisiae*) por leveduras selvagens, tanto de linhagens da própria espécie como de outras espécies. A identificação de leveduras é uma estratégia para monitorar essas substituições sequenciais de estirpes ao longo do processo, a fim de garantir qualidade e reprodutibilidade da fermentação. A identificação convencional de leveduras consiste em classificar leveduras por meio de suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Essa técnica pode ser eficiente em alguns casos, porém pode acarretar erros, pois leveduras das mesmas espécies possuem características semelhantes e não há discriminação intraespecífica. Devido a essa limitação, tem-se buscado técnicas cada vez mais precisas para a identificação de leveduras. As técnicas moleculares que utilizam a análise do material genético, apesar de demandarem equipamentos e reagentes caros para sua execução, têm se mostrado mais conclusivas na identificação intraespecífica, ou seja, de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. Nesta unidade, serão discutidos os principais métodos empregados, envolvendo as técnicas tradicionais e moleculares, essenciais para a identificação das leveduras em nível de espécie e para a caracterização das leveduras em nível de linhagens.

4.2 Problematizando o tema

A reprodução vegetativa de células de *S. cerevisiae* se dá por brotações multilaterais e sua fase vegetativa é predominantemente diploide. Essa levedura tem genoma relativamente pequeno, grande número de cromossomos, pequenas sequências de DNA repetitivo e poucos introns (DNA não codificante). Cepas haploides contêm aproximadamente 12-13 megabases de DNA nuclear, distribuídas ao longo de 16 cromossomos lineares, cujos tamanhos variam de 250 a 200 Kb (QUEROL et al., 2003).

A origem da levedura *S. cerevisiae* é controversa, pois alguns autores propõem que essa espécie é um organismo “natural” presente em frutos de plantas, enquanto outros argumentam que *S. cerevisiae* é uma espécie originada do seu “parente” mais próximo *S. paradoxus*, uma espécie selvagem encontrada no mundo todo. Esse debate é importante para postular o genoma original da *S. cerevisiae* e suas alterações após a forte pressão de seleção aplicada desde o primeiro uso inconsciente em processos de fermentação controlada. Características selecionadas por muitas gerações têm grande influência sobre o genoma de *S. cerevisiae* (PÉREZ-ORTÍN et al., 2002).

Leveduras *S. cerevisiae* são organismos altamente especializados, que têm evoluído principalmente devido às atividades humanas para utilizar seu potencial pleno. Esse processo de seleção é descrito como “domesticação” e pode ser responsável pelas características genéticas especiais que as leveduras industriais possuem.

Sendo assim, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* têm sido selecionadas para características favoráveis para o processo de fermentação, por exemplo, habilidade de fermentar rápida e eficientemente em meios com elevadas concentrações de açúcares, resistência às altas concentrações de etanol e dióxido de enxofre e sobrevivência em temperaturas elevadas durante o processo (PUIG et al., 2000).

Durante a produção de biomassa e a fermentação alcoólica, as células das leveduras estão sujeitas às condições extremas devido, por exemplo, ao estresse osmótico imposto pelas altas concentrações de açúcar no mosto, ao etanol produzido e ao uso de compostos antimicrobianos como dióxido de enxofre (BAUER & PRETORIUS, 2000). Investigações genéticas em linhagens de leveduras industriais têm sugerido que estas são capazes de evoluir rapidamente para condições especiais do ambiente industrial. Uma característica comum de leveduras industriais em comparação com linhagens comuns de laboratórios é a presença de maior grau de polimorfismo cromossômico. Linhagens industriais que pertencem à mesma espécie são caracterizadas com base em polimorfismos, por meio dos padrões cromossômicos visualizados quando submetidos à eletroforese. A constituição genética de linhagens de leveduras em ambientes industriais específicos pode refletir alterações cromossômicas, provocadas principalmente por mutações espontâneas. Recombinação mitótica, *crossing-over* e conversão gênica podem provocar rápida adaptação às mudanças ambientais.

As alterações genômicas que ocorrem em maior proporção em linhagens de leveduras industriais quando comparadas com linhagens de laboratórios tendem a ser fixadas como resultado da alta pressão de seleção para as características genéticas que melhor se adequem às condições industriais (QUEROL et al., 2003).

Polimorfismos cromossômicos ou até mesmo na sequência de DNA têm sido constatados e utilizados para identificar linhagens de leveduras pertencentes a uma mesma espécie a fim de determinar a população de leveduras ao longo do processo de fermentação.

A base molecular das propriedades tecnológicas das leveduras ainda é bastante desconhecida. Contudo, uma possibilidade óbvia de adaptação ao ambiente industrial da fermentação alcoólica é dependente de padrões específicos de expressão de seus genomas (PÉREZ-ORTÍN et al., 2002). Análises comparativas da expressão gênica entre leveduras industriais e não industriais e entre

cepas industriais distintas poderiam ajudar na identificação de genes envolvidos na adaptação ao ambiente industrial (QUEROL et al., 2003).

4.3 Técnicas utilizadas na identificação de leveduras

4.3.1 Técnicas clássicas ou tradicionais

A taxonomia clássica de leveduras data do século XIX, quando Hansen, em 1896, diferenciou as culturas de leveduras com base na morfologia celular e do ascósporo, introduzindo as seguintes características: crescimento em meio líquido, temperatura ótima de crescimento e habilidade em fermentar determinados açúcares. Com o passar dos anos, outras características foram incluídas, como presença ou ausência de estágios sexuais, formação de pigmentos, utilização de fontes de carbono, tolerância à alta concentração de glicose, liquefação de gelatina, crescimento em várias temperaturas, resistência à cicloheximida (actidione) e estrutura da coenzima Q no sistema de elétrons.

Atualmente, a metodologia desenvolvida para a identificação e classificação taxonômica das leveduras depende não só dos testes fisiológicos (utilização de carboidratos, utilização de compostos nitrogenados, crescimento em meio isento de vitaminas, utilização e produção de ácidos, produção de compostos amiláceos extracelulares, hidrólise da ureia, degradação de lipídeos, produção de éster, resistência à actidione, entre outros), como também da determinação de características morfológicas, sexuais e de cultura.

Para a identificação das leveduras em nível de gênero, a realização dos testes morfológicos (formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro, reprodução vegetativa, formação de endósporos, balistósporos), sexuais (presença ou ausência de ascósporos) e de cultura (crescimento em meio sólido e líquido) são fundamentais (Figura 18). Esses testes envolvem observação microscópica, resultando em certa subjetividade na análise. Dessa forma, a experiência do profissional é de fundamental importância na identificação das leveduras.

Para a identificação em nível de espécie, utilizam-se os testes bioquímicos ou fisiológicos (utilização de fontes de carbono e nitrogênio) e de exigências nutricionais, que demandam tempo e uma equipe bem treinada (Figura 19).

Os procedimentos convencionais que classificam leveduras com base em suas características taxonômicas exigem muito trabalho e não são totalmente conclusivos. Diversas metodologias identificam leveduras de acordo com as características morfológicas da colônia, das células ou em função das condições de cultivo. Sendo assim, dados sobre a capacidade de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, caracterização bioquímica e fisiológica são importantes quando são utilizadas metodologias convencionais (MARÇAL, 2005).

Para identificação mais precisa de leveduras, estudos bioquímicos e nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, que são mais úteis na determinação genérica. As diferenças que as leveduras apresentam na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, já que estas apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares. Por exemplo, alguns grupos apresentam fermentação vigorosa, como *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces*, não realizam fermentação. Alguns gêneros incluindo *Saccharomyces* podem ser classificados pela incapacidade de assimilar nitrato. Assim, pela utilização de meios de cultura seletivos, que contêm compostos específicos, é possível identificar leveduras. Porém, essas técnicas requerem tempo, já que são necessários diversos testes e ainda assim podem-se obter conclusões equivocadas quando se trata da identificação de linhagens de leveduras de uma mesma espécie (WALT & YARROW, 1984).

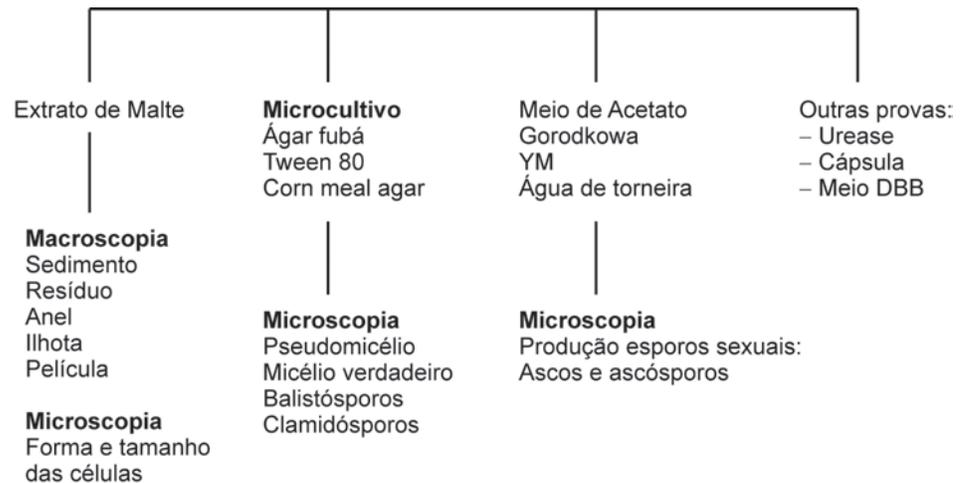


Figura 18 Testes utilizados para a identificação de leveduras em nível de gênero.

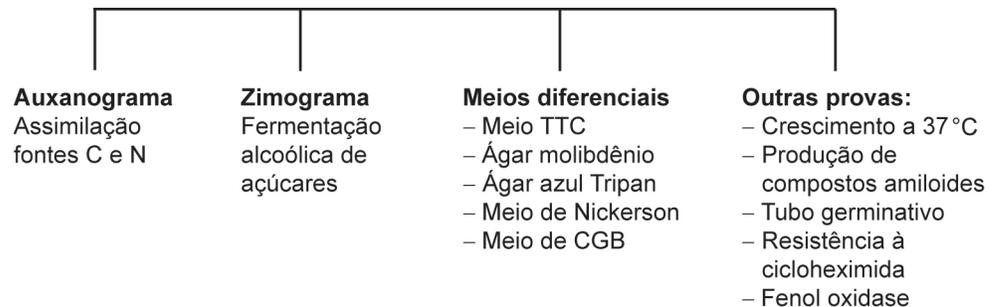


Figura 19 Testes utilizados para a identificação de leveduras em nível de espécie.

