

ESTUDO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS  
DE LEVEDURAS ISOLADAS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS  
ANDINAS E BRASILEIRAS, E DE AMOSTRAS DE FLORES,  
FRUTAS, MELACO E MOSTO DE USINAS DE ACÚCAR E ÁLCOOL

*Características*

*10/90*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE  
LEVEDURAS ISOLADAS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS E  
BRASILEIRAS, E DE AMOSTRAS DE FLORES, FRUTAS, MELACO

Parecer E MOSTO DE USINAS DE AÇÚCAR E ÁLCOL

Este exemplar corresponde  
a redação final da tese  
defendida por Carmen Josefina  
Contreras Castillo e aprovada  
pela comissão julgadora em

Carmen Josefina Contreras Castillo

13.06.90.

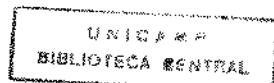
Caçapéus, 13 de junho/90 Engenheira em Indústrias Alimentares

ORIENTADOR

Dr. YONG KUN PARK

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do  
Título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas - S. P. - 1990



BANCA EXAMINADORA

*S. C. Park*  
Prof. Dr. Yong Kun Park  
(orientador)

*Mirtha Ubaldi*  
Dra. Mirtha Ubaldi E.  
(membro)

*Vanderlei Perez Canhos*  
Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos  
(membro)

*Lucia R. A. Jafelice*  
Prof. Dra. Lucia R. A. Jafelice  
(membro)

Campinas, 12 de fevereiro de 1990

Aos meus pais, URBANO e JOSEFINA  
como ideais de caráter, exemplo  
de dedicação e amor

Aos meus irmãos, LOURDES, ANGEL,  
DANIEL e SIMEON, pela ajuda e  
apoio moral

DEDICO

As minhas amigas MYRIAM, ERLY e  
PROF. DRA. DÉBORA pela amizade,  
incentivo, ajuda, e estímulo nas  
horas difíceis..... minha

GRATIDÃO

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Yong Kun Park pela sua orientação na preparação deste trabalho.

A Professora Hélia Harumi Sato pela colaboração e objetivas sugestões durante o decorrer do trabalho experimental.

As Professoras Gláucia Maria Pastore e Dra. Lucia R. A. Jafelice pela ajuda, revisão e colaboração no trabalho.

A Denise, Betty, Edna e Elena pela amizade e correção da redação.

A Dra. Isabel Manrique de Sáenz pela amizade e informação proporcionada das bebidas alcoólicas de Peru.

Ao Professor Ramón Hinojosa, aos amigos Eduardo, José Aníbal e Jorge pelo fornecimento de amostras de bebidas alcoólicas de Chile, Bolívia, Peru e Colômbia.

Aos colegas Ing. Jorge Canessa Galván e Ing. Víctor Bravo pela amizade, ajuda, colaboração de informação e envio das amostras.

A todas as pessoas que participaram comigo do dia-a-dia do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

A FEA, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

A CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

A ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pela edição deste trabalho.

## INDICE

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ORIGEM HISTÓRICA.....	3
2.2. ELABORAÇÃO DA CHICHA DE JORA.....	4
2.2.1. Elaboração de Jora ou Malte de Milho.....	4
2.2.2. Elaboração de Chicha de Jora.....	5
2.2.3. Elaboração do Masato.....	7
2.2.4. Outros Tipos de Chichas.....	7
2.3. LEVEDURAS.....	8
2.3.1. Características Gerais.....	8
2.3.2. Características Bioquímicas.....	9
2.3.2.1. Coloração com Cloreto 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium (TTC).....	9
2.3.2.2. Fator Killer em Levedura.....	14
2.3.2.3. Fermentação Alcoólica.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. SELEÇÃO DAS LEVEDURAS.....	29
3.1.1. Coleta de Amostras.....	29
3.1.2. Isolamento e Seleção das Leveduras.....	31
3.2. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS LEVEDURAS.....	32
3.2.1. Estudo do comportamento das leveduras ao Cloreto 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium (TTC).....	32
3.2.2. Estudo do Desenvolvimento em Diferentes Temperaturas.....	33
3.2.3. Detecção do Fator "Killer".....	33
3.2.4. Estudo de Fermentação Alcoólica.....	35

<b>3.3. IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Características Morfológicas das Leveduras.....	36
3.3.1.1. Morfologia das Leveduras em Meio Líquido e Sólido.....	36
3.3.1.1.1. Crescimento em Meio Lí- quido.....	36
3.3.1.1.2. Crescimento em Meio Sólido....	37
3.3.1.2. Formação de Pseudomicélio e Micélio Verdadeiro.....	37
3.3.2. Características Sexuais: Formação de Asco e Ascosporos.....	39
3.3.3. Características Fisiológicas e Bioquímicas.....	40
3.3.3.1. Utilização de Compostos de Carbono.....	40
3.3.3.1.1. Fermentação de Carboidratos..	40
3.3.3.1.2. Assimilação de Compostos de Carbono.....	41
3.3.3.2. Assimilação de Compostos de Nitrogênio- Nitrato de Potássio (KNO <sub>3</sub> ).....	41
3.3.3.3. Crescimento em Solução de 10% de Cloreto de Sódio 10% e 5% de Glicose....	42
3.3.3.4. Crescimento a 37°C e outras Tempe- raturas Máximas de Crescimento.....	42
3.3.3.5. Crescimento em Meio Livre de Vitamina....	42
3.3.3.6. Resistência a Cicloheximida (Actidiona).....	43
3.3.3.7. Reação de Coloração com Diazonium Blue (DBB).....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS.....</b>	<b>45</b>
4.1.1. Isolamento das leveduras de bebidas alcoóli- cas andinas.....	45
4.1.2. Isolamento das leveduras das bebidas alcoóli- cas brasileiras e de amostras de flores, frutas, melão, polvilho azedo e mosto de usinas de açúcar e álcool.....	45
<b>4.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS E SELECIIONADAS.....</b>	<b>46</b>
4.2.1. Estudo do comportamento das leveduras ao Cloreto 2,3,5 Trifeniltetrazolium (TTC).....	46
4.2.2. Desenvolvimento em temperatura elevada.....	48
4.2.3. Detecção do Fator Killer.....	48
4.2.4. Estudo de Fermentação Alcoólica.....	52

4.3. IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	71
4.3.1. Características Morfológicas.....	72
4.3.2. Características Fisiológicas e Bioquímicas.....	81
4.3.2.1. Utilização de Compostos de Carbono.....	81
4.3.2.1.1. Fermentação de Açúcares.....	81
4.3.2.1.2. Assimilação de Compostos de Carbono.....	83
4.3.2.2. Assimilação de Compostos de Nitrogênio-Nitrato de Potássio (KNO <sub>3</sub> ).....	84
4.3.2.3. Crescimento em Solução de 10% de Cloreto de Sódio e 5% de Glicose.....	85
4.3.2.4. Crescimento a 37°C e outras Tempe- raturas Máximas de Crescimento.....	85
4.3.2.5. Crescimento em Meio Livre de Vita- mina.....	85
4.3.2.6. Ressistência a Cicloheximida (Actidiona).....	86
4.3.2.7. Coloração com Diazonium Blue (DBB).....	86
4.3.3. Identificação e Classificação das Cepas de Leveduras Selecionadas.....	87
5. CONCLUSÕES.....	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das leveduras "Killer".....	19
Quadro 2 - Características morfológicas das células de leveduras isoladas das bebidas alcoólicas andinas.....	45
Quadro 3 - Número e porcentagem das colônias de leveduras coloridas com o TTC provenientes das 45 amostras de bebidas alcoólicas andinas.....	47
Quadro 4 - Desenvolvimento das cepas de leveduras cultivadas a diferentes temperaturas em Meio YPDA e YM.....	48
Quadro 5 - Resposta e produção de fator "Killer" de leveduras provenientes de bebidas alcoólicas andinas de cepas de leveduras provenientes de bebidas brasileiras, e de outras fontes (flores, frutas, melaco e mosto de usinas de fermentação).....	49
Quadro 6 - Fator "Killer" das cepas de leveduras selecionadas.....	51
Quadro 7 - Produção de C <sub>O</sub> e por cepas de leveduras isoladas de bebidas alcoólicas andinas que apresentaram maior poder fermentativo em caldo de melaco e coloração das cepas de leveduras com o TTC.....	54
Quadro 8 - Produção de C <sub>O</sub> e durante a fermentação a 40°C e a 43°C, por cepas selecionadas de leveduras isoladas de bebidas alcoólicas andinas .....	68
Quadro 9 - Características morfológicas das leveduras selecionadas, observadas em meio sólido e em meio líquido .....	73
Quadro 10 -Características fisiológicas e bioquímicas das diferentes cepas de leveduras selecionadas.....	82
Quadro 11 -Identificação e classificação das diferentes cepas de leveduras selecionadas.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de elaboração da "chicha de jora".....	6
Figura 2 - Fluxograma de elaboração de "masato".....	7
Figura 3 - Localização dos pontos de coleta de amostras de bebidas alcoólicas no Peru.....	30
Figura 4 - Representação esquemática da técnica de Dalmau para observação da formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro.....	38
Figura 5 - Fator "Killer" apresentado pelas cepas de leveduras (9-75, 15-72 e 22-90) isoladas das bebidas alcoólicas andinas .....	50
Figura 6 - Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 2-18, 3-22, 3-24, 4-27, 2-14, 1-5, 3-23, 4-28, 1-10, 3-26, 3-21, 2-12, 2-19 e 1-11 atuando sobre melado de cana à 30°C e comparadas com as cepas comerciais.....	55
Figura 7 - Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 5-34, 9-75, 15-72, 2-13, 21-28, 2-20, 1-4 e 1-2 atuando sobre melado de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais .....	56
Figura 8 - Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 11-50, 6-39, 8-43, 11-55, 8-44, 19-81, 11-51, 12-57, 14-66, 1-9, 6-37 e 4-29 atuando sobre melado de cana à 30°C e comparadas com as cepas comerciais..	57
Figura 9 - Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 5-33, 13-61, 11-53, 12-59, 12-56, 13-63, 12-60, 13-62, 4-31, 2-17, 4-30, e 5-35 atuando sobre melado de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	58
Figura 10 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 11-52, 6-38, 10-49, 10-48, 10-46, 7-40, 8-42 e 5-36 atuando sobre melado de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	59
Figura 11 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 15-70, 19-82, 16-74, 19-83, 14-66, 13-64, 14-67, 17-77 e 17-78, atuando sobre melado de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	60
Figura 12 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 21-86, 11-54, 7-41, 2-16, 12-58, 16-73, 23-93, 9-45, 1-7, 14-65 e 5-34, atuando sobre melado de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	61

Figura 13 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 21-87, 20-84, 20-85, 23-93, 23-92, atuando sobre melaço de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	62
Figura 14 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 24-2, 27-1, 30-1, 29-3, 29-2 e 30-3, atuando sobre melaço de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	63
Figura 15 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 32-1, 33-1, 31-1, 34-2, 33-2, 32-3, 31-2, 31-3 e 32-2, atuando sobre melaço de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	64
Figura 16 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 34-1, 26-1, 37-2, 28-1, 36-2, 25-1, 35-2 e 25-2, atuando sobre melaço de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	65
Figura 17 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 119-2, 118-2, 37-1, 119-1, 36-3, 115-2p, 115-1g, 36-1, 120-1, 35-1, 117, 118-1 e 378, atuando sobre melaço de cana à 30°C comparadas com as cepas comerciais.....	66
Figura 18 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 9-75, 15-72, 15-70 e 2-13, atuando sobre melaço de cana à 40°C comparadas com as cepas comerciais.....	69
Figura 19 -Formação de C <sub>O<sub>2</sub></sub> por cepas de leveduras 9-75, 15-72, 15-70 e 2-13, atuando sobre melaço de cana à 43°C comparadas com as cepas comerciais .....	70
Figura 20 -Crescimento em meio sólido (YPDA) das cepas de leveduras 9-75 e 15-72 isoladas das bebidas alcoólicas andinas.....	79
Figura 21 -Crescimento em meio sólido (YPDA) das cepas de leveduras 10-46 e 115-2p isoladas das bebidas alcoólicas andinas.....	80

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi estudar leveduras componentes da microbiota de bebidas alcoólicas, melão e mosto de usinas de açúcar e álcool, frutas e flores e sua provável utilização em processos de fermentação. Foi estudado com especial ênfase as bebidas alcoólicas andinas provenientes da região montanhosa dos Andes situada em países como Peru, Chile, Bolívia e Colômbia que são até hoje elaboradas artesanalmente.

Foram isoladas 511 cepas de leveduras, sendo 132 provenientes de 45 amostras de bebidas alcoólicas andinas denominada "chicha" ("jora", "algarrobo", "champú", "masato" e amendoim) e o resto de fontes como frutas (pessego, mamão, nectarina, banana, pera, laranja, abacate, maçã, maracujá e carambola), flores, bebidas alcoólicas brasileiras (tucupi, beiju, tarubá), suco de cana e de amostras de usinas de açúcar e álcool.

As leveduras isoladas das 45 amostras de bebidas alcoólicas andina foram submetidas a prova de coloração com Cloreto 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium (TTC), resultando 16,58% das cepas de cor vermelha, 55,36% de cor rosa e 28,06% de cor branca.

A eficiência fermentativa destas linhagens foi comparadas com Saccharomyces cerevisiae obtidas de fermentos comerciais (Fleishmann e Itaiquara). As 7 cepas com maior poder fermentativo, considerando-se como índice de fermentação a formação de mais de 20 g de CO<sub>2</sub>, foram identificadas como pertencentes ao gênero Saccharomyces.

As leveduras isoladas de amostras das bebidas alcoólicas andinas e brasileiras, de flores e de frutas foram comparadas quanto a temperatura de crescimento e quanto à presença do fator "Killer". Foram classificadas como mesófilas 364 cepas (71,23%), e 147 (28,77%) como termófilas, sendo que destas 105 (20,54%) cresceram a 46°C e 3 (0,59%) cresceram a 47°C.

Foram encontradas 2 cepas identificadas e classificadas como Candida sp que produziram fator "Killer" do tipo K<sub>a</sub> enquanto que 2 cepas identificadas como pertencentes ao gênero Torulaspora e 1 cepa identificada como pertencente ao gênero Pichia apresentaram espectro de sensibilidade e fator "Killer" diferente da classificação sugerida por WICKNER (1979).

## SUMMARY

The objective of this research was to use a variety of alcoholic beverages, molasses, and mashes from sugar and alcohol stations, flowers and fruits, as a source of yeasts for the study of the fermentation capability of the strains isolated and their possible utilization in fermentative processes. Beverages from the mountain region of the Andes, i.e. from Peru, Chile, Bolivia and Colombia, together with others from Brazil, were collected for this purpose. All of the beverages were produced by home-brewing.

A total of 511 strains were isolated, and of these 132 were obtained from forty five alcoholic beverages such as chicha, jora, algarrobo, champú, masato e amendoim, which are found in the Andes region. The remaining strains were isolated from fruits such as peach, papaya, nectarine, banana, pear, orange, avocado, apple, passion fruit and star fruit; from flowers; brazilian alcoholic beverages (i.e. tucupi, beiju, taruba); sugar cane juice and samples from sugar and alcohol stations.

The strains isolated from the 45 samples of beverages found in the Andes region were submitted to the TTC (2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride) coloration test, resulting in 16,58% of strains with red colour; 55,36% exhibiting pink colour and 28,06% showing white colour.

The alcohol production by the 132 strains isolated from the Andes region's beverages was investigated using the production of  $\text{CO}_2$  as an indication of the fermentation yield. Fleischmann and Itaiquara commercial strains of *S. cerevisiae* were used as

standards. Seven strains were obtained which showed higher fermentation capability than the standards (>20g of CO<sub>2</sub>). They were identified as belonging to the genus Saccharomyces. The yeast strains isolated from the Andes' and Brazil's alcoholic beverages and from flowers and fruits were tested for their ability to grow at different temperatures and also for the presence of "Killer" factors. 364 strains (71,33%) were classified as mesophilic, 147 (28,77%) as thermophilic, from which 105 (20,54%) were able to grow at 46°C and 3 (0,59%) at 47°C.

Two strains (9-75 and 15-72) were identified as Candida sp and produced Killer factor K<sub>s</sub>. Two strains (183 and 185) were identified as belonging to the genus Torulaspora and one strain (22-90) as belonging to the genus Pichia, which showed spectrum of sensibility and Killer factor differing from the classification suggested by Wickner (1979).

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade os homens dedicaram-se à elaboração de bebidas alcoólicas. Na época précolombina, vários tipos de bebidas foram desenvolvidas no continente americano, ainda que de forma artesanal. Entre elas destacam-se o pulque, o pozol, a chicha de milho e de abacaxi no México, as chichas de diversas frutas no Chile e a chicha de jora, uma das bebidas mais antigas e populares, no Peru, Bolívia, Colômbia e Equador, que podem apresentar até 13 graus alcoólico.

A chicha de jora é obtida através da fermentação natural dos açúcares contidos no milho maltado. Outro tipo de chicha, de consumo muito difundido entre os habitantes da região oriental do Peru, é obtida da mandioca tratada com saliva, sendo conhecida como chicha de masato. Esta última apresenta semelhança com certas bebidas alcoólicas dos indígenas do Brasil, como caisuma e tucupi.

Essas bebidas fermentadas podem apresentar vários tipos de leveduras que podem também ser encontradas em solo, flores e frutas.

O presente trabalho teve por objetivo: 1) O isolamento e identificação de leveduras da bebida fermentada de origem andina denominada "chicha". 2) Estudar a capacidade de redução do reagente Cloreto 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium (TTC) pelas leveduras isoladas 3) Estudar as cepas de levedura isoladas de amostras de "chicha", flores, frutas, suco de cana, melaco e mosto de usinas de fermentação alcoólica e bebidas alcoólicas brasileiras (beijú, tucupi, tarubá) quanto ao desenvolvimento

em diferentes temperaturas. 4) Estudar todas as cepas de leveduras isoladas quanto à presença de fator "Killer". 5) Estudar a eficiência da fermentação alcoólica do melaço, por leveduras isoladas da "chicha", comparando-a com a cepas de Saccharomyces cerevisiae contidas em fermentos comerciais (Fleishmann e Itaiquara).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ORIGEM HISTÓRICA

A chicha de jora, uma das mais antigas bebidas, é oriunda do Perú. Sua origem remonta-se à época pré-inca, sendo amplamente consumida também em outros países, como Colômbia, Bolívia, Equador e Chile (VASQUEZ, 1950).

Há indícios de que a palavra chicha seja procedente do Caribe, (onde também é chamada "Arawak"), a partir das palavras "chichiati" ou "chichal". Chichiati deriva de duas palavras "chichilia" e "atl" que significam "fermentar" e "água" respectivamente. Na segunda forma, chichal, "chi" significa "com" e "chal" significa "saliva" dando o sentido de ensalivar ou salivar. A palavra "chichal" descreve a via principal pela qual a chicha foi feita no passado, usando saliva para converter o amido em açúcares facilitando a fermentação dos açúcares redutores e consequente produção de álcool (VASQUEZ, 1950).

Nos idiomas quechua e aymara, dos habitantes dos Andes peruanos, as palavras "akka" ou "acca" significam chicha. Enquanto que "huinapo aque" significa chicha de milho germinado. No idioma quechua o milho triturado e mastigado é denominado "muko" e os mastigadores "muccupuccuko". Entretanto, atualmente, a chicha é feita a partir de milho germinado (jora) e triturado (NORKHEIRMER, 1973).

No Chile, encontram-se espécies de chichas elaboradas a partir de morango, uva e algarroba. A algarroba também é

utilizada para obtenção de chicha pelos índios de Tucumán, na Argentina. No Peru, além da chicha de jora utiliza-se a chicha de masato obtida da fermentação da mandioca. Na Polinésia, particularmente em Samoa, produz-se um vinho denominado "akawa". Este último é obtido pela mastigação das raízes da Piper methysticum e apresenta as mesmas características das chichas (ULLOA & HERRERA, 1983). No Brasil, encontramos "caisuma" e "tucupi" feito de suco de mandioca fresca, aquecida e fermentada (CAMARA, 1967).

## 2.2. ELABORAÇÃO DA "CHICHA DE JORA"

No período pré-inca e inca, a seleção da variedade de milho foi um dos critérios mais importantes para a produção de "chicha" de boa qualidade. Atualmente, a variedade mais empregada é a "Alasán" (SANCHEZ, 1966).

A elaboração da "chicha de jora" compreende duas etapas: obtenção da "jora" ou malte de milho e a obtenção da chicha propriamente dita (SANCHEZ, 1966).

### 2.2.1. Elaboração de "Jora" ou Malte de Milho

A "jora", produto da germinação do grão do milho, apresenta modificações morfológicas e histológicas do grão que resultam no desaparecimento das paredes celulares do endosperma, amaciamento do grão, degradação das proteínas e do amido, assim como na formação e liberação de enzimas cuja atividade depende direta ou indiretamente das mudanças ocorridas. A germinação é controlada para limitar o desenvolvimento das radículas e talo. O processo de maltagem

consta das seguintes etapas: obtenção da matéria prima (milho), debulhamento, seleção dos grãos, maceração, germinação e secagem.

As transformações produzidas no cereal germinado dependem principalmente da ação complexa das diferentes enzimas, fundamentalmente de quatro tipos: amilases, proteases,  $\beta$ -glucanase e fitase.

Na região da Serra Andina, a etapa de germinação demora de oito a quinze dias dependendo da estação (verão ou inverno) e na região da costa tem uma duração de quatro dias.