Para a identificação das leveduras, após a realização dos testes, é necessário a utilização de chaves dicotômicas, ou seja, que apresentem duas alternativas para cada característica estudada. Com o aumento do número de espécies

de leveduras, as chaves tornaram-se mais complexas. As características das chaves devem ser claras e não podem dar margem para ambiguidades, pois características que variam entre as linhagens de uma espécie não podem ser utilizadas para sua classificação.

Uma chave pode seguir a classificação taxonômica e chegar primeiramente ao gênero e depois às espécies pertencentes a esse gênero. Para as leveduras ascomicéticas, a formação de ascósporos é utilizada como um dos critérios de classificação primários. Já as leveduras basidiomicéticas são na maior parte isoladas na fase haploide e, se elas são heterotáticas, são identificadas como deuteromicéticas. As características da reprodução vegetativa são utilizadas para diferenciação genérica das leveduras deuteromicéticas.

As chaves podem também chegar diretamente à espécie, sem passar primeiramente pelos gêneros. Nesse caso, as características da reprodução sexual não são requeridas e as características fisiológicas, relevantes. A padronização dos testes fisiológicos e bioquímicos é muito importante nesse tipo de chave, de forma que impurezas nos compostos químicos testados e inadequação das condições do teste podem levar a resultados errôneos e, conseqüentemente, a erros de identificação (PRADA & CASTRO, 1995).

As chaves de identificação utilizadas para as leveduras são as de Kreger-van Rij (1984) e Barnett, Payne & Yarrow (1990).

Diversos métodos alternativos, como sorologia, conteúdo de trealose, efeito inibitório de diferentes compostos químicos, padrão eletroforético, análise de polimorfismos de DNA, etc., têm sido utilizados com sucesso variável na identificação e caracterização de linhagens de leveduras.

Na Figura 20, podem-se observar, pelas fotografias, alguns resultados de testes realizados com leveduras da fermentação alcoólica.

4.3.2 Técnicas de biologia molecular

A maioria das cepas que pertencem à mesma espécie não é identificada por métodos microbiológicos clássicos, sendo assim, as técnicas de biologia molecular constituem uma alternativa para identificá-las. Diversas técnicas baseadas na análise de polimorfismos moleculares (genéticos) têm sido utilizadas com esse objetivo, como a análise do padrão de proteínas, polimorfismos na seqüência do DNA, cariotipagem por meio do uso da eletroforese de campo pulsado, análise de restrição do DNA mitocondrial, entre outras.

Polimorfismos genéticos são variações genéticas que podem ocorrer em seqüências codificadoras e não codificadoras do DNA, levando a variações fenotípicas.

A reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma das técnicas que revolucionou a biologia molecular, permitindo a amplificação *in vitro* de fragmentos do DNA que se deseja estudar. Além da PCR, a descoberta e o isolamento de endonucleases (enzimas) de restrição que possuem sítios específicos também têm auxiliado em estudos de polimorfismos de DNA.

As técnicas de biologia molecular auxiliam no monitoramento de polimorfismos do DNA que podem ocorrer no genoma da levedura durante a fermentação. Leveduras que tenham marcadores moleculares específicos têm sido selecionadas para controlar precisamente o crescimento de cepas particulares durante a fermentação.

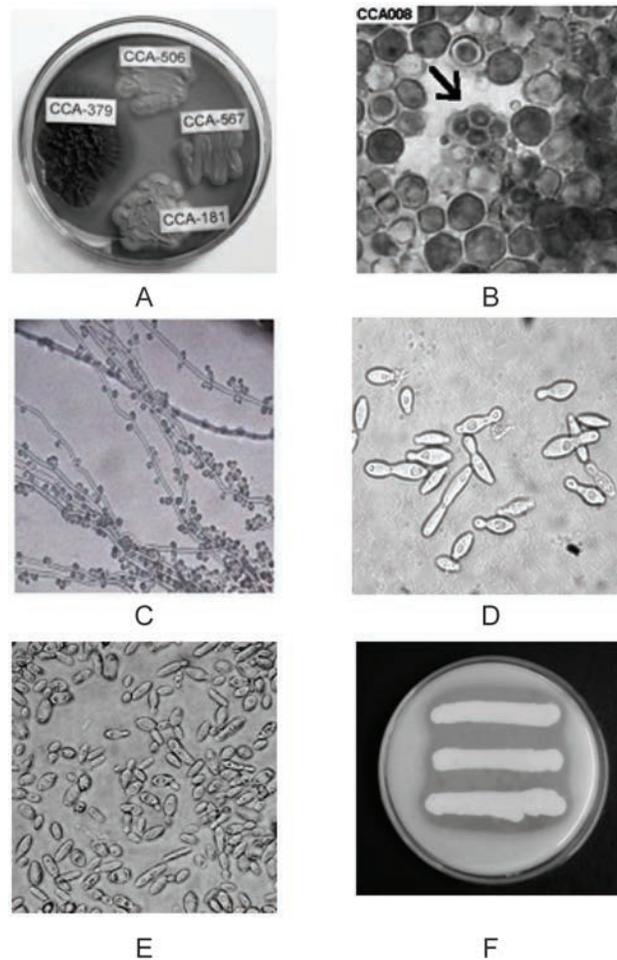


Figura 20 Resultados de alguns testes realizados para a identificação de leveduras da fermentação alcoólica. **A.** Teste do DBB em placa de Petri: a linhagem CCA379 é positiva, as demais são negativas. Linhagens basidiomicéticas são DBB+. **B.** A seta mostra um asco contendo quatro ascósporos (tétrades) em *S. cerevisiae* em meio Acetato (aumento de 400X). **C.** Formação de pseudomicélio em Corn Meal Agar por *S. cerevisiae* (aumento de 400X). **D.** Leveduras apiculadas (brotamento bipolar) em meio Extrato de malte (aumento de 400X). **E.** Células ogivais e globosas de *Dekkera bruxellensis* em meio YEPD (aumento de 400X). **F.** Produção de ácido (presença de halo ao redor da colônia) por *Dekkera bruxellensis* em meio Carbonato de cálcio em placa de Petri.

4.3.2.1 Cariotipagem por meio da eletroforese em campo pulsado

O termo “cariótipo” é definido como o conjunto completo de cromossomos de uma célula ou organismo e sua determinação tem sido considerada um parâmetro importante na taxonomia de espécies. A técnica convencional, usada principalmente para organismos eucariotos superiores, baseia-se em observações microscópicas de preparações de cromossomos na mitose ou meiose. No caso de fungos, os quais a maioria é haploide, os cromossomos são extremamente pequenos para serem observados por microscopia. Com o desenvolvimento da eletroforese de campo pulsado para separação de grandes moléculas de DNA, foi possível a separação eletroforética de cromossomos de uma série de espécies fúngicas (PIZZIRANI-KLEINER, PEREIRA & AZEVEDO, 1998).

Segundo Magalhães et al. (2005), a eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho. A matriz formada pela agarose atua como um filtro molecular, cuja porosidade é inversamente proporcional à concentração do gel de agarose. Durante a eletroforese, as moléculas de DNA (apresentam carga negativa) posicionam-se em paralelo ao campo elétrico; a dificuldade de transpor a matriz de agarose em direção ao polo positivo é inversamente proporcional ao tamanho de cada molécula. As menores migram mais rapidamente possibilitando a separação por tamanho ou peso molecular. Assim, quanto maior a molécula, maior o tempo de migração, possibilitando a separação dos fragmentos, qualquer que seja o tamanho.

Na prática, um gel de agarose a 0,8% é apropriado para separação de fragmentos de 0,5 até 20-30 kb, aproximadamente. Géis com maiores concentrações (2,5 até 3%) separam fragmentos menores (80 até 500 bp); uma alternativa, nesses casos, é o gel de poliacrilamida. Géis de agarose a 0,5% separam fragmentos com até 50 kb, porém, são bastante frágeis e o tempo de corrida é excessivamente demorado. Moléculas de DNA maiores que 50 kb são de difícil separação, mesmo com a diminuição da concentração de agarose, pois sua mobilidade eletroforética se torna independente do tamanho do fragmento.

Na década de 1980, foi desenvolvida a técnica de eletroforese de campo pulsado (ou pulsante), originalmente usada para a separação dos cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para solucionar esse problema. Os autores Schwartz & Cantor (1984) relataram que as moléculas de DNA que foram estiradas pela ação de um campo elétrico demandavam um maior ou menor tempo para o relaxamento, e que era proporcional ao tamanho da molécula, depois de cessada a ação do campo de força.

O campo pulsado (*pulsed field*) aplica-se a qualquer modalidade de eletroforese que utilize mais de um campo elétrico direcionado de forma alternada. Quando ocorre troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são compelidas à reorientação para se posicionarem de forma paralela ao campo de força, antes de migrarem para a direção do polo positivo. Os fragmentos menores reorientam-se com maior facilidade que os maiores, que demoram mais para se adaptar à nova direção. O tempo entre as mudanças de orientação pelo campo elétrico é chamado tempo de pulso (*switch time*). A partir de 1984, vários protocolos empíricos surgiram com o intuito de otimizar a separação de grandes moléculas de DNA, ou seja, de alto peso molecular. Os diferentes métodos resultantes podem ser agrupados em: aqueles que alternam campos elétricos transversais (CHEF, ROFE, PACE, PHOGE, OFAGE, TAFE), entre os quais o CHEF é o mais difundido, e os que utilizam alternância de campos elétricos invertidos (FIGE, ZIFE).

De modo geral, qualquer uma dessas técnicas possibilita a separação de grandes fragmentos de DNA (~600 kb) ou ainda de cromossomos inteiros. Esse tipo de eletroforese foi, então, desenvolvido para vencer as limitações da mobilidade de grandes moléculas de DNA.

O cariótipo eletroforético de leveduras difere quanto ao número, ao tamanho e à intensidade de bandas, permitindo assim a identificação de cada cepa por seu padrão cromossômico. O padrão cromossômico de cada linhagem fornece um padrão único, como se fosse uma impressão digital (Figura 21).

Linhagens de levedura, por exemplo, de uma mesma espécie, podem apresentar polimorfismos cromossômicos tanto no número quanto em relação ao peso molecular dos cromossomos observados ao longo de várias gerações celulares no processo de fermentação contínua (LUCENA et al., 2007).