O poder sacarificante do malte de milho representa 28% do malte de cevada (Glasey & Marawoski citado por NORKHEIRMER, 1973)

#### 2.2.2. Elaboração da Chicha de Jora

Segundo o Código Sanitário de Alimentos do Peru (1974), denomina-se chicha de jora a bebida obtida por fermentação alcoólica do milho maltado adicionado ou não de açúcar.

A elaboração da chicha de jora nos países Latino-americanos tem um caráter artesanal e é considerada uma arte. Segue-se o fluxograma da produção de chicha:

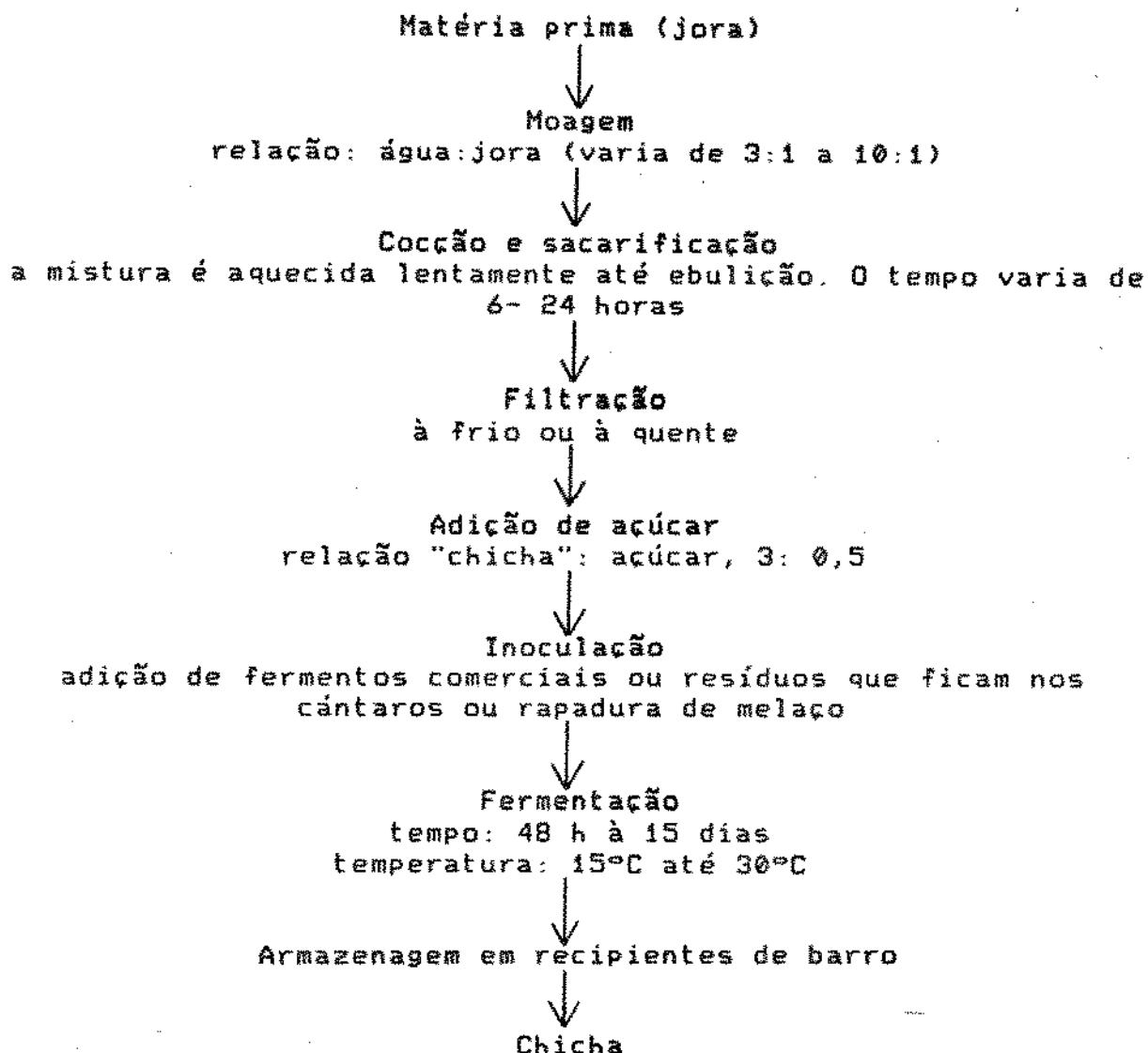


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE ELABORAÇÃO DA "CHICHA DE JORA"

### 2.2.3. Elaboração do Masato

Outro tipo de chicha tradicional denominado masato, corresponde a uma chicha de mandioca. A espécie empregada é a mandioca brava ou *Manihot utilima*, da família das Euforbiáceas. A Figura 2 ilustra o processo de elaboração de masato.

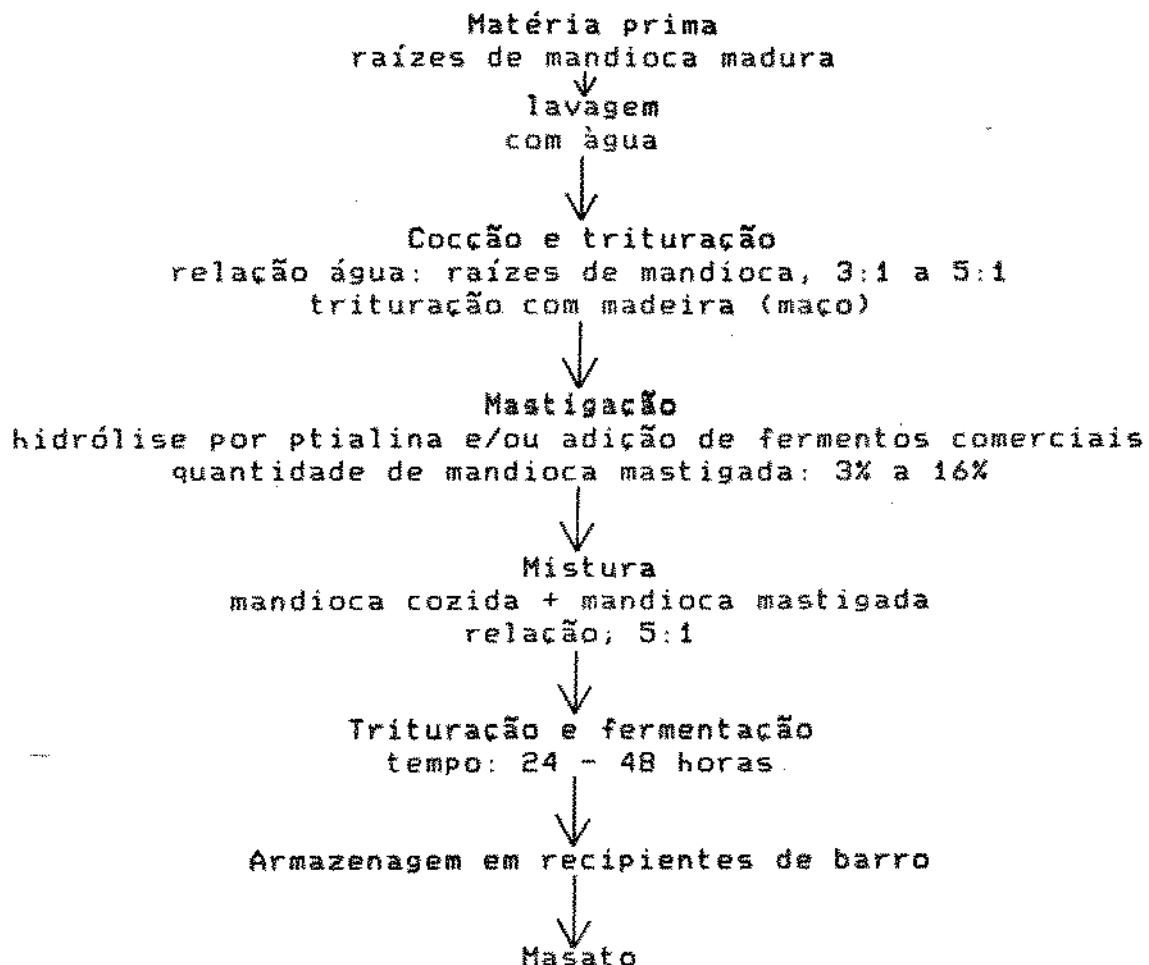


FIGURA 2- FLUXOGRAMA DE ELABORAÇÃO DE "MASATO"

### 2.2.4. Outros Tipos de Chichas

Além da chicha de jora e masato, também são obtidas outras chichas, a partir de tubérculos, raízes e rizomas como por exemplo "oca" (Família das Oxalídeas), batata, batata doce; de frutas como "molle" (Família das Terebintaceas), "tuna"

(*Opuntia ficus*), "aguaje" (*Mauritia flexuosa*), banana, abóbora, figo da índia, cacau e outros, de pseudo-cereais como "quinua" (*Chenopodium quinoa*) e de cereais como cevada (ANTUNEZ DE MAYOLO, 1988).

### 2.3. LEVEDURAS

#### 2.3.1. Características Gerais

As leveduras são organismos unicelulares que apresentam-se sob formas muito variadas: esféricas, ovóides elipsóides, cilíndricas, triangulares, etc., que podem desenvolver estruturas filamentosas. Estas formas embora geralmente não muito diferentes entre as espécies são às vezes características e contribuem para a classificação taxonômica (PELCZAR & RIED, 1966).

Todas as leveduras, praticamente, podem ser cultivadas em meio sólido e em meio líquido apresentando seu desenvolvimento num período de 2-3 dias de incubação a 28-30 °C (LODDER et al., 1958).

Reproduzem-se vegetativamente por brotamento ou por fissão, e sexualmente pela produção de esporos (a célula que contém os esporos sexuais e protoplasma denomina-se asco, e os esporos contidos no asco, ascosporos). Em algumas espécies unicelulares, depois da gemulação as novas células de leveduras permanecem unidas à célula mãe formando um pseudomicélio. Em outros casos formam-se verdadeiros micélios por fissão (PELCZAR & REID, 1966).

As colônias de leveduras em meios de cultura adequados, apresentam morfologia diversificada. Algumas são lisas, outras rugosas, com a margem inteira, irregular, filamentosa, ondulado, etc. A consistência das colônias é geralmente ligeiramente pastosa, mas ao envelhecer torna-se mais consistente e seca. As leveduras podem ser pigmentadas ou não. O desenvolvimento em meio líquido fornece informações importantes: como formação de sedimento, formação de películas com diferentes características, ilhas, anéis, etc. (LODDER, 1970).

Solo, frutas e flores devido à presença de açúcares, são substratos capazes de favorecer o desenvolvimento de leveduras (PHAFF & STARMER, 1987).

As bebidas fermentadas descritas anteriormente e que não sofreram nenhum processo térmico após a fermentação, podem ainda apresentar leveduras viáveis.

### 2.3.2. Características Bioquímicas

#### 2.3.2.1. Coloração com Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolium (TTC)

O TTC, comumente conhecido como sal de Tetrazolium, foi preparado pela primeira vez em 1894 por Von Pechmann e Runge, conforme citação de SMITH (1951). Este reagente é rapidamente solúvel em água. Em 1941, KUHN & JERCHEL, sintetizaram vários substitutos de TTC por um novo processo.

As soluções neutras de TTC sofrem redução em pH ácido, e certas leveduras e bactérias podem adquirir cor vermelha, pela formação de trifénilformazana, que é um composto insolúvel

resultante da redução do TTC (COTTRELL, 1947 e SMITH, 1953). O TTC tem sido usado para indicar a presença de células viáveis, as quais apresentam uma coloração vermelha, devido à redução do corante à trifenilformazana. O TTC apresenta assim uma vantagem sobre o azul de metíleno, (usado com a mesma finalidade), já que este último é incolor no estado reduzido, não colorindo portanto as células viáveis (MATTSON et al, 1947).

Por outro lado, GUNZ (1949) verificou que culturas jovens de leveduras fermentativas reduziam rapidamente o TTC, sendo que a reação era inibida completamente por aquecimento a 60 °C por três períodos alternados de 10 minutos, assim como os dados de MATTSON et al (1947) demonstraram reação similar em tecidos de origem animal e vegetal o que evidencia que os sistemas enzimáticos são responsáveis pela redução do TTC. Além disso, GUNZ (1949) indicou que o extrato livre de célula foi rapidamente reduzido por TTC, o que comprova que o conjunto de enzimas presentes na levedura está na forma solúvel e ativa na solução que cataliza a via metabólica liberadora de energia mesmo depois de ter sido removido da estrutura de células vivas.

LEDERBERG (1948), usou a reação com TTC como indicador para diferenciar cepas de bactérias capazes de fermentar açúcares, de outras cepas de bactérias. Colônias de leveduras de tamanho pequeno ("petite") desenvolvidas em agar glicose foram associadas com leveduras deficientes em respiração, conforme indicado por EPRUSSI et al, 1949 e SLONIMSKI 1949. Assim, os "petites" são formados com perda de partículas

citoplasmáticas, necessárias para o desenvolvimento de um sistema de citocromo completo. Este conceito reforça outros dados da literatura (RAUT, 1953 e 1954).

RIED (1952) indicou que no sistema celular, as mitocôndrias ficam vermelhas pela redução do TTC a formazana, enquanto o citoplasma e núcleo ficam incolores, assegurando-se que as mitocôndrias contém muitas enzimas que catalizam a oxidação dos nutrientes orgânicos da levedura pelo oxigênio molecular para produzir dióxido de carbono e água, liberando muita energia durante estas oxidações.

RAUT (1953), desenvolveu uma técnica para distinguir as leveduras fermentativas das não fermentativas. Culturas capazes de fermentar sacarose produziam colônias vermelhas em placas de agar nutritivo contendo sacarose e TTC, e culturas incapazes de fermentar este açúcar produziam colônias brancas. Esta técnica consistia em isolar mutantes, incapazes de fermentar glicose, com ajuda da radiação ultravioleta. Após radiação, colônias brancas não fermentativas cresciam sobre agar glicose. Não obstante, clones derivados dessas colônias brancas fermentavam glicose tão rapidamente como aquelas provenientes das colônias vermelhas. Assim as colônias brancas diferiam das colônias vermelhas normais pela habilidade de utilizar a glicose, e por serem incapazes de absorverem oxigênio, devido a deficiência em vários componentes do sistema citocromo. O autor sugeriu que a deficiência era herdada pela mutação de um gen simples.

A deficiência em vários componentes de citocromos em leveduras resulta da incapacidade das células em consumir ou absorver oxigênio, sendo esta característica permanente e transmitida de uma geração celular à outra (RAUT, 1952 e 1954). OGUR et al (1957) chamaram "aer" as colônias brancas que são deficientes em respiração, em contraposição às colônias vermelhas suficientes em respiração "AER". OGUR et al (1957) e OGUR & JHON, ST. (1958) também observaram que a deficiência de respiração das colônias "aer" estavam relacionadas com os citocromos e que eram incapazes de utilizar certos ácidos orgânicos como fonte principal de energia para seu desenvolvimento. Assim, admite-se que o uso do TTC é uma técnica rápida para o diagnóstico de leveduras mutantes com deficiência respiratória, possibilitando o seu uso para uma rápida seleção destes mutantes segundo BACHOFEN et al (1972).

JAMBOR (1954) indicou por seus estudos polarográficos, num meio menor que 6, a redução do TTC produz produto sem cor e só em soluções alcalinas o produto da redução é principalmente o formazana de cor vermelha.

NAGAI (1959) empregou uma modificação da técnica de cobertura do TTC para contagem de mutantes nas culturas. A diferenciação da coloração vermelha (normal) e brancas (mutantes) apareciam mais nítidas e ocorriam mais rapidamente. Nas populações de leveduras que crescem sob condições normais, cerca de 1% ou menos são mutantes deficientes respiratórios que apresentam diferenças em características morfológicas, fisiológicas e enzimáticas quando comparadas com as leveduras

normais respiratórias. Segundo NAGAI et al (1960), cepas de leveduras especificamente haplóides apresentam instabilidade e mutante deficientes respiratórios em alta frequência sob condições normais. Segundo estes autores o lugar exato do sistema enzimático onde ocorre a redução do TTC a trifénilformazana ainda não está bem estabelecido. Não obstante, notaram que a enzima succinato desidrogenase, que cataliza a conversão de succinato a fumarato tem potencial redox similar ao TTC. Além disso, esta enzima está diretamente relacionada a cadeia de transporte de elétrons e é parte integrante da membrana interna das mitocôndrias, razão que torna esta enzima diferente das demais do ciclo do ácido cítrico. Na cadeia respiratória o TTC reage finalmente com o citocromo oxidase terminal. Então, a redução é acompanhada por um ganho de elétrons, que são ganhos pelo formazana.

O TTC também serve como um indicador para contagem de células viáveis. A reação depende da redução do indicador redox TTC, pelas desidrogenases da levedura, à trifénilformazana (vermelho). Outra pesquisa realizada por FARKCES ( 1985) mostrou que a capacidade de redução das células depende também da idade e não sómente da contagem das células viáveis.

Diversos pesquisadores têm trabalhado com cepas de leveduras isoladas de sake. AKIYAMA e SUGANO (1967) relataram a aplicação da técnica de coloração com TTC a estas colônias e observaram diferenças entre as cores produzidas, sendo que a linhagem Kyokai No 7, uma das mais comuns, tornava-se de cor vermelha devido à redução do TTC.

MURAKAMI et al (1982) verificaram que leveduras Kyokai utilizadas na fermentação de sake, apresentaram coloração vermelha através do teste de TTC em meio contendo glicose. Os autores verificaram que quando foram usados outros açúcares como maltose, galactose,  $\alpha$ -D-glicosídeo em lugar de glicose, as colônias de leveduras apresentaram coloração diferente. Algumas colônias eram de cor rosa, branca ou misturas de vermelha e rosa ou branca dependendo da idade da colônia e/ou do tipo de levedura empregada.

#### 2.3.2.2. Fator Killer em Levedura

Uma outra característica bioquímica a ser determinada no estudo das leveduras é o efeito "Killer" que consiste na capacidade que algumas leveduras produzirem toxinas que matam outras leveduras.

BEVAN & MAKOWER (1963) descreveram que certas cepas de *Saccharomyces* podiam ser classificadas em um dos três fenótipos que eles denominaram de killer, sensível e neutro. Quando células "killer" e "sensíveis" crescem juntas num mesmo meio de cultura, uma grande proporção das sensíveis morrem. Células neutras não matam células sensíveis nem são mortas por células "Killer". O agente liberado pelas células "Killer" que causa a morte das células sensíveis tem sido denominado fator "Killer". Porém a levedura killer é imune à ação de seu próprio fator Killer.

WOOD & BEVAN (1968) reportaram que o fator "Killer" na levedura é de natureza proteica. A natureza protéica do fator Killer purificado foi indicada pela sua inativação com papaina.

A produção e estabilidade do fator Killer é muito dependente das condições de crescimento, que devem ser cuidadosamente controladas. A toxina Killer é uma proteína de baixo peso molecular, cerca de 11.470 daltons. A toxina é hidrofóbica, sensível ao calor e à proteases, sendo secretada na fase exponencial de crescimento. Esta toxina é ativa e razoavelmente estável em pH de 4,2 a 4,7 (FOLIN-CIocalteu, 1927 e TIPPER & BOSTIAN, 1984). Todavia, WOOD & BEVAN (1968) indicam uma faixa mais restrita de pH: 4,6 a 4,8. O fator Killer é inativado em temperaturas superiores a 25°C e em valores elevados de pH, provavelmente devido a alterações da estrutura da proteína.

O caráter "Killer" da levedura Saccharomyces cerevisiae é um elemento genético não mendeliano que confere às cepas que o contém, duas propriedades: 1) capacidade de inativar cepas sensíveis e 2) imunidade da cepa à atividade "Killer" (VODKIN et al, 1974). Estudos genéticos têm demonstrado que o fenótipo "Killer" de S. cerevisiae encontra-se no citoplasma e está associado à presença de RNA de fita dupla como partículas virais. Dois tipos de dsRNA estão envolvidos, o menor dsRNA é designado como MdsRNA e tem sido encontrado exclusivamente em linhagens "Killer". Sua ocorrência, porém, parece ser contingência para a presença de dsRNA maiores que são designados como LdsRNA (FINK & STYLES, 1972; BEVAN et al, 1973; VODKIN & KALLIN, 1974; CLARE & OLIVER, 1979).

GUNGE & SAKAGUCHI (1981) relataram que Kluyveromyces lactis IFO 1267 contém dois plasmídeos DNA lineares que são designados PGKII e PGKI2 com pesos moleculares de  $5,4 \times 10^6$

daltons e  $8,4 \times 10^6$  daltons respectivamente. O *K. lactis* IFO 1267 é levedura "Killer" ativas contra um certo grupo de leveduras incluindo *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans* e *K. vanudenii*. Verificou-se que essas toxinas são hidrolisadas pela tripsina.

ZORG et al (1988) estudaram uma cepa *Hanseniaspora uvarum*, que apresentava caráter "Killer" e que continha 2dsRNA. O fator Killer de *H. uvarum* foi transferido para *S. cerevisiae* por fusão esferoplasmática.

Cepas de levedura sensíveis são inativadas quando expostas às proteinas "Killer" produzidas por outras leveduras. A molécula receptora da toxina parece ser a D- $\beta$ 1,6 glucana que pode ser separada de outras glucanas e mananas da parede celular pela sua solubilidade diferencial em álcali e ácido acético diluído (BUSSEY, 1981).