Além de permitir o monitoramento do rendimento das leveduras no processo de fermentação alcoólica e a seleção das cepas visando melhor eficiência, a técnica de cariotipagem ainda revelou que as leveduras introduzidas no início do processo podiam ser substituídas por leveduras selvagens, permitindo o estudo para verificar qual levedura é mais eficiente para o processo industrial de fermentação do álcool.

Basso et al. (1993) investigaram a utilização da técnica de cariotipagem no acompanhamento de linhagens industriais de *S. cerevisiae* no processo fermentativo de várias destilarias produtoras de etanol durante duas safras. Os autores verificaram que leveduras da panificação não permaneciam no processo após 40 dias da inoculação, sendo substituídas por leveduras dominantes típicas de cada destilaria.

A maior restrição da cariotipagem molecular é que, apesar de ser mais informativa quando comparada a técnicas que caracterizam leveduras de acordo

com características taxonômicas, esta tem como base a avaliação do padrão cromossômico, verificando apenas os polimorfismos que ocorrem nos cromossomos, e não os polimorfismos gênicos, como a mudança de um nucleotídeo. É importante avaliar tais polimorfismos pelo fato de estes poderem causar mudanças, alterando assim algumas características do organismo e, portanto, podendo influenciar a eficácia do processo fermentativo.

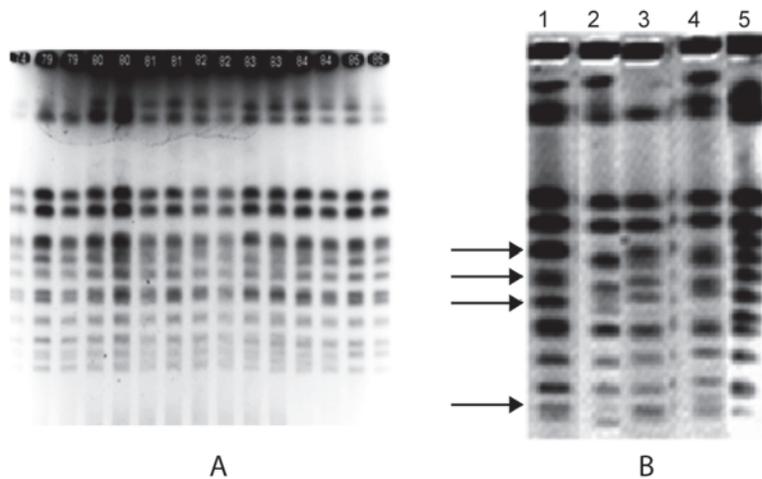


Figura 21 Cariótipo eletroforético de leveduras da fermentação alcoólica. **A.** Todos os isolados pertencem à espécie *S. cerevisiae* e não há diferença (polimorfismos) entre as linhagens. **B.** As setas indicam as bandas polimórficas, ou seja, que aparecem em uma linhagem e não aparecem em outras, das linhagens selecionadas BG-1 (1), PE-2 (2), SA-1 (3), CAT-1 (4) e Y-904 (5) de *S. cerevisiae*.

Fonte: adaptada de Andrietta, Andrietta & Stroppa (2003) e Steckelberg et al. (2007).

A cariotipagem mostrou ser eficiente na discriminação de linhagens geneticamente relacionadas e é ainda o método de escolha para a detecção de rearranjos cromossômicos.

A alta frequência de rearranjos cromossômicos observada para os isolados do processo industrial deve estar relacionada às condições de estresse às quais as células são continuamente submetidas (alta concentração de etanol, altas temperaturas e anaerobiose). Foram observados rearranjos cromossômicos a partir de 150 gerações de crescimento em condições de laboratório. Nos processos industriais, os rearranjos cromossômicos devem ocorrer em um intervalo ainda menor devido às condições adversas às quais as células são submetidas ao longo do ciclo celular durante a safra.

A técnica de cariotipagem molecular pode ter sua aplicabilidade comprometida para estudos de dinâmica populacional em processos industriais de fermentação alcoólica, pois a ocorrência de rearranjos cromossômicos pode comprometer em certo nível a confiabilidade dos resultados obtidos (LUCENA, 2004).

Andrietta, Andrietta & Stroppa (2003) verificaram por cariotipagem que todos os isolados da fermentação alcoólica pertenciam à espécie *S. cerevisiae*, apresentando o mesmo cariótipo eletroforético. No entanto, um dos três tipos morfológicos isolados, em cada coleta, apresentou desempenho industrial diferente dos demais. Os autores concluíram que há necessidade de uma avaliação paralela e complementar, como a de desempenho fermentativo, para a diferenciação final das linhagens de *S. cerevisiae*.

4.3.2.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A reação de polimerização em cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), possibilita a multiplicação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA. Desde o seu desenvolvimento por Mullis & Faloona (1987), a sua especificidade, sensibilidade e rapidez possibilitaram o desenvolvimento de métodos aplicáveis em diversas áreas da pesquisa biológica envolvendo inúmeras classes de organismos.

Segundo Guimarães & Sá (2002), o método requer um molde de DNA que contenha a região “alvo” a ser amplificada, dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região “alvo” e o uso de uma enzima polimerase termoestável, como a Taq polimerase, isolada de *Thermus aquaticus*. Todos os componentes do PCR são misturados simultaneamente, e o procedimento consiste de uma sucessão de três etapas, as quais são determinadas por diferentes temperaturas: a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão do DNA. No primeiro passo, a incubação da solução de PCR a altas temperaturas (90-95 °C) permite a desnaturação do DNA molde (fita dupla) em duas fitas simples. O resfriamento da solução para uma temperatura de anelamento (tipicamente 55 °C) possibilita que os *primers* se anelem na posição 5' de cada fita simples do DNA molde. Para a etapa de extensão, a temperatura é elevada para 72 °C e os pontos de anelamento dos *primers* servem como pontos iniciadores da síntese das novas fitas de DNA. O tempo de incubação de cada etapa é de cerca de um a dois minutos. A sequência das três etapas constitui um ciclo de reação de PCR. No segundo ciclo, as fitas de DNA recém-sintetizadas são separadas das fitas originais por desnaturação, e cada fita serve novamente como molde nas etapas de anelamento e extensão. Teoricamente, como a sequência demarcada pelos *primers* duplica a cada ciclo, após 30 ciclos, um fator teórico de um bilhão pode ser alcançado (Figura 22).

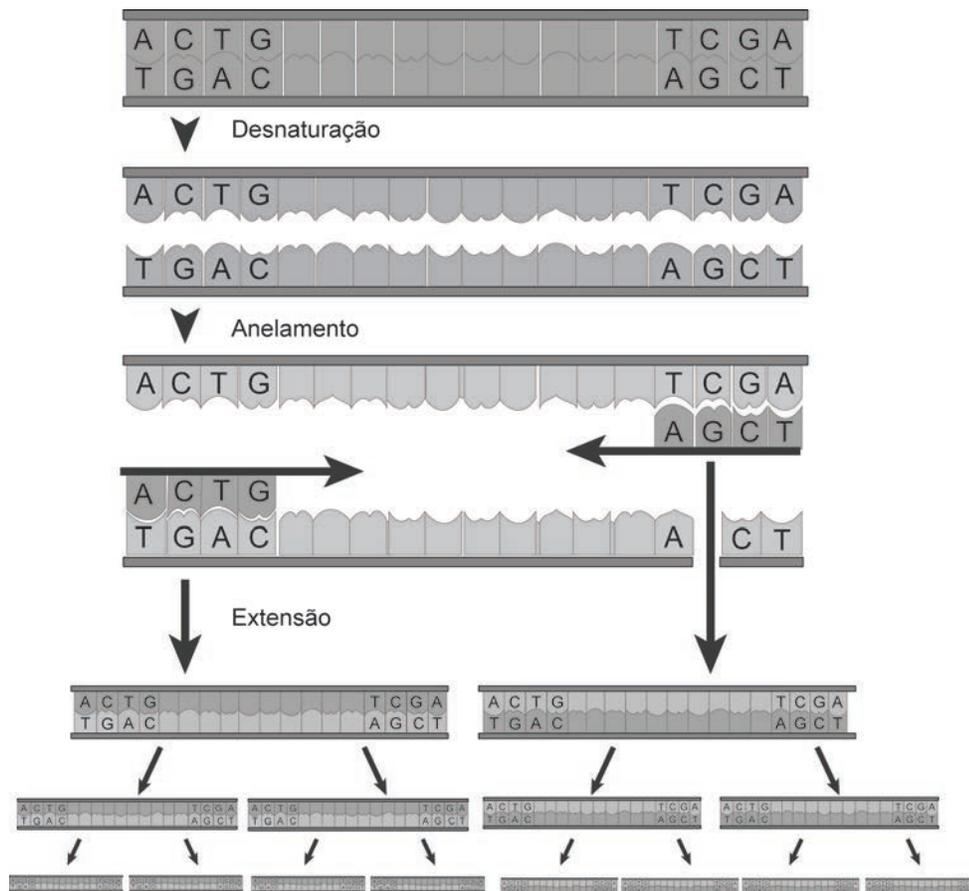


Figura 22 Esquema relativo ao PCR.

Tipicamente, o PCR é efetuado por 30-40 ciclos. Como todos os componentes estão presentes na mistura desde o início da reação, o procedimento pode ser automatizado e conduzido em um termociclador automático, programado para aquecer e resfriar as amostras por períodos específicos.

A visualização dos fragmentos de DNA amplificados é feita por eletroforese em gel de agarose, como descrito acima, sem necessidade de ser em campo pulsado, e podem ser visualizados em transiluminador depois de corados com brometo de etídeo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Em *S. cerevisiae*, como na maioria das espécies de eucariontes, quatro diferentes genes do DNA ribossomal (5S, 5,8S, 18S e 26S) aparecem agrupados em blocos repetidos em dezenas de cópias no genoma. As regiões ITS1 e ITS2 representam sequências internas transcritas que, entretanto, não são traduzidas para as subunidades do RNA ribossomal. A região pode ser amplificada por meio de *primers* homólogos às sequências finais dos genes 18S e 26S. Como os ribossomos estão presentes em todos os organismos com uma origem evolucionária comum, parte da molécula apresenta-se altamente conservada alternando com regiões variáveis, demonstrando baixo polimorfismo intraespecífico e alto polimorfismo interespecífico, Figura 23 (SILVA FILHO, 2003).

O sequenciamento dos genes ribossomais após amplificação por PCR permite a identificação das leveduras em nível de espécie. As sequências ribossomais obtidas são normalmente depositadas pelos pesquisadores em bases de bancos de dados de genes, como Genbank, EMBL ou DDBJ, em que são registradas com números de acesso únicos e distribuídas para outras bases de dados correlatas.