A ligação da toxina à membrana possivelmente produz alteração de permeabilidade pela formação de poros, destruindo o potencial eletroquímico da membrana e resultando na morte da célula devido a vazamento seletivo e não controlado de ATP intracelular e ions K+. Concomitantemente, ocorre inibição coordenada de toda síntese protéica e alteração do transporte de prótons, observando-se uma diminuição rápida da capacidade de formar colônias, e diminuição do tamanho das células (BUSSEY et al, 1973; KOTANI et al, 1977; DE LA PEÑA et al, 1981).

Na inativação de leveduras por toxinas de *Saccharomyces* e de *Pichia*, parece que ocorre uma ligação na célula sensível

em dois estágios: primeiro à parede e em seguida à membrana (Young citado por ROSE & HARRISON, 1987).

PHILLISKIRK & YOUNG (1975) estudaram a ocorrência de leveduras "Killer" em ampla faixa de gêneros e espécies de leveduras. De 964 linhagens de leveduras, classificadas em 28 gêneros e 148 espécies, foram encontradas 59 cepas produtoras de fator "Killer". Os autores detectaram quatro tipos de atividade "Killer" com relação ao pH nas leveduras estudadas. Leveduras "Killer" tinham sido previamente relatadas somente no gênero *Saccharomyces*.

Para evidenciar o efeito "Killer" são usadas placas com meio de agar YEPD contendo azul de metileno com pH de 4,2 a 4,7. Sobre a superfície do meio são espalhadas suspensões de cepas de leveduras sensíveis. Após secagem são feitas estrias com cepas produtoras de fator "Killer". O efeito "Killer" é evidenciado pelo aparecimento de zonas de inibição do desenvolvimento, em forma das estrias (WOOD & BEVAN 1968).

Uma cepa de *S. cerevisiae* sensível tem sido frequentemente usada junto com a cepa de *S. cerevisiae* produtora de fator "Killer" K<sub>1</sub> para seleção inicial de linhagens "Killer". A técnica permite evidenciar que, cada linhagem "Killer" é imune a sua própria toxina, mas pode ser sensível a toxinas secretadas por outras cepas. Este padrão simples pode ser afetado quando ocorre variação na sensibilidade de linhagens, resultante de mutação a nível nuclear, segundo Young e Yagi citado por TIPPER & BOSTON (1984).

Para verificar o tipo de interação entre leveduras "Killer", dez distintos perfis ( $K_1$  a  $K_{10}$ ) de atividade Killer contra leveduras "Killer" foram estudados e as leveduras foram distinguidas por sua toxina e especificidade à imunidade (TIPPER & BOSTION, 1984).

Torulopsis glabrata ATCC 15126, produtora de toxina Killer para  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_{10}$ , pode ser facilmente morta por outras leveduras "Killer". Este tipo de fator Killer é classificado como  $K_{11}$  (WICKNER 1979). Sendo que os onze perfis podem ser observados no QUADRO 1.

A atividade "Killer" dos tipos  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  foi demonstrada somente pelas espécies do gênero Saccharomyces. O tipo  $K_1$  apresenta efeitos de maior intensidade. A atividade da toxina Killer  $K_1$  pode ser devida à sua ação como um protonóforo ou ionóforo de potássio, enquanto que a toxina de L. lactis é codificada por um DNA plasmidial, que inibe a adenil ciclase nas células de levedura-sensíveis (SHIMIZU et al., 1985).

O fenótipo  $K_2$  é amplamente distribuído entre linhagens de laboratório e linhagens selvagens, enquanto que  $K_3$  tem sido encontrado quase exclusivamente nos contaminantes de fermentação. As toxinas  $K_1$  e  $K_2$  são codificadas por  $M_1$  e  $M_2$  dsRNAs, respectivamente (PHEIFFER & EIDLER, 1983).

## QUADRO 1. CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS "KILLER"

Tipos de "Killer"	Leveduras	Tipos de "Killer" apresentados pelas leveduras sensíveis
K <sub>s</sub>	<u>Saccharomyces uvarum</u> , NCYC 190 <u>S. cerevisiae</u> , AB209B, NCYC 232, NCYC 235, KL-88. <u>S. hybrids</u> , NCYC 631, 663	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>a</sub>	<u>S. cerevisiae</u> , NCYC 738, 1001 <u>S. diastaticus</u> , NCYC 713	K <sub>s</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>4</sub>	<u>S. capensis</u> , NCYC 761	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>2</sub>	<u>Torulopsis glabrata</u> , NCYC 388	K <sub>s</sub>
K <sub>5</sub>	<u>Debaromyces vanriiji</u> , NCYC 577 <u>Hansenula anomala</u> , NCYC 434 <u>H. subpellucens</u> , NCYC 16	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>6</sub>	<u>Kluveromyces fragilis</u> , NCYC 587	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>7</sub>	<u>Candida valida</u> , NCYC 327 <u>Pichia membranefaciens</u> , NCYC 333	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>8</sub>	<u>H. anomala</u> , NCYC 435	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>9</sub>	<u>H. mrakii</u> , NCYC 500	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>10</sub>	<u>K. drosophilae</u> , NCYC 575	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>22</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>7</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>22</sub>
K <sub>11</sub>	<u>L. glabrata</u> , ATCC 15 126	K <sub>s</sub> , K <sub>a</sub> , K <sub>22</sub>

FONTE: WICKNER (1979).

Somente linhagens de levedura "Killer" pertencentes ao gênero Saccharomyces foram passíveis de inativação do caráter Killer, pelo tratamento com cicloheximida ou incubação a elevadas temperaturas. As leveduras de outros gêneros não foram alteradas em relação ao fator Killer por estes tratamentos. Fink e Styles citados por WICKNER (1974), relatam que linhagens Killer crescidas na presença de concentrações baixas de cicloheximida, tornam-as sensíveis, com perda do caráter Killer. O mesmo acontece com linhagens Killer de S. cerevisiae crescidas a elevadas temperaturas. A concentração de cicloheximida que inibe o crescimento da levedura "Killer" varia conforme a cepa. Todos os tipos de fator Killer K<sub>a</sub> e K<sub>b</sub> são rapidamente inativados pelo tratamento com cicloheximida. Em contraste, fatores Killer K<sub>c</sub> demonstram nível muito baixo de inativação na presença de cicloheximida.

Várias linhagens "Killer" foram cultivadas em meio de ágar YPDA a 23, 30, 37 e 40°C. Muitas das colônias desenvolvidas em temperatura de 37 ou 40°C não mostraram evidência de morte ou apresentaram uma mistura de células Killer e sensível. Enquanto que as colônias formadas a 23°C ou 30°C apresentaram linhagens killer, geralmente, com mortalidade normal. Todas as linhagens mostraram aumento de frequência de colônias não Killer com aumento de temperatura. Esta "cura" do plasmídeo é diferente da termolabilidade da substância Killer observado por WOODS & BEVAN (1968), já que a habilidade de crescimento das células que matam foi realizada a 23 °C, temperatura na qual a toxina Killer é plenamente ativa.

(WICKNER, 1974). Quando as colônias foram incubadas a elevada temperatura, para inativá-las, a cepa AB209 ( $K_1$ ) não foi alterada, enquanto NCYC 235 e 631 (ambas  $K_2$ ) foram inativadas. Todos os "Killer" do tipo  $K_2$  perderam a atividade Killer, por incubação a temperaturas elevadas, enquanto o "Killer" tipo  $K_1$  manteve a atividade.

Pouca diferença foi observada no intervalo de tempo a 30°C, necessário para reduzir a atividade Killer de Saccharomyces sp, tipo  $K_1$  ou  $K_2$ , a 50% do seu valor original (HARA 1985). O Killer tipo  $K_2$  mostrou ser ligeiramente mais termoestável. O Killer do tipo  $K_1$  foi consideravelmente mais estável, à temperatura de 30°C, que outros Saccharomyces, apresentando uma redução da atividade da ordem de 50%. Todas as linhagens, testadas, não pertencentes ao gênero Saccharomyces produziram atividade Killer com grande termoestabilidade, a qual foi maior que às pertencentes ao gênero Saccharomyces examinado.

A natureza do caráter Killer nos grupos  $K_1$  a  $K_{1,2}$  é diferente. Esta observação foi verificada pelos experimentos de perda de atividade Killer e análise do dsRNA. Somente espécies do gênero Saccharomyces foram inativadas e contêm dsRNA. Killers do tipo  $K_2$  são rapidamente inativados pelo tratamento térmico e não por ação da cicloheximida, enquanto que  $K_1$  apresenta o reverso como característica. O peso molecular da menor espécie de dsRNA (M) foi relacionado com o fator Killer, assim para  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$  o peso molecular foi estimado em  $1,3 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^4$  e  $0,9 \times 10^4$  daltons, respectivamente. Esta

observação evidencia que o MdsRNA determina a natureza do fator Killer produzido, pois linhagens inativadas quanto ao fator Killer não contêm MdsRna. A constatação de que leveduras de outros gênero, além de Saccharomyces, não podem ser inativadas em sua ação Killer e aparentemente não contém dsRNA, indica que a base genética para o caráter Killer nestes organismos não é citoplasmática. Os fatores Killer, produzidos por leveduras de diferentes grupos Killer, mostraram ser diferentes à ação de enzimas proteolíticas. Linhagens Killer dos grupos K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> e K<sub>3</sub> contêm dois tipos de dsRNA.

Algumas linhagens de Saccharomyces, isoladas da fermentação do vinho, produzem três tipos diferentes de fator Killer, classificados como Y-1, Y-6 e Y-9 (HARA, 1985).

BUSSEY & SKIPPER (1976) reportaram que na levedura I. glabrata, o fator Killer produzido de 22°C a 24°C, apresenta 0,4% de sobrevivência pela quantidade de 110 ug de proteína/mL (toxina "Killer") o que a torna mais sensível que as linhagens sensíveis S. cerevisiae S30, Cryptococcus neoformans ATCC 2505, Candida albicans ATCC 752 e Schizosaccharomyces pombe ATCC 2476, que não foram afetados. A sobrevivência foi estimada por plaqueamento após 300 minutos. Sugere-se que o fator Killer atua, principalmente na membrana em I. glabrata e que ambas I. glabrata e S. cerevisiae sensíveis são destruídas por um mecanismo comum.

Fermentações comerciais, particularmente as que empregam S. cerevisiae, estão sujeitas a contaminação pelas chamadas "leveduras selvagens". Bebidas alcoólicas com baixo

conteúdo de álcool (cervejas) também estão sujeitas a contaminação por leveduras contaminantes (Young citado por ROSE & HARRISON, 1987).

Para produção de cerveja, linhagens de levedura Killer de *S. cerevisiae* KL-BB, foram produzidas por retrocruzamento de levedura Killer de sake selvagem com um ancestral DC2, uma das melhores leveduras de vinho. Várias linhagens de híbridos Killer foram comparáveis ao DC-2 na habilidade de fermentação, tolerância SO<sub>2</sub>, coloração TTC, e crescimento em meio de Beta-alanina a 35°C (HARA et al 1980).

Pesquisadores e industriais britânicos foram cautelosos na sua utilização, mas os pesquisadores japoneses introduziram o caráter Killer em leveduras de sake, e dessa forma a fermentação de sake foi protegida da invasão por contaminantes de linhagens selvagens (SPENCER & SPENCER, 1983).

Mostos de uva são usualmente não pasteurizados antes da fermentação. Assim, muitas leveduras selvagens de uvas influenciam no mosto de fermentação prejudicando o vinho (odor estranho, excessivo ácido volátil, fermentação incompleta, turbidez, etc.). HARA et al (1981) sugeriram a alternativa de usar preparações de toxina incorporada a micoviroses de uma linhagem de levedura comercial. Em muitos casos, a mistura dos genomas da linhagem comercial e doador de caráter "Killer" pode ser indesejável, mas para isso o uso do retrocruzamento poderia minimizar os efeitos indesejáveis.

YOUNG (1981) utilizou cruzamento raro entre leveduras de bebida fermentada comercial (poliplóide, cepa não cruzada) e

cepas "Killer" haplóide Kar, para produzir leveduras de bebida fermentada com caráter "Killer" na fermentação. As cepas "Killer" comportam-se identicamente à cepas fermentativas não "Killer".

Os híbridos podem ajudar na produção de bons vinhos, a temperaturas relativamente baixas (13 a 15°C). HARA (1984) obteve um Killer híbrido (SK-4) de vinho xerez por fusão protoplasmática entre uma levedura Killer de vinho S. cerevisiae 2HY-1 e de S. bayanus. Os híbridos obtidos (Killer tipo K1) foram celularmente tolerantes a  $S\theta_e$ .

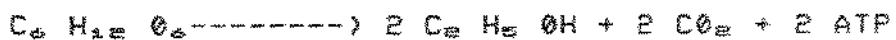
Young & Tablot , citados por ROSE & HARRISON (1987) ressaltaram que toxinas Killer podem proteger a cerveja dos efeitos da infecção de levedura contaminantes. Preparações de toxina de leveduras Killer K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub> e K<sub>5</sub> foram efetivas em determinado grau, sendo que a linhagem Killer K<sub>5</sub> foi a mais efetiva de todas.

Através da manipulação genética é possível a introdução de genes de fator Killer em linhagens industriais. O clone cDNA do gen precursor apresenta imunidade à toxina e tem sido sequenciado e expresso em levedura. LEE & HASSON (1987), verificaram que o vetor clonado pode ser construído, utilizando os genes de imunidade à toxina Killer, propriedade de leveduras transformantes, que torna o plasmídeo mais estável.

### 2.3.2.3. Fermentação Alcoólica

Qualquer produto que contém glicose ou outro carboidrato constitui matéria-prima para a obtenção de etanol. As matérias-primas ricas em carboidratos podem conter açúcares fermentescíveis ou carboidratos mais complexos como amido e celulose, que devem ser previamente hidrolizados (MENEZES, 1980).

Na fermentação alcoólica, as leveduras são os microrganismos mais importantes, destacando-se Saccharomyces cerevisiae e Saccharomyces pombe quando o substrato é constituído de hexoses (MENEZES 1980). Assim, a glicose é fermentada mais rapidamente que a frutose e as leveduras oxidam a glicose a  $\text{CO}_2$  e etanol na ausência de  $\text{O}_2$ . A reação global está representada segundo a equação abaixo (LIEVENSE e LIM, 1962).



Desta forma, só se produz a oxidação parcial do composto orgânico e unicamente é liberada uma pequena parte de energia, permanecendo o restante nos produtos resultantes. Essas oxidações parciais implicam na utilização da mesma substância como doador e receptor de elétrons ao mesmo tempo, o que significa que algumas moléculas derivadas do composto inicial são oxidadas e outras reduzidas.

Observando a equação anterior, alguns dos átomos de carbono terminam em  $\text{CO}_2$ , uma forma mais oxidata que a glicose, enquanto outros átomos de carbono terminam como álcool, que está mais reduzido que a glicose.

A fermentação alcoólica é muito difundida em leveduras do gênero Saccharomyces, Kluyveromyces, Brettanomyces, etc. No decorrer da fermentação alcoólica, o ácido pirúvico é descarboxilado em acetaldeído e CO<sub>2</sub> e a redução de acetaldeído leva à formação de etanol. Outras substâncias podem ser produzidas em pouca quantidade principalmente glicerol e ácido acético. A fermentação alcoólica é realizada em meio relativamente ácido, pH 5 a 6 (SCRIBAN 1985).

ROSE (1976) destaca a importância da seleção de novas cepas de leveduras floculantes e tolerantes a elevadas concentrações de açúcares, semelhante ao que ocorre com os melacos. Estas leveduras fermentam, rapidamente, produzindo aproximadamente 12 % (v/v) de álcool etílico.

As características dos organismos fermentativos são importantes, a fim de minimizar os custos envolvidos. Os microrganismos devem ser capazes de crescerem em altas concentrações de açúcar e ter alta tolerância ao álcool, entre outras características (SKOTNICKI et al., 1981).

Sabe-se que o acúmulo de etanol como produto final da fermentação causa inibição progressiva na taxa de conversão de açúcares pela levedura (AIBA et al., 1968). Este fenômeno é particularmente importante em razão do aumento do tempo requerido para a completa conversão de açúcar em etanol o que limita a concentração final de etanol obtido (INGRAM & BUTTKE, 1984).

Segundo OSMAN & INGRAM (1985), o etanol altera a permeabilidade da membrana plasmática da célula microbiana, permitindo perdas de cofatores e coenzimas.

A elevação da temperatura tem um grande efeito inibitório na produção de etanol (NAGODAWITHANA et al., 1974). De acordo com NAVARRO & DURAND (1978), a concentração de etanol intracelular atinge valores máximos sob altas temperaturas, induzindo a morte da célula.

JONES et al (1981) descreveram que as espécies de Saccharomyces apresentam altas taxas de crescimento a temperaturas entre 28 a 35°C e acima de 40°C não ocorre crescimento da levedura.

Estima-se que a temperatura ótima de produção de álcool, ocorre de 5 a 10°C acima da temperatura ótima do crescimento celular. Em meios não favoráveis à fermentação com alta concentração de etanol, a temperatura ótima para produção de álcool torna-se mais baixa (JONES et al, 1981).

SEKI et al (1983) usaram fusão esferoplasmática para obtenção de um híbrido de Saccharomyces para a produção rápida de etanol (6% p/v), depois de 24 h de fermentação a 42°C.

ANDERSON et al (1986) reportaram que algumas linhagens de leveduras, identificadas como Kluyveromyces marxianus var. marxianus, foram capazes de fermentar rapidamente glicose e melado de cana a etanol, a temperaturas acima de 47°C.

Outro estudo, demonstrou que a 43°C, o etanol a 6%(p/v), foi produzido depois de 12 h de fermentação com retenção da viabilidade celular por várias linhagens de Kluyveromyces. Não

obstante, linhagens de Kluyveromyces e Candida não são tolerantes ao etanol da mesma forma que linhagens de Saccharomyces (ANDERSON et al., 1986).

Dos poucos trabalhos sobre seleção de leveduras capazes de crescer e fermentar a 40°C ou mais, verificou-se que linhagens de Kluyveromyces foram mais termotolerantes que linhagens de Saccharomyces e Candida (D'AMORE et al., 1989).

Estima-se que 30-35% dos custos de fermentação da produção de etanol, a 32°C, são resultado do processo de resfriamento. Quando a temperatura de fermentação é aumentada para 37°C, os custos de resfriamento deveriam diminuir a 10% dos custos de fermentação, diminuindo ainda mais ao aumentar para 40°C, a temperatura de fermentação. A recuperação de etanol torna-se de baixo custo quando opera-se a essas temperaturas elevadas. Por estas razões, pode ser econômico e tecnicamente vantajoso operar fermentadores a elevadas temperaturas (D'AMORE et al., 1989).

A suplementação de nutrientes pode neutralizar os efeitos adversos de temperaturas elevadas, resultando no aumento de biomassa celular, que pode levar ao aumento da produção de etanol (D'AMORE et al., 1988 e D'AMORE et al 1989).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

##### 3.1.1. Coleta de Amostras

Um total de 45 amostras de diversos tipos de "chicha" como "jora", "masato", "algarroba", "champú" e "quinua" foram obtidas em diferentes regiões do Peru (Costa, Serra e Selva) como indicadas na Figura 3 e também da Bolívia, Colômbia e Chile, diretamente dos vendedores e produtores destas bebidas e acondicionadas em recipientes estéreis.

No Brasil, foram coletadas 312 amostras de diversas fontes. Correspondendo 270 cepas que foram isoladas de frutas (mamão, jaboticaba, pêssego, abacaxi, ameixa, laranja, melancia, maçã, pera, abóbora, nectarina, maracujá, banana, melão e abacate) coletadas do CEASA de Campinas, 2 cepas isoladas da fruta carambola de São Luis (Estado de Maranhão), 8 cepas isoladas de polvilho azedo de Rio Negro (Manaus), 7 cepas isoladas de levedura seca (Copersucar), 17 cepas isoladas de flores, 32 cepas de amostras de melâco e mosto de usinas de açúcar e álcool situadas no Estado de São Paulo, 7 cepas provenientes de uma coleção de leveduras, 2 cepas de fermentos comerciais Fleischmann e Itaiquara, e 34 cepas isoladas de tucupi, beiju e suco de cana dos Estados de Pará, Manaus e Maranhão.



FIGURA 3 LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA  
DE BEBIDAS ALCOÓLICAS NO PERU

### 3.1.2. Isolamento e Seleção das Leveduras

Cerca de 1 mL de cada uma das amostras de "chicha", bebidas alcoólicas brasileiras e das amostras de melaco e mosto de usinas de fermentação foi adicionada em tubos de ensaio contendo 10 mL de água deionizada estéril ou diluída adequadamente para obtenção de colônias isoladas. As amostras de polvilho azedo, flores e frutas foram colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de água deionizada estéril e após agitação mecânica por 1 minuto foi inoculado 1 alça desta diluição em 6 mL de meio extrato de levedura-polipeptona-dextrose (YPD) e incubado por 48 horas a 30°C. Após incubação, os tubos de ensaio foram agitados mecanicamente por 2 minutos e 30 µl da amostra foram inoculados em placas contendo meio ágar Extrato de levedura-polipeptona-dextrose (YPDA) constituído de extrato de levedura 0,3%, polipeptona 0,5%, dextrose 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,1%, ágar 2% e cloranfenicol 0,01%, ajustado a pH 5,7.

As placas foram incubadas a 30°C e a 43°C por 24 a 48 horas. As colônias de levedura isoladas e morfológicamente diferentes foram transferidas para tubos contendo ágar YPDA inclinado e incubados a 30°C até desenvolvimento satisfatório das culturas. As culturas de leveduras foram reisoladas através de esgotamento em meio de ágar YPDA. Posteriormente foram mantidas em geladeira.