A comparação das sequências obtidas com as do banco de dados permite que o organismo possa ser identificado, pois os programas retornam uma lista e há um alinhamento das sequências mais similares à sequência submetida, dentro de limites predefinidos (GUIMARÃES & SÁ, 2002).

A técnica de PCR é bastante flexível e de fácil execução em amostras de diferentes origens. Tem sido utilizada com sucesso em pesquisas e na detecção de microrganismos em processos biotecnológicos, além da diagnose de doenças infecciosas.

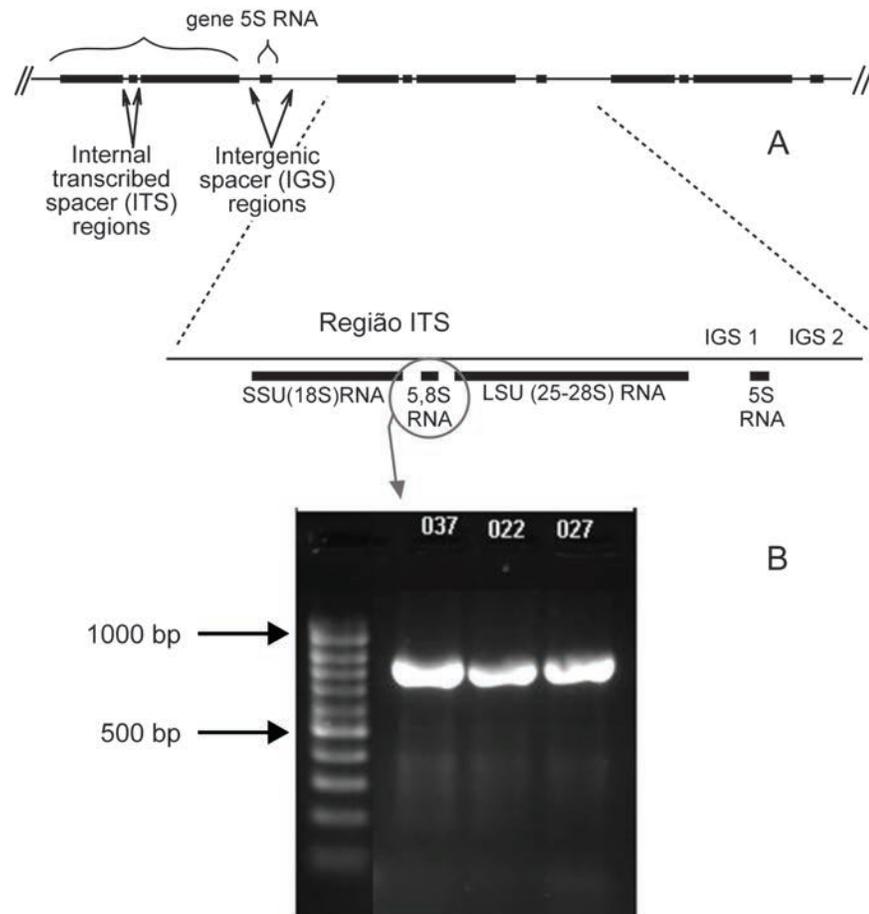


Figura 23 A. Esquema representativo do DNA ribossomal de leveduras, mostrando os quatro diferentes genes (5S, 5,8S, 18S e 26S) e as regiões ITS agrupados em blocos repetidos em dezenas de cópias no genoma. **B.** PCR de três linhagens de *S. cerevisiae* (022, 027 e 037), apresentando bandas de DNA por volta de 800-850 bp.

A análise do comprimento aparente do produto da PCR das regiões ITS1 e ITS2 tem permitido identificar diferentes tipos de leveduras. O tamanho do produto de amplificação que corresponde ao *locus* ITS1-5,8S-ITS2 pode ser utilizado para identificação rápida de leveduras. Entretanto, várias espécies apresentam produtos de amplificação com o mesmo tamanho. Esse problema pode ser resolvido a partir da digestão desses fragmentos com diferentes enzimas de restrição, principalmente *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII* e *HinIII*. A soma dos padrões de restrição parece ser espécie-específico e pode ser utilizada com segurança na identificação de leveduras (SILVA FILHO, 2003).

4.3.2.3 DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD)

A técnica RAPD, do inglês *Random amplified polymorphic DNA*, é basicamente uma variação da técnica de PCR, diferenciando-se apenas por utilizar um *primer* único, de sequência pequena, desenhado aleatoriamente e que poderá amplificar diferentes regiões do genoma ao acaso.

Essa técnica consiste na amplificação de sequências do genoma por meio de *primers* curtos de no máximo 10 nucleotídeos com sequências arbitrárias que, em baixas temperaturas de anelamento, hibridizam em *loci* distribuídos aleatoriamente no DNA. Tem sido utilizada na separação de espécies e linhagens de muitos organismos, inclusive os fungos, apresentando a vantagem de não haver necessidade de conhecimento específico do genoma a ser estudado, como no caso do PCR.

O conjunto de fragmentos de DNA amplificados (chamados RAPD) é um tipo de “impressão digital de DNA”, que pode ser utilizada para caracterizar um organismo individual. Um perfil da reação RAPD será formado pelo conjunto dos produtos de amplificação e esse perfil é o que permitirá que a levedura seja identificada e selecionada (LACERDA et al., 2002). Na Figura 24 pode ser observado o perfil RAPD para linhagens de *S. cerevisiae* utilizando o *primer* OPA-11.

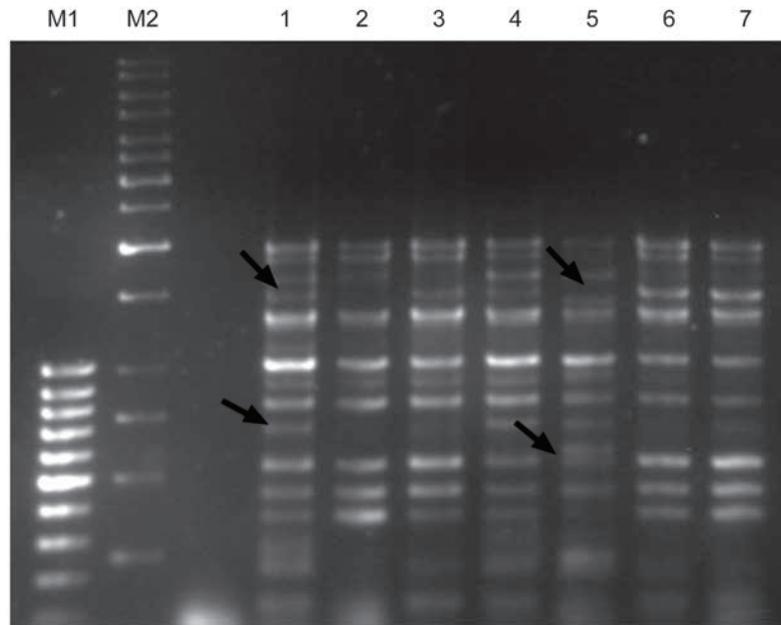


Figura 24 Padrão RAPD de linhagens de leveduras *S. cerevisiae* isoladas da fermentação alcoólica, com a utilização do *primer* OPA-11. M1 e M2 são marcadores de peso molecular. As setas indicam bandas polimórficas, ou seja, que não aparecem em todas as linhagens.

Guimarães (2005) utilizou a técnica de RAPD-PCR para conduzir um estudo de identificação de leveduras. Nesse estudo, foram isoladas 61 leveduras, 14 foram identificadas por técnicas morfológicas e bioquímicas como sendo *S. cerevisiae* e estas foram submetidas à caracterização molecular, que permitiu a classificação das leveduras em três grupos diferentes.

Gomes et al. (2000) verificaram que o método RAPD foi o mais eficiente entre os métodos testados, mesmo entre as leveduras da indústria alcooleira pertencentes à espécie *S. cerevisiae*, as quais apresentam alta similaridade.

A técnica de RAPD utilizando o *primer* M13 permitiu verificar a permanência de duas linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* nas dornas de fermentação para produção de cachaça. Linhagens selvagens dessa espécie apresentaram padrões RAPD distintos quando comparados com as linhagens iniciadoras (GOMES et al., 2009).

No entanto, o problema mais frequentemente associado a essa técnica é a baixa reprodutibilidade de algumas bandas e a necessidade de várias reações com diferentes *primers*, aumentando o tempo de ensaio (LACERDA et al., 2002).

4.3.2.4 Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA mitocondrial (RFLP/mtDNA)

As leveduras são organismos que mostram uma ampla variabilidade no tamanho do DNA mitocondrial, de 6 a 25 μm de comprimento. O uso de mtDNA na taxonomia de leveduras apresenta muitas vantagens, tais como pequeno tamanho, alto número de moléculas de mtDNA por célula, e um único cariótipo mitocondrial em cada isolado. Durante muito tempo, a limitação dessa técnica foi a dificuldade no isolamento do mtDNA. Em 1990 foi desenvolvido um método rápido para superar esse problema (QUEROL & BARRIO, 1990), sendo aperfeiçoado uma década depois por López et al. (2001). O método permite a análise de mtDNA sem necessidade de prévio isolamento e purificação.

Essa técnica é baseada na diferença no conteúdo de GC entre o DNA nuclear (nDNA) e o mtDNA, sendo de 40% e 20%, respectivamente. Quando o DNA total é digerido com enzimas de restrição que somente reconhecem regiões ricas em GC, como *MspI*, *HaeIII* e *CfoI*, o nDNA fica superdigerido, dando origem a um alto número de fragmentos pequenos, os quais não são detectados pela eletroforese convencional em gel de agarose. Dessa forma, somente os fragmentos de mtDNA serão observados no gel, os quais serão separados por tamanho, constituindo padrões espécie-específicos ou linhagem-específicos (ALCOBA-FLÓREZ et al., 2010)

Em resumo, essa técnica consiste na extração do DNA mitocondrial, utilização de enzima de restrição e análise dos fragmentos por eletroforese.

Dessa forma, pode-se fazer o acompanhamento da população de leveduras devido ao polimorfismo de tamanho gerado. Tal técnica tem sido muito utilizada no acompanhamento da dinâmica de populações de leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* e de linhagens de *S. cerevisiae* em fermentações espontâneas e inoculadas em unidades produtoras de vinho.