As leveduras isoladas das bebidas alcoólicas andinas foram examinadas quanto a morfologia (forma e tamanho) através da coloração de "Gram" e as leveduras de bebidas alcoólicas

brasileiras, amostras de flores, frutas, melaco e mosto de usinas de álcool e açúcar através da coloração de azul de metíleno (0,005%).

As leveduras isoladas das bebidas alcoólicas andinas foram examinadas quanto a morfologia (forma e tamanho) através da coloração de "Gram" e as leveduras de bebidas alcoólicas brasileiras, amostra de flores, frutas, melaco e mosto de usinas de fermentação através da coloração de azul de metíleno (0,005%).

### 3.2. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS LEVEDURAS

#### 3.2.1. Estudo do comportamento frente ao Cloreto 2,3,5 Trifeniltetrazolium (TTC)

Para a verificação da capacidade de redução do TTC as leveduras foram suspensas em água destilada estéril em diluição adequada para a obtenção de colônias isoladas.

Amostras de 30  $\mu$ l das suspensões das leveduras puras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de ágar YRD constituído de glicose 1%, peptona 0,2%, extrato de levedura 0,15%,  $KH_2PO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,04% e agar 3% a pH 4,5. Após inoculação, as placas de Petri foram incubadas a 30°C por 24 horas (AKIYAMA & SUGANO 1967).

Após o desenvolvimento das colônias adicionou-se uma "overlay" de ágar de 15 mL de meio TTC (glicose 0,5g, cloreto 2,3,5 trifeniltetrazolium 0,05g e ágar 1,5g dissolvidos em 100 mL de água destilada, sendo o meio ajustado a pH 6,0 dissolvido em banho maria e esfriado a 42°C (AKIYAMA & SUGANO

1967). As placas foram incubadas a 30°C durante 2 a 3 horas. As colônias que apresentaram coloração vermelha, rosa ou branca, foram transferidas para tubos contendo meio de cultura YPDA inclinado.

### 3.2.2. Estudo do Desenvolvimento em Diferentes Temperaturas

As leveduras isoladas foram examinadas quanto à capacidade de desenvolvimento em diferentes temperaturas inoculando-as em placas contendo meio YPDA e ágar Extrato de levedura-extrato de malte (YM) seguido de incubação nas temperaturas de 30, 40, 43, 46 e 47°C durante 48 e 72 horas.

### 3.2.3. Detecção do Fator "Killer"

A atividade "Killer" das leveduras foi detectada através do método de WOODS & BEVAN (1968) modificado.

As células de leveduras a serem estudadas e células padrão de leveduras "Killer" foram inoculadas em placas de Petri em meio ágar Extrato de levedura-polipeptona-dextrose (YEPD) constituído de extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2% e ágar 2,5% e incubadas a 30°C por 2 a 3 dias.

As células de leveduras selvagens e células padrão de leveduras "Killer" desenvolvidas no meio YEPD foram suspensas em água estéril obtendo-se populações de  $10^8$  a  $10^9$  células por mL. As suspensões de células de levedura "Killer" padrão K<sub>1</sub> e K<sub>21</sub> foram inoculadas no meio ágar YEPD tamponado com 10% de solução 1M de ácido cítrico-fosfato a pH 4,5-0,003% de azul de metileno (WOODS & BEVAN, 1968), traçando uma estria horizontal de 1,5 cm de comprimento, e a suspensões de leveduras selvagens foram inoculadas em estrias perpendiculares à anterior

resultando uma figura em forma de cruz. Usou-se como linhagem sensível Torulopsis glabrata ATCC 15126 (efeito Killer K<sub>11</sub>). Além disso utilizou-se como padrões a linhagem S. cerevisiae KL-88 (efeito Killer tipo K<sub>1</sub>) vs. Torulopsis glabrata ATCC 15126 (efeito Killer tipo K<sub>11</sub>).

As placas inoculadas foram incubadas a 25°C por 48 horas. As células sensíveis foram identificadas pela coloração azul na região de cruzamento das estrias, indicando a morte das células sensíveis no meio contendo azul de metileno. Células neutras não apresentam reação na região de cruzamento.

As cepas "Killer" selecionadas foram comparadas quanto ao fator "Killer" de cepas produtoras de fatores K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, K<sub>5</sub>, K<sub>6</sub>, K<sub>7</sub>, K<sub>8</sub>, K<sub>9</sub>, K<sub>10</sub> e K<sub>11</sub>.

As cepas de levedura produtoras de fator "Killer" utilizadas foram:

K<sub>1</sub>: Saccharomyces cerevisiae FSC 5251.

K<sub>2</sub>: Saccharomyces cerevisiae NCYC 761.

K<sub>3</sub>: Candida glabrata NCYC 388.

K<sub>4</sub>: Hansenula anomala NCYC 438.

K<sub>5</sub>: Kluveromyces marxianus NCYC 587.

K<sub>7</sub>: Pichia membranafaciens NCY 435.

K<sub>8</sub>: Hansenula anomala NCYC 435.

K<sub>9</sub>: Hansenula mrakii NCYC 500

K<sub>10</sub>: Kluveromyces drosophilae NCYC 575

### 3.2.4. Estudo de Fermentação Alcoólica

Para este estudo de fermentação alcoólica usou-se como substrato melaco de cana de açúcar. Os açúcares totais foram determinados pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A técnica de fermentação usada foi a descrita por PARK & RIVERA (1982).

Para a preparação do inóculo, as 132 linhagens de leveduras isoladas e selecionadas das bebidas andinas foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de melaco com 10% de açúcares totais e 700 ppm de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ajustado a pH 5,0 e incubadas a 30°C por 24 horas. Posteriormente, inoculou-se 30 mL de inóculo ao frasco de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de melaco com 24% de açúcares totais, 700 ppm de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ajustado ao pH 5,0 para o processo de fermentação. O processo da fermentação alcoólica foi acompanhado através da perda de CO<sub>2</sub>, adaptando-se uma rolha de borracha com dispositivo de vidro na forma de U, contendo ácido sulfúrico concentrado.

Os frascos foram incubados a 30°C e a perda de CO<sub>2</sub> foi acompanhada por meio da variação de peso. A quantidade liberada de CO<sub>2</sub> (g) representa o índice de fermentação e foi medida através da perda de CO<sub>2</sub> em relação ao tempo. As cepas selecionadas obtidas após fermentação a 30°C e que apresentaram maior desenvolvimento, foram incubadas a 40°C e 43°C.

A atividade fermentativa das 132 linhagens de leveduras isoladas das bebidas alcoólicas andinas foi comparada com a atividade fermentativa dos fermentos comerciais Fleishmann e Itaiquara tomados como padrões.

### 3.3. IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

As 30 cepas selecionadas que apresentaram as características de coloração vermelha após tratamento com Cloreto 2,3,5 Trifeniltetrazolium (TTC), desenvolvimento em temperatura elevada, fator "Killer", e boa atividade fermentativa, foram identificadas e classificadas de acordo com as chaves de classificação de KREGER-VAN RIJ (1984); e BARNETT et al (1986). A classificação foi feita levando-se em conta as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e de reprodução.

#### 3.3.1. Características Morfológicas das Leveduras

##### 3.3.1.1. Morfologia das Leveduras em Meio Líquido e em Meio Sólido

###### 3.3.1.1.1. Crescimento em Meio Líquido.

A morfologia celular e o modo de reprodução das linhagens foram examinados em meio de cultura líquido glicose-extrato de levedura-peptone-água contendo 2% de glicose, 1% de peptone e 0,5% de extrato de levedura sem ajuste de pH (KREGER-VAN RIJ 1984). Inocularam-se 1 alçada de culturas jovens das 30 cepas selecionadas, em 30 mL do meio de cultura descrito acima contidos em frascos de Erlenmeyer de 150 mL previamente esterilizados. Após 2 ou 3 dias de incubação a 28°C, as

culturas foram examinadas a olho nú quanto as características de formação de película, floculação, formação de sedimento e ilhas, e observação microscópica de morfologia das células e tipo de reprodução vegetativa. Repetiu-se o exame após 4 semanas e as características morfológicas foram observadas em microscópio Zeiss, utilizando-se um aumento de 500 vezes.

### 3.3.1.1.2. Crescimento em Meio Sólido

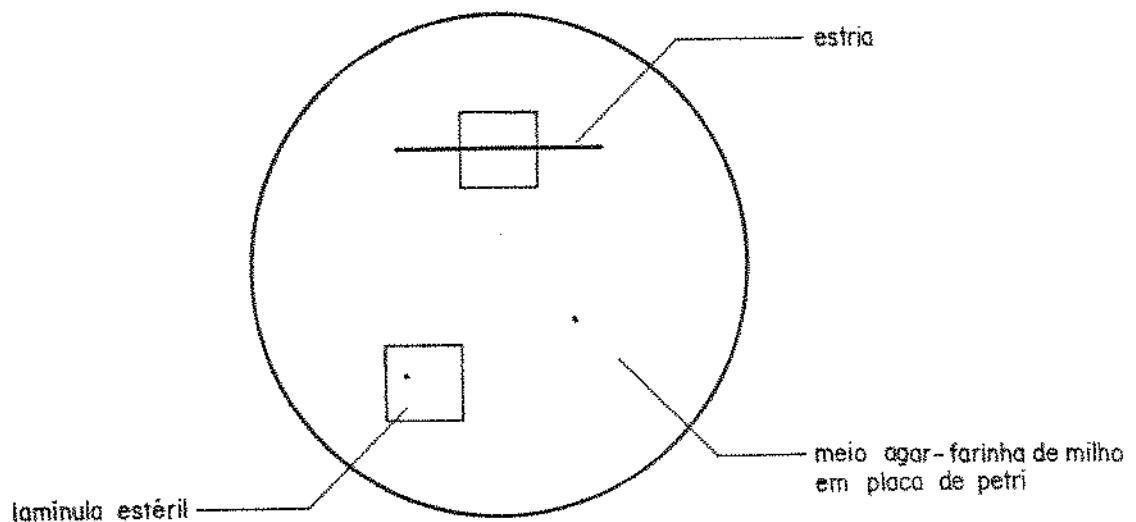
Para o estudo das características morfológicas em meio sólido as culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura constituído por 2% glicose, 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2,5% de ágar, e também em meio YPDA descrito no item 3.1.2. As placas foram incubadas a 28°C por 3 a 5 dias.

Foi observado a forma e o modo de reprodução das leveduras. As características das colônias em meio sólido: (textura, cor, características da superfície, elevação e aspecto das margens), das cepas em estudo foram observadas a olho nú. As características das células foram observadas em Microscópio Zeiss utilizando-se um aumento de 500 vezes.

### 3.3.1.2. Formação de Pseudomicélio e Micélio Verdadeiro

Para este propósito, utilizou-se a técnica de Dalmau (Wickerham citado por KREGER-VAN RIJ, 1984).