Trabalho de Querol et al. (1992) analisou o DNA mitocondrial de 14 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas das indústrias de vinho, cerveja, panificação e etanol. A combinação dos padrões obtidos com o uso de sete enzimas de restrição permitiu discriminar a metade das leveduras investigadas. Constanti et al. (1997) encontraram padrões de *S. cerevisiae* em 98 isolados de duas vinícolas na Espanha, com o uso das enzimas de restrição *HinfI* e *AluI*. Essa técnica tem se mostrado rápida, clara, precisa e com grande poder de discriminação, sendo, portanto, amplamente aceita (GUTIERREZ et al., 2000).

Esteve-Zarzoso et al. (1999) identificaram um total de 132 espécies de leveduras pertencentes a 25 gêneros diferentes a partir do padrão de restrição, utilizando três endonucleases (*CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*) da região que abrange os espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e do gene 5,8S rRNA.

Trabalho de Araujo et al. (2007) mostrou a aplicabilidade, exequibilidade e eficácia do uso de RFLP/mtDNA para discriminar as linhagens de *S. cerevisiae* na produção de cachaça. É uma técnica fácil de executar, rápida, confiável e econômica. Com o uso dessa técnica foi possível detectar 12 padrões diferentes, 11 pertencentes a linhagens selvagens e uma referente à levedura da panificação (Figura 25).

Os autores também mostraram que o uso combinado dessa técnica, RAPD e PCR, revelou o alto polimorfismo genético apresentado pelas linhagens.

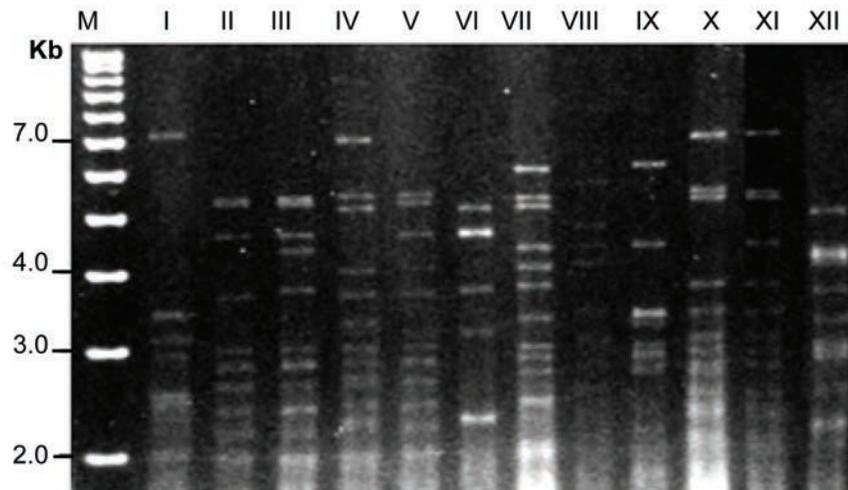


Figura 25 Padrões gerados por RFLP/mtDNA utilizando a enzima de restrição *HinfI* de 97 isolados de *S. cerevisiae* de três dornas de fermentação durante o período de produção de cachaça.

Fonte: Araujo et al. (2007).

4.3.2.5 Microssatélites

A técnica de microssatélites, baseada em PCR, utiliza sequências (*primers*) curtas de até seis nucleotídeos repetidas em *tandem* (SSRs, *simple sequence repeats*), e que são encontradas no genoma de vários organismos. Têm sido utilizadas com muito sucesso como marcadores moleculares.

Pode ocorrer de duas maneiras, dependendo da região a ser amplificada: utilização de *primers* externos aos microssatélites, o que permite avaliar o polimorfismo de tamanho dessas regiões; utilização do próprio microssatélite como *primer* para a amplificação do DNA, permitindo analisar as sequências nucleotídicas localizadas entre os microssatélites. Esta última é chamada de ISSR, *Inter simple sequence repeats* (SILVA FILHO et al., 2005).

A utilização, por exemplo, do *primer* (GTG)₅, ou GTGGTGGTGGTGGTG, tem permitido a discriminação de linhagens de leveduras em processos de fermentação alcoólica industriais. Silva Filho et al. (2005) demonstraram a sucessão de leveduras ao longo do processo de fermentação que possibilitou a identificação de linhagens de *S. cerevisiae* dominantes no processo. Leveduras contaminantes, ou seja, aquelas que não apresentavam o padrão típico de amplificação de *S. cerevisiae*, foram identificadas e quantificadas por este método.

Utilizando esse mesmo *primer*, Basílio et al. (2005) foram capazes de diferenciar 29 padrões distintos para leveduras contaminantes. Estes isolados não *S. cerevisiae* foram identificados por sequenciamento da região 26S do DNA ribossomal, e a levedura predominante foi caracterizada como *Dekkera bruxellensis*, estando presente em 52% das amostras. Essa levedura foi responsável pela maior parte dos episódios de contaminação severa nas diferentes destilarias estudadas na região Nordeste por Basílio e colaboradores, bem como em destilarias da América do Norte (ABBOTT, HYNES & INGLEDEW, 2005).

A análise de dados no banco de dados do genoma de *S. cerevisiae* permitiu a seleção de microssatélites para estudar o polimorfismo de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, entre outras. A análise múltipla de microssatélites mostrou ser um método reprodutível e com alto grau de polimorfismo, possibilitando uma discriminação bem superior àquela alcançada pelos outros métodos de tipagem (PÉREZ, GALLEGO & HIDALGO, 2001).

Avansini (2009) utilizou o *primer* (GTG)₅ para diferenciar três linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica e verificou a existência de dois padrões de ISSR, um deles agrupando duas linhagens, e o outro constituído pela terceira linhagem (Figura 26).

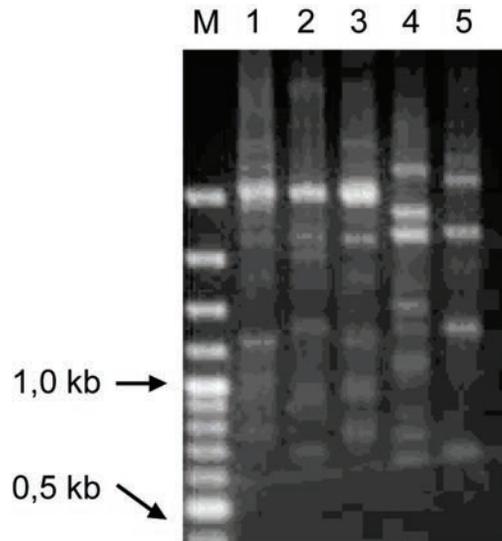


Figura 26 Perfil de amplificação de ISSR de leveduras com o iniciador $(GTG)_5$ 1, 2 e 3, *D. bruxellensis*; 4, *S. cerevisiae* “Fleischmann”; 5, *S. cerevisiae* PE-2; M, Marcador de peso molecular 100 bp. A linhagem 2 apresenta um perfil diferente das linhagens 1 e 3.

Fonte: adaptada de Avansini (2009).

4.4 Comparação entre as técnicas de tipagem genética

Durante o processo de fermentação alcoólica, as cepas parecem não se manter geneticamente uniformes. A reorganização dos seus genomas por meio, por exemplo, de rearranjos cromossômicos, como translocações cromossômicas, *crossing-over* mitótico e conversão gênica, promove uma rápida adaptação ao ambiente, quando comparada com mutações espontâneas, que ocorrem comparativamente em taxas mais baixas (PÉREZ-ORTÍN et al., 2002).

Essa reorganização do genoma pode mudar algumas características das cepas, podendo alterar atributos importantes para a fermentação alcoólica, tais como capacidade de resistir a altas concentrações de açúcar e álcool, eficiência na fermentação de açúcares, tolerância a altas temperaturas, etc. Com isso, é possível influenciar diretamente na eficiência do processo, além de interferir também nas características organolépticas do produto final.

Segundo Lucena et al. (2007), uma dúvida que surge em relação à identificação molecular de leveduras quanto à natureza dos novos padrões genômicos é se estes correspondem às novas cepas adicionadas naturalmente ao processo ou aos rearranjos cromossômicos das células iniciais. Segundo os autores, a teoria mais aceita é que a origem de padrões genômicos distintos deve-se a polimorfismos que permitem que as leveduras se adaptem ao ambiente da fermentação. A maioria dos eventos de rearranjos cromossômicos é provavelmente induzido por elementos duplicados, como *Ty transposons* e minissatélites, espalhados por todo o genoma da levedura.

Segundo Puig et al. (2000), as leveduras vínicas são frequentemente aneuploides, com dissomias, trissomias e menos frequentemente com tetrassomias. Essa aneuploidia pode conferir vantagens seletivas, por possivelmente aumentar o número de cópias de genes benéficos ou proteger as cepas contra mutações deletérias ou letais. Rearranjos cromossômicos têm sido descritos para leveduras do vinho durante o crescimento vegetativo, devido à recombinação entre cromossomos homólogos e entre sequências repetidas. A manutenção desses polimorfismos em uma população sugere que estes podem ser resultado de um importante mecanismo de adaptação de leveduras.

Puig et al. (2000) utilizaram a técnica de cariotipagem para observar recombinação mitótica e rearranjos cromossômicos e relacionar esses polimorfismos com características de produção de vinho. Lucena et al. (2007) utilizaram a eletroforese de campo pulsado para identificar rearranjos cromossômicos e tentar relacioná-los com adaptação celular ao ambiente industrial.

Processos de fermentações industriais que utilizam substratos não esterilizados sempre apresentaram problemas com relação à presença de microrganismos contaminantes indesejáveis. Especialmente em fermentações alcoólicas para produção de vinho, cerveja, aguardente e álcool combustível, o acompanhamento da levedura do processo e de populações nativas constitui-se um elemento decisivo para obtenção de bons rendimentos e qualidade do produto fabricado. Com o desenvolvimento da técnica de PCR, métodos menos laboriosos de tipagem molecular foram desenvolvidos para caracterizar e identificar leveduras, no sentido de conhecer melhor essas populações e também propiciar respostas mais rápidas para resolver problemas relacionados aos contaminantes microbianos.

As técnicas de tipagem genética empregadas até os dias atuais em processos industriais apresentaram variações com relação à sua execução e resolução. As baseadas na análise de restrição do DNA mitocondrial, e PCR, como RAPD e microssatélites, mostraram bons resultados na identificação de espécies e discriminação de linhagens de leveduras e bactérias. Entretanto, problemas com reprodutibilidade foram observados principalmente com questões relacionadas à padronização da reação e pureza do DNA, o que, muitas vezes, dificultou a interpretação dos resultados. Além disso, o tempo de análise ainda é longo quando se pretende empregar os resultados para monitorar processos.

A cariotipagem, apesar de ser uma técnica sensível e muito empregada no estudo de variabilidade genética de microrganismos, é laboriosa, cara e pode levar a resultados controversos sobre a existência de novas linhagens ou linhagens que sofreram rearranjos cromossômicos.

A amplificação da região ITS do DNA ribossomal, por apresentar padrões espécie-específicos, tem sido particularmente útil para detectar e identificar

espécies de leveduras. Por outro lado, por sua característica específica, a utilização é limitada quando se trata de acompanhar linhagens de leveduras em processos industriais.

O polimorfismo de tamanho observado pela amplificação de sequências de microssatélites por meio de *primers* externos é hoje a técnica mais rápida e precisa para discriminar linhagens de leveduras em apenas oito horas de análise. No entanto, a sequência a ser amplificada precisa ser conhecida, e assim a técnica só pode ser aplicada em leveduras que já tenham seu genoma sequenciado.

Enfim, qualquer técnica apresenta vantagens e limitações, fazendo-se necessária a busca de novos marcadores que apresentem elevado nível de discriminação, ao mesmo tempo que possam ser empregados como ferramentas no acompanhamento e na seleção de leveduras em processos de fermentação alcoólica (SILVA FILHO, 2003).

4.5 Considerações finais

Durante muitos anos as destilarias brasileiras começavam a safra com leveduras de panificação e de laboratório. Não havia metodologia capaz de identificar e monitorar a permanência dessas leveduras no processo industrial e tampouco um programa de seleção eficaz. Pouco se conhecia sobre as razões das mudanças que ocorriam no rendimento fermentativo, e os prejuízos para a indústria eram grandes durante a safra. Em 1989, a Fermentec (empresa de consultoria especializada em fermentação alcoólica e controle laboratorial para a produção de açúcar e álcool) e a ESALQ/USP, ambas sediadas em Piracicaba-SP, começaram a trabalhar com uma tecnologia inovadora, a cariotipagem, que permitia identificar as leveduras pelo seu DNA, como se fosse a “impressão digital”. A parceria com as usinas para a coleta de amostras e identificação das leveduras levou a duas descobertas: da rápida substituição das leveduras de panificação e de laboratório por leveduras selvagens; da possibilidade de monitorar e selecionar novas leveduras mais eficientes para os processos industriais de fermentação alcoólica.

Mais de 20 anos depois, ainda é a cariotipagem a técnica molecular mais utilizada para caracterização de leveduras da fermentação alcoólica no Brasil, embora já se tenha começado a utilizar a análise de restrição do DNA mitocondrial, especialmente quando existem dúvidas em relação à levedura selecionada.

Outras técnicas de biologia molecular, como RAPD, microssatélites e outras, têm sido mais utilizadas em pesquisas desenvolvidas em universidades e outras instituições de pesquisa.

UNIDADE 5

Leveduras selecionadas

5.1 Primeiras palavras

Nesta unidade, será discutida a importância da seleção de linhagens de leveduras para a eficiente condução do processo fermentativo para produção de álcool combustível. As características desejadas em uma levedura do processo, assim como as estratégias para obter essas linhagens, serão também abordadas.

5.2 Problematizando o tema

A produção de álcool combustível no Brasil possui duas peculiaridades em relação a outras fermentações industriais: não há esterilização do mosto para remoção da microbiota nativa da cana-de-açúcar, e as células de leveduras são continuamente recicladas ao longo da safra.

Inicialmente, a levedura escolhida para ser inoculada nas dornas é propagada aerobicamente até a obtenção de volume de massa celular suficiente para iniciar a fermentação. Essa massa é reciclada e reutilizada durante toda a safra, após a centrifugação do mosto fermentado. As células retornam às dornas de fermentação após tratamento ácido (FIGUEIREDO, 2008).

O estudo das características fermentativas das linhagens selvagens isoladas de processos industriais permitiu a seleção de cepas apropriadas à fermentação com reciclo, da forma como é conduzida no Brasil. Características como alto rendimento em etanol, baixa formação de glicerol, não floculante, não formadora de espuma, manutenção de alta viabilidade celular durante os reciclos e altos conteúdos de trealose, devem ser consideradas num programa de seleção de linhagens para a fermentação (BASSO et al., 2008).

Foi na década de 1990, com a utilização da técnica de cariotipagem eletroforética para a identificação de leveduras (espécies e linhagens), que se iniciou a seleção das primeiras linhagens de *S. cerevisiae* com habilidade de permanência nos processos industriais.

As leveduras devem, assim, ser avaliadas sob o ponto de vista da dominância e persistência (permanência), pois além de serem capazes de dominar o ambiente das dornas de fermentação, não permitindo que contaminantes se sobressaiam, devem resistir aos constantes fatores estressantes impostos pelo ambiente e manter altas taxas de viabilidade celular ao longo da safra. Várias estratégias devem ser, portanto, estudadas para atingir tais objetivos.

5.2.1 Fatores que afetam as leveduras fermentativas

As destilarias no Brasil têm utilizado tradicionalmente leveduras da panificação como iniciadoras da fermentação, por causa de seu baixo custo e disponibilidade em grandes quantidades. No entanto, estudos têm mostrado que elas não conseguem competir com as leveduras selvagens que contaminam o processo, e estas acabam por dominar as dornas de fermentação (BASSO et al., 1993; SILVA FILHO et al., 2005).

A dificuldade de sobrevivência das leveduras de panificação pode estar relacionada às condições estressantes impostas pela fermentação alcoólica, como alta concentração de etanol, alta temperatura, pressão osmótica devido aos sais e açúcares, acidez, sulfito e contaminação bacteriana, com muitas delas agindo sinergisticamente (DORTA et al., 2006).

Outro fator que afeta o rendimento fermentativo é a presença de níveis tóxicos de alumínio e potássio, pois as condições ácidas do meio de fermentação liberam alumínio em sua forma tóxica (Al^{3+}), reduzindo a viabilidade celular, os níveis de trealose celulares e a taxa de fermentação, com impacto negativo nos rendimentos em etanol. A adição de magnésio alivia os efeitos tóxicos do alumínio (BASSO et al., 2004). Altos níveis de potássio também exercem efeito prejudicial na fermentação (ALVES, 1994).

5.2.2 Estudo comparativo das linhagens de leveduras utilizadas na fermentação alcoólica

Basso et al. (2008) realizaram um extenso programa de seleção de linhagens de leveduras durante 12 anos, com a finalidade de encontrar linhagens de *S. cerevisiae* adequadas para a fermentação de substratos de cana-de-açúcar (caldo e melaço) com reciclo celular, como é conduzido no Brasil.

Quando o estudo foi iniciado em 1993, havia poucas linhagens disponíveis para a fermentação (fermento de panificação como Fleishmann e Itaiquara, JA-1, TA e IZ-1904). Na safra seguinte (1994/1995), outras linhagens foram disponibilizadas, como a BG-1, CR-1 e SA-1, isoladas pela Copersucar, Piracicaba-SP.

Por meio da cariotipagem, foi verificado que após cerca de 20-30 dias do início da safra (do reciclo celular) a levedura da panificação era substituída por linhagens selvagens. O mesmo ocorria com as linhagens IZ-1904, TA e outras marcas de fermento de panificação. Observou-se, no entanto, que as linhagens previamente isoladas do ambiente industrial (BG-1, CR-1 e SA-1) mostravam longa persistência, mantendo-se por até 180-190 dias de reciclo.

Outra linhagem de *S. cerevisiae*, PE-2, isolada do processo industrial pela Fermentec apresentou também parâmetros fisiológicos e tecnológicos marcantes. A Tabela 3 traz os dados comparativos entre essa linhagem selecionada e a levedura da panificação quanto aos parâmetros fermentativos.

Há uma pequena diferença no rendimento em etanol (%) entre a PE-2 e a levedura da panificação, o que significa um aumento de 2,1 milhões de litros de etanol por safra em uma destilaria de média capacidade.

Tabela 3 Parâmetros fisiológicos e tecnológicos da linhagem selecionada PE-2 e da levedura da panificação durante os ciclos fermentativos, utilizando caldo de cana e melaço como substratos a 33 °C e com 9,1% (vol/vol) de etanol produzido.

| Parâmetro fermentativo | Linhagens | |
|-------------------------|------------------|------|
| | Lev. panificação | PE-2 |
| Rendimento etanol (%)* | 88,1 | 92 |
| Glicerol (%)* | 5,4 | 3,38 |
| Ganho de biomassa (%)** | 5,8 | 8,2 |
| Viabilidade (%)*** | 48 | 94 |
| Trealose (%)**** | 4 | 9,5 |
| Glicogênio (%)**** | 9 | 16 |

Os dados referem-se a cinco ciclos fermentativos (em média), em triplicata.

* Fração de açúcar convertido em etanol ou glicerol.

** Ganho de biomassa por ciclo fermentativo.

*** Viabilidade celular ao final do último ciclo fermentativo.

**** Carboidrato de reserva ao final do último ciclo fermentativo.

Fonte: adaptada de Basso et al. (2008).

A mais baixa porcentagem de glicerol apresentada pela levedura selecionada é um fator importante a ser considerado, pois sabe-se que o glicerol é formado em resposta aos fatores de estresse (especialmente osmótico), como indicado por Walker (1998). A reduzida taxa de viabilidade associada à mais alta concentração de glicerol e níveis inferiores de glicogênio e trealose intracelulares indicam que a levedura de panificação não consegue sobreviver nas condições da fermentação, o que poderia explicar o tempo curto de permanência nas dornas.

A trealose age como um protetor de estresse e, junto com o glicogênio, pode ajudar a levedura a superar as condições fisiológicas adversas (WALKER, 1998). No trabalho de Basso et al. (2008), os autores ainda colocam que níveis de trealose abaixo de 0,2% afetam a viabilidade celular, e que a capacidade das leveduras selecionadas de manter os altos níveis de trealose durante o reciclo celular deve contribuir para a maior tolerância ao estresse.

As linhagens BG-1, CAT-1, CR-1 e VR-1 apresentam perfis fermentativos muito similares ao da PE-2, conforme Basso et al. (2008).

A CAT-1 destaca-se entre as três leveduras mais amplamente utilizadas na produção industrial de etanol no país. Durante a safra 2007/2008, juntamente com a linhagem PE-2, essa levedura foi utilizada por cerca de 150 destilarias, que respondem por cerca de 60% do álcool combustível produzido no Brasil. A resposta para as vantagens dessa nova linhagem em relação às demais deve-se ao fato de a levedura CAT-1 conter genes que produzem uma quantidade maior das vitaminas B1 (tiamina) e B6 (piridoxina) em comparação a outros tipos de fermento. As vitaminas são essenciais para uma maior sobrevivência da levedura durante o processo de fermentação (FERMENTEC, 2010).

A CAT-1 foi a primeira levedura para a produção de etanol a ter o genoma sequenciado, num trabalho conjunto entre Universidade Federal de Santa Catarina, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Fermentec e Universidade de Stanford (EUA). O sequenciamento constitui um primeiro passo que permitirá conhecer melhor a fisiologia da levedura e as adaptações necessárias para melhorar o rendimento fermentativo, mesmo nas condições estressantes do ambiente industrial. Além disso, o genoma poderá ser disponibilizado a toda a comunidade científica, o que permitirá desenvolver estratégias visando o melhoramento genético das leveduras industriais (ERENO, 2010).

Essa levedura é também utilizada para produzir uísque na Escócia, e álcool a partir de cereais no Canadá, porém no Brasil ela está voltada exclusivamente para a produção de álcool. Em termos práticos, a CAT-1 aumenta o rendimento fermentativo, gera maior economia com antiespumantes (as leveduras selecionadas fazem pouca espuma), e por não ser floculante deixa menos açúcar sem fermentar, ao contrário das leveduras selvagens (BIOTEC-AHG, 2010).

Uma vez implantadas nas destilarias, as linhagens selecionadas podem reduzir os custos de produção do etanol não somente pelo fato de aumentar o rendimento em etanol ou de simplificar as operações e o manejo da fermentação, mas também por reduzir o consumo de antiespumantes, acarretando importante economia.

5.2.3 Estratégias para seleção de linhagens de leveduras

Uma grande biodiversidade de leveduras é encontrada na fermentação industrial, no entanto, a maioria delas não apresenta características de dominância ou persistência. Aquelas que acabam prevalecendo devem, portanto, receber especial atenção, pois sugerem competitividade e tolerância ao estresse.

Ainda que expressem as características acima, muitas delas mostram características fermentativas indesejáveis, como excessiva formação de espuma,

alta taxa de sedimentação, maior tempo de fermentação e alto teor de açúcar residual após a fermentação.

Entre as leveduras selvagens normalmente encontradas nas dornas, encontram-se linhagens (normalmente *S. cerevisiae*) que apresentam colônias rugosas, frequentemente associadas ao crescimento pseudo-hifal (células não dispersas), e com alta taxa de sedimentação durante a fermentação. Essa característica afeta a operação de centrifugação, pois a maioria das unidades produtoras de etanol opera com suspensões de leveduras homogêneas. Ocorre aumento do tempo de fermentação e alta concentração de açúcar residual, impactando o rendimento em etanol (CECCATO-ANTONINI & PARAZZI, 1996; BASSO et al., 2008).

Dessa forma, a estratégia de coletar o fermento ao final da safra para isolamento de linhagens, que por sobreviverem ao longo dos ciclos fermentativos têm obviamente características de dominância, persistência e tolerância ao estresse, pode resultar no isolamento de leveduras com características fermentativas indesejáveis. Essa é uma prática frequente em muitas unidades produtoras de etanol.

É necessário realizar um programa de seleção, em que características indesejáveis como alta formação de espuma, floculação e altas concentrações de açúcar residual sejam inicialmente verificadas nas leveduras. A seguir, testes que simulem a fermentação industrial para avaliação de altos rendimentos em etanol, baixa formação de glicerol, altas viabilidades durante o reciclo celular e altos níveis de trealose e glicogênio devem ser aplicados às linhagens selecionadas inicialmente.

A estratégia de seleção de linhagens termotolerantes, tolerantes a etanol ou a outro fator considerado isoladamente não resulta em linhagens com sucesso na indústria, pois, para sobreviver no ambiente de fermentação, a levedura deve ser simultaneamente tolerante a muitos fatores estressantes (BASSO et al., 2008).

Recomenda-se a cariotipagem para a detecção e posterior isolamento de linhagens com alta capacidade de dominância e persistência ao longo dos ciclos, complementando-se a seleção com a avaliação do desempenho fermentativo. Assim, é o próprio processo industrial que age como pressão seletiva para a seleção de linhagens.

Outras estratégias têm sido também aplicadas, envolvendo o melhoramento genético clássico e a engenharia genética. Um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina modificou a forma como a levedura *S. cerevisiae* produz a enzima invertase, responsável por acelerar o processo de hidrólise (quebra) dos carboidratos da sacarose, transformando-os em glicose e frutose. Essa reação, que ocorre do lado de fora da célula da levedura, é chamada de hidrólise extracelular. Com a alteração da invertase por meio da modificação do gene específico para essa enzima, o açúcar passou a ser transportado

e fermentado diretamente no interior da levedura. Com a hidrólise extracelular, outras leveduras e bactérias presentes nas dornas de fermentação passam a se utilizar da glicose e da frutose. A atividade desses microrganismos pode levar à produção de ácidos orgânicos que resultam em perdas na produção de etanol. Essa levedura geneticamente modificada será testada em uma destilaria para avaliar como ela se comporta nas condições de fermentação (ERENO, 2010).

Utilizando técnicas de genética clássica, pesquisadores da Universidade Estadual Paulista (Unesp), de Araraquara, obtiveram um híbrido a partir de leveduras selecionadas. Para chegar a essa levedura, foram selecionadas várias linhagens de *S. cerevisiae* encontradas em usinas que apresentavam características como tolerância ao calor e rápido consumo de açúcar para produção de etanol. Depois de vários testes e combinações, foi obtida uma levedura híbrida, que recebeu marcadores genéticos que permitem o seu monitoramento durante todo o processo de fermentação alcoólica.

Essa levedura também mostrou em testes de laboratório ser uma excelente produtora de álcool e resistente a altas temperaturas, com potencial de fermentação entre 37 °C e 38 °C com pouca mortalidade celular. É muito difícil controlar a temperatura do processo de fermentação no verão, no entanto uma elevação acima de 36 °C causa um aumento da toxidez do álcool sobre as células das leveduras, ocasionando a morte celular.

Além disso, a levedura híbrida apresentou um tempo mais curto de fermentação, pois, se pelo processo tradicional leva-se de 6 a 12 horas, ela faz a conversão total do açúcar em até três horas. Isso representa uma vantagem porque quanto mais longo o tempo de fermentação, maiores são os efeitos dos microrganismos contaminantes e de outros fatores agressivos do processo sobre o fermento, como temperatura elevada e deficiência nutricional. A nova cepa também resiste a quantias elevadas de etanol e à acidez em ciclos sucessivos de fermentação (ERENO, 2010).

5.3 Considerações finais

Há na natureza uma grande diversidade de cepas de *S. cerevisiae*, que apesar de serem da mesma espécie, podem ser muito diferentes das outras quanto ao seu genótipo e fenótipo. Por estarem em nichos ecológicos específicos (florestas, padarias, cervejarias, destilarias e cervejarias, por exemplo), apresentam características adaptadas ao seu papel ecológico.

Essa diversidade natural de *S. cerevisiae* possibilita a busca por linhagens adequadas à produção de compostos específicos ou às aplicações em

fermentações ou outros processos biotecnológicos. Essa busca pode ser casual ou dirigida, utilizando-se técnicas de rastreamento sistemático de linhagens candidatas.

As leveduras *S. cerevisiae* são usadas na produção de vários tipos de bebidas, como vinho, cerveja, saquê, champagne, cachaça, produção de álcool combustível e fermento de panificação, porém são linhagens bastante diferentes, pois foram isoladas de populações selvagens de diferentes locais. Além disso, as características procuradas para produção de bebida fermentada, como aromas desejáveis, não são as mesmas para a produção de álcool combustível, por exemplo.

Uma estratégia utilizada para a obtenção de linhagens apropriadas é a exploração da diversidade genética natural de *S. cerevisiae*, juntamente com a pressão seletiva para a evolução adaptativa, como a que se tem realizado na seleção de leveduras para a fermentação alcoólica para produção de etanol combustível.

Técnicas mais avançadas de engenharia genética e de engenharia metabólica são estratégias complementares para o isolamento acelerado e a construção de cepas de *S. cerevisiae* que produzem biocombustíveis de alta produtividade (FERNANDES et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 66, p. 641-647, 2005.
- AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS. *Workshop produção de etanol*. 2006. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/termo_referencia_etanol.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2010.
- AGROSOFT BRASIL. Descoberto agente de contaminação industrial nas destilarias de cana-de-açúcar. *Agrosoft Brasil*, 26 ago. 2008. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/agropag/102125.htm>. Acesso em: 18 abr. 2010.
- ALCOBA-FLÓREZ, J.; ARÉVALO-MORALES, M. P.; PÉREZ-ROTH, E.; LAICH, F.; RIVERO-PÉREZ, B.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Yeast molecular identification and typing. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badajoz: Formatex, 2007. v. 2, p. 535-546. Disponível em: <<http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages535-546.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2010.
- ALCOOLBRÁS. Guerra contra as bactérias. *ALCOOLbrás*, São Paulo, n. 91, 2005. Disponível em: <http://www.editoravalete.com.br/site_alcoolbras/edicoes/ed_91/ed_91_2.html>. Acesso em: 05 abr. 2010.
- ALTHERTUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, P. M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB*, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.
- ALVES, D. M. G. *Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- AMORIM, H. V. *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.
- _____. Melhoria na fermentação: pesquisas e medições. *Opiniões*, Ribeirão Preto, out./dez. 2005. Disponível em: <<http://www.revistaopinioes.com.br/aa/materia.php?id=299>>. Acesso em: 12 abr. 2010.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STROPPIA, C. T. Caracterização das leveduras floculantes selecionadas em reator tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 14., 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: UFSC, 2003.
- ARAUJO, R. A. C.; GOMES, F. C. O.; MOREIRA, E. S. A.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A. Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* populations by mtDNA restriction analysis and other molecular typing methods during spontaneous fermentation for production of the artisanal cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 38, p. 217-233, 2007.
- AVANSINI, S. H. *Caracterização molecular e tolerância ao etanol de linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação etanólica*. Araras, 2009. Relatório FAPESP. 47 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts: characteristics and identification*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 811 p.

BASÍLIO, A. C. M.; PINHEIRO, W.; BRASILEIRO, B.; MORAIS Jr., M. A.; SIMÕES, D. A. Utilização do padrão de amplificação com marcador (GTG)5 para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., 2005, Recife. *Anais...* Recife, 2005.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 1., 2006, Lorena. *Palestra...* Lorena: EEL, 2006.

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

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F. D. M.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H. V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. *Anais...* Piracicaba: STAB, 1993. p. 246-250.

BASSO, L. C.; PAULILO, S. C. L.; RODRIGUES, D. A.; BASSO, T. O.; AMORIM, H. V.; WALKER, G. M. *Aluminium toxicity towards yeast fermentation and the protective effect of magnesium*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS – YEASTS IN SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY – THE QUEST FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 11., 2004, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 2004. p. 14.

BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Stellenbosch, v. 21, p. 27-51, 2000.

BIOTEC-AHG. *Importante levedura para a produção de etanol é seqüenciada*. 2007. Disponível em: <<http://www.biotec-ahg.com.br/index.php/acervo-de-materias/biocombustiveis/355-importante-levedura-para-a-producao-de-etanol-e-sequenciada>>. Acesso em: 27 maio 2010.

BOVI, R.; MARQUES, M. O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. *Álcool e açúcar*, São Paulo, v. 3, n. 9, p. 10-13, 1983.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa. *STAB*, Piracicaba, v. 17, n. 4, p. 48-50, 1999.

CASTRO, M. M. S. *Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica*. 1995. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Monitoramento microbiológico em destilarias: uma necessidade. *STAB*, Piracicaba, v. 16, n. 5, p. 18-19, 1998.

_____. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 1151-1161, 2008.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6., 1996, Maceió. *Anais...* Piracicaba: STAB, 1996. p. 23-39.

_____. Monitoramento microbiológico da fermentação etanólica: uma experiência. *JornalCana*, Ribeirão Preto, p. 25-26, jan. 2000.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; SILVA, D. F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. *STAB*, Piracicaba, v. 18, n. 4, p. 40-46, 2000.

CONSTANTI, M.; POBLET, M.; AROLA, L.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 48, p. 339-344, 1997.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M. S.; NICOLU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02 and M-26). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Amsterdam, v. 22, p. 177-182, 2006.

ERENO, D. Novas cepas de leveduras são mais eficientes na conversão da sacarose em etanol. *Revista FAPESP*, São Paulo, n. 161, p. 66-69, 2009. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3901&bd=1&pg=1&lg=>>>. Acesso em: 27 maio 2010.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Ames, v. 49, p. 329-337, 1999.

FERMENTEC. *Roteiro para treinamento de controle microbiológico por microscopia*. Piracicaba: Fermentec, [200-?]. 47 p.

_____. *Revelado o código genético da CAT-1*. 2007. Disponível em: <<http://www.fermentec.com.br/br/news/Fermentec%20News%2002%20-%202007.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2010.

FERNANDES, P. M. B.; FERNANDES, A. A. R.; GHELFI, A.; PADDON, C.; ABBOTT, D.; BELISSIMI, E.; BRAVIM, F.; KEALEY, J.; GALAZZO, J.; ZAHN, K.; BENJAMIN, K.; DI CIERO, L. *Levedura: do pão à biotecnologia*. Vitória: EDUFES, 2009. 118 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 222 p.

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

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. *STAB*, Piracicaba, v. 9, n. 6, p. 35-37, 1991.

GOMES, F. C. O.; ARAUJO, R. A. C.; CISALPINO, P. S.; MOREIRA, E. S. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A. Comparison between two selected *Saccharomyces cerevisiae* strains as fermentation starters in the production of traditional cachaça. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 52, n. 2, p. 449-455, 2009.

GOMES, L. H.; DUARTE, K. M. R.; ARGUESO, J. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F. C. A. Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiology*, London, v. 17, p. 217-223, 2000.

- GREEN, J. R.; GRAY, P. P. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein Laboratory Communications*, New York, v. 13, n. 43, p. 357-368, 1950.
- GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Flocculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica: I. método de detecção preventiva e estudos para o controle. *STAB*, Piracicaba, v. 16, n. 6, p. 25-27, 1998.
- GUIMARÃES, P. M.; SÁ, M. F. G. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismos. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). *Recursos genéticos & melhoramento: Microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa, 2002. p. 129-147.
- GUIMARÃES, T. M. *Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura Saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho*. 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- GUTIERREZ, A. R.; LÓPEZ, R.; SANTAMARIA, P.; SEVILLA, M. J. Characterization of oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular fatty acid and mtDNA restriction polymorphism analysis. *Sciences des Aliments*, Paris, v. 20, p. 321-330, 2000.
- HENRIKSSON, A.; SZEWSYK, R.; CONWAY, P. L. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, n. 2, p. 499-502, 1991.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. *The yeasts: a taxonomic study*. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.
- LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WONG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, New York, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LIN, Y. Detection of wild yeasts in the brewery. Efficiency of differential media. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 81, p. 410-417, 1975.
- LONGLEY, R. P.; DENNIS, R. R.; HEYER, M. S.; WREN, J. J. Selective *Saccharomyces* media containing ergosterol and Tween 80. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 84, p. 341-345, 1978.
- LÓPEZ, V.; QUEROL, A.; RAMÓN, D.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 68, p. 75-81, 2001.
- LUCENA, B. T. L. *Análise de polimorfismos cromossômicos em linhagens de leveduras da fermentação alcoólica*. 2004. 82 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- LUCENA, B. T. L.; SILVA FILHO, E. A.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; MORAIS Jr., M. A. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 6, n. 4, p. 1072-1084, 2007.

LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice-Hall, 2004. 608 p.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MARÇAL, V. M. *Isolamento e caracterização morfo genética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos*. 2005. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

MENEGHIN, M. C. *Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de Dekkera contaminantes da fermentação alcoólica*. 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Dióxido de cloro contra bactérias e leveduras da fermentação alcoólica. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 337-343, 2008.

MILL, P. J. The nature of interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, Reading, v. 35, p. 61-68, 1964.

MORRIS, E. O.; EDDY, A. A. Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 63, p. 34-35, 1957.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

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

OLIVEIRA, M. C. F. L.; SILVA, R. B. O. Biotipo *Saccharomyces cerevisiae* em cadeias multicelulares ramificadas na fermentação contínua. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 17., 1993, Santos. *Resumos...* São Paulo, 1993. p. 79.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. 566 p.

PÉREZ, M. A.; GALLEGO, F. J.; HIDALGO, P. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 205, p. 375-378, 2001.

PÉREZ-ORTÍN, J. E.; QUEROL, A.; PUIG, S.; BARRIO, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Research*, New York, v. 12, p. 1533-1539, 2002.

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. *Genética de fungos no laboratório*. Manaus: Universidade do Amazonas, 1998. 138 p.

- PRADA, G. M. M.; CASTRO, M. M. S. *Usinas de açúcar e álcool: estudo das leveduras e dos fatores que afetam a fermentação*. Campinas: FTPT, 1995. 49 p.
- PUIG, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E.; PÉREZ-ORTÍN, J. E. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 66, p. 2057-2061, 2000.
- QUEROL, A.; BARRIO, E. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, London, v. 18, n. 6, p. 1657, 1990.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RÁMON, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, n. 9, p. 2948-2953, 1992.
- QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; OMO, M. L. del; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 86, p. 3-10, 2003.
- SATO, M.; WATARI, J.; SHINOTSUKA, C. Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Saint Paul, v. 59, n. 3, p. 130-134, 2001.
- SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, R. C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, Cambridge, v. 37, p. 67-75, 1984.
- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, Piracicaba, v. 93, n. 6, p. 336-341, 1979.
- SILVA FILHO, E. A. *Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação*. 2003. 108 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- SILVA FILHO, E. A.; BRITO DOS SANTOS, S. K.; RESENDE, A. M.; MORAIS, J. O.; MORAIS Jr., M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v. 88, p. 13-23, 2005.
- SOUZA-LIBERAL, A. T. *Identificação molecular da levedura *Dekkera bruxellensis* como principal contaminante do processo de fermentação alcoólica industrial*. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- STECKELBERG, C.; ROSSI, R. A.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. O uso da cariotipagem como técnica de identificação e diferenciação de cepas de levedura de fermentação alcoólica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. *Anais...* Curitiba: SINAFERM, 2007.
- STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Davis, v. 5, p. 441-445, 1989. Edição especial.
- STRATFORD, M.; COLEMAN, H. P.; KEENAN, M. H. J. Yeast flocculation: a dynamic equilibrium. *Yeast*, Davis, v. 4, n. 3, p. 199-208, 1988.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 2003. 827 p.

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

UNICA. Produção e consumo de etanol avançarão 150% até 2020. *Unica*, São Paulo, 30 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=%7B9FA21848-2AE3-4684-A682-3B5A626890C5%7D>>. Acesso em: 12 abr. 2010.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 61, n. 3, p. 197-205, May 2003.

WALKER, G. M. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. 350 p.

WALT, J. P. V.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast. In: KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (Ed.). *The yeasts: a taxonomy study*. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 45-104.

WALTERS, L. S.; THISELTON, M. R. Utilization of lysine by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 59, p. 401, 1953.

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

ZARATTINI, R. A.; WILLIAMS, J. W.; ERNANDES, J. R.; STEWART, G. G. Bacterial induced flocculation in selected brewing strains of *Saccharomyces*. *Cerevisa and Biotechnology*, v. 18, n. 4, p. 65-75, 1993.

SOBRE A AUTORA

Sandra Regina Ceccato-Antonini

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista (Unesp) em 1984, Mestrado (1989) e Doutorado em Ciências Biológicas (1993), pela mesma universidade. Pós-doutorado pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), e Universidade de Sheffield, Inglaterra, em Genética Molecular de Leveduras. Atualmente é professora associada da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* de Araras, responsável pelas disciplinas de Fundamentos de Microbiologia, Taxonomia e Genética Microbiana, Processos agroindustriais 2 – Fundamentos microbiológicos, Biotecnologia de Resíduos e Introdução à Biotecnologia, nos cursos de graduação em Engenharia Agrônômica e Bacharelado em Biotecnologia. Ministra palestras no curso de especialização *lato sensu* na área sucroalcooleira e disciplina no curso a distância Tecnologia Sucroalcooleira. É professora credenciada em cursos de Pós-Graduação na UFSCar e na ESALQ – USP, onde orienta dissertações de alunos em Microbiologia da Fermentação Alcoólica e em Produção de Cachaça Artesanal. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Industrial e de Fermentação.