Culturas jovens das cepas de leveduras em estudo, foram inoculadas na forma de estria e na forma de ponto na superfície de placas de Petri contendo meio de ágar-farinha de milho na proporção de 1,5% de ágar, 17% de extrato de farinha de milho para 1L de água destilada, como indicado na Figura 4. Na secção



FONTE: Wickerham citado por KREGER-VAN RUY (1984)

**FIGURA 4** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE DALMAU PARA OBSERVAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PSEUDOMICÉLIO E MICÉLIO VERDADEIRO.

central da estria e em um dos pontos de inoculação colocou-se uma lâminula estéril e a formação de pseudomicélio e micélio foram verificadas microscopicamente em aumento de 125 vezes após incubação de 7 a 10 dias.

### 3.3.2. Características Sexuais: Formação de Asco e Ascospores

Para verificar a formação de ascos e ascospores, as culturas jovens das leveduras em estudo previamente desenvolvidas em meio de ágar YM durante 48 horas a 30°C foram inoculadas nos meios de Agar Acetato de Fowell (Fowell citado por KREGER-VAN RIJ, 1984) e Ágar Acetato Mc Clary (Mc Clary et al, citado por KREGER-VAN RIJ, 1984).

Para a preparação do meio Agar acetato de Fowell, adicionou-se 2% de ágar em solução 0,5% de acetato de sódio trihidratado em água destilada, ajustada ao pH 6,5-7,0. Após dissolução do ágar por aquecimento em banho maria, o meio de cultura foi esterilizado em tubos de ensaio. Após a inoculação das cepas de leveduras, os tubos de ensaio foram incubados por 3 meses a 28°C.

As cepas de leveduras em estudo foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar acetato de Mc Clary constituído de 0,1% glicose, 0,18% cloreto de potássio, 0,25% extrato de levedura, 0,82% acetato de sódio trihidratado e 1,5% ágar e incubadas por 3 meses a 28°C.

### 3.3.3. Características Fisiológicas e Bioquímicas

#### 3.3.3.1. Utilização de Compostos de Carbono

##### 3.3.3.1.1. Fermentação de Carboidratos

Para o estudo de fermentação de carboidratos, amostras de 8 mL de solução contendo 4,5g de extrato de levedura e 7,5g de peptona por litro de água deionizada, foram distribuídos em tubos de ensaio contendo tubos de Durham e depois esterilizados. Adicionou-se assépticamente 4 mL de solução 2% (p/v) de glicose, galactose, sacarose, maltose, rafinose, lactose e melibiose previamente esterilizados á 121°C durante 10 minutos (Wickerham citado por KREGER-VAN RIJ).

Para a inoculação 0,4 mL de suspensão de células de levedura, proveniente de cultura de 24 a 48 horas de crescimento ativo em ágar YM, em 4,5 mL de água estéril foi adicionada aos tubos de ensaio.

Após inoculação os tubos de ensaio foram incubados a 25°C durante 14 dias, com agitação esporádica. Após incubação foi observada a formação de gás nos tubos de Duhrum comparando-se com tubos contendo o mesmo meio e sem inoculação.

### 3.3.3.1.2. Assimilação de Compostos de Carbono

As cepas de leveduras foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de caldo YM e incubadas durante 48 horas a 25°C. Após a incubação a massa celular foi lavada duas vezes com 5 mL de água destilada esterilizada centrifugando-se a suspensão de massa celular à 3000 rpm durante 10 minutos. Uma amostra de 100  $\mu$ L de suspensão de  $5,4 \times 10^4$  leveduras/mL foi adicionada assépticamente a tubos contendo 4,5 mL de uma solução de carboidratos estéril contendo 100 mg de fonte de carbono (sacarose, maltose, lactose, rafinose, galactose, inositol, amido solúvel, xilose, ácido succínico, d-manitol, L-ramnose, celobiose, ácido cítrico, trealose ou d-arabinose). A seguir, adicionou-se assépticamente 0,5 mL de YNB (Yeast Nitrogen Base) dez vezes reforçado esterilizado por filtração e os tubos foram incubados a 28°C por 4 semanas.

### 3.3.3.2. Assimilação de Compostos de Nitrogênio - Nitrato

de Potássio ( $KNO_3$ ) (Nickerson citado por KREGER-VAN RIJ 1984)

Para verificação da assimilação de  $N_0_3$ , culturas de 24 a 48 horas de leveduras em meio YPDA foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de solução de 11,7g de YCB (Yeast Carbon Base), e 0,78g de  $KNO_3$  por litro de água deionizada. Os tubos foram incubados a 28°C por 3, 5, 10, e 15 dias.

Após a incubação, adicionou-se 3 a 5 gotas de solução contendo 8g de ácido sulfanílico por litro de ácido acético 5N e 3 a 5 gotas de outra solução contendo 5g de alfa naftilamina por litro de ácido acético 5N.

O desenvolvimento de uma coloração vermelha indicando presença de nitrito foi considerado como assimilação de nitrato positivo. No caso de coloração amarela adicionou-se zinco em pó diretamente no tubo de ensaio antes da interpretação final.

**3.3.3.3. Crescimento em Solução de 10% de Cloreto de Sódio e 5% de Glicose (Wickernam, segundo KREGER-VAN RIJ, 1984)**

Adicionou-se 0,5 mL de uma solução preparada por dissolução de 6,7g de YNB (Yeast Nitrogen Base) em 100 mL de água destilada previamente esterilizada à tubos contendo 4,5 mL de solução 10% de cloreto de sódio e 5% de glicose em água destilada e também previamente esterilizada. A seguir, adicionou-se 0,1 mL de suspensão de levedura preparada como o descrito no teste de assimilação de compostos de carbono no item 3.3.3.1.

Os resultados obtidos foram interpretados quanto ao crescimento celular depois de 21 dias de incubação a 28°C, sendo considerados fracos (+1), moderados (+2) e intenso (+3).

**3.3.3.4. Crescimento a 37°C e outras Temperaturas Máximas de Crescimento**

As cepas testadas foram inoculadas em ágar YM e YPDA a 30°C, 35°C, 37°C, 43°C, 46°C e 47°C por 2 e 4 dias.

**3.3.3.5. Crescimento em Meio Livre de Vitamina (Wickerham, segundo KREGER-VAN RIJ)**

O meio de cultura foi preparado por dissolução de 16,7g de Meio Basal para leveduras sem vitaminas (Vitamin Free Yeast Base) em 100 mL de água desmineralizada. A solução final foi

preparada adicionando-se assepticamente 0,5 mL da solução concentrada a um tubo contendo 4,5 mL de água estéril. As leveduras foram inoculadas da mesma forma como nos tubos de assimilação de carbono. Os tubos incubados a 25°C apresentaram crescimento após 7 dias.

### 3.3.3.6. Resistência a Cicloheximida (Actidiona) (Whiffer segundo KREGER-VAN RIJ 1984)

Uma amostra de 2,5 mL de solução 0,1% de cicloheximida em acetona foi adicionada à solução contendo 6,7g de YNB (Yeast Nitrogen Base), 10g de glicose em 100 ml de água desmineralizada e esterilizadas por filtração. Adicionou-se 0,5 mL desta solução em tubos contendo 4,5 mL de água deionizada estéril. Os tubos foram inoculados da mesma forma como nos testes de assimilação de carbono e nitrogênio, e incubados com agitação a 28°C por 3 semanas. Os resultados de +2 ou +3 após 7 dias de incubação foram considerados positivos, após 14 dias e/ou 21 dias como retardados, e o +1 como negativo.

### 3.3.3.7. Coloração com Diazonium Blue (DBB)

As cepas para estudo foram inoculadas em placas contendo meio de cultura Agar Sabouraud modificado constituído de 4% de glicose, 2% de peptone, 0,5% de extrato de levedura e 2% de agar por 3 semanas a 30°C.

O reagente DBB foi preparado por dissolução de 15 mg de sal DBB ( $\alpha$ -dianisidine tetrazotized Sigma) em 15 mL de tampão TRIS 0,25M, pH 7,0 e mantido em banho de gelo.

Após a incubação dos microrganismos em meio Sabouraud modificado foram aplicados duas gotas do reagente DBB na superfície das colônias. A reação positiva é reconhecida quando as colônias desenvolvem uma coloração vermelho escura ou cor vermelho violeta após 1-2 minutos a temperatura ambiente.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1. ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

#### 4.1.1. Isolamento das leveduras de bebidas alcoólicas andinas

Selecionaram-se para estudo 132 cepas de leveduras de acordo com a morfologia observada em meio YPDA.

Estes dados indicam que leveduras de forma ovalada (51,88%), e o tamanho grande (53,79%) foram predominantes (Quadro 2).

QUADRO 2

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DAS BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS**

Características morfológicas	cepas de levedura	
	nº	%
<b>1. FORMA</b>		
alongadas cilíndrica	34	25,76
redondas	29	21,97
ovaladas	69	52,27
<b>2. TAMANHO</b>		
grande	71	53,79
medio	49	37,12
pequeno	12	9,09

#### 4.1.2. Isolamento das leveduras de bebidas alcoólicas brasileiras, amostras de flores, frutas, melaco e mosto de usinas de açúcar e álcool

Pelo processo de isolamento selecionaram-se 379 cepas de leveduras pela coloração com solução de azul de metileno apresentando a maioria delas as formas ovaladas e redondas e tamanho mediano e pequeno.

#### 4.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS E SELECIONADAS

##### 4.2.1. Estudo do comportamento das leveduras frente ao Cloreto 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium (TTC).

Como indicam os dados do QUADRO 3 a maioria (55,36%) das leveduras obtidas apresentaram coloração rosa no teste de redução do TTC. De acordo com os resultados obtidos, selecionaram-se 132 linhagens de leveduras das quais 51 (38,64%) foram vermelhas, 42 (31,82%) rosas e 39 (29,54%) brancas.

A coloração vermelha apresentada pelas 51 linhagens de leveduras deve-se aos sistemas desidrogenases e enzimas do sistema glicolítico que atua na redução do TTC a trifenilformazana, segundo indica STRAUSS et al (1948)

Afirma-se que o uso do TTC é vantajoso sobre outros indicadores como teste de viabilidade, por ser um dos poucos compostos orgânicos que possui a capacidade de colorir em estado reduzido, como ilustra-se nos resultados do Quadro 3.

Neste Quadro as amostras 25, 28, 29, 32, 33, 35, 117, 120-1 e 377 não apresentam células de leveduras viáveis porque só apresentam colônias branca que pode ser devido à não redução do indicador do TTC pelas desidrogenases da levedura a trifenilformazam ou por incapacidade das células em consumir ou absorver oxigênio.

QUADRO 3. NÚMERO E PORCENTAGEM DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS COLORIDAS COM o TTC PROVENIENTES DE 45 AMOSTRAS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS

No de amostra	Tipo de bebida	Número de colônias vermelhas %	Número de colônias rosas %	Número de colônias brancas %	Total de colônias
1	chicha	10 9,25	60 55,55	38 35,18	108
2	chicha	21 24,7	60 70,59	4 4,71	85
3	chicha	8 4,3	176 95,13	1 0,5	185
4	masato	137 56,61	89 36,77	16 6,61	242
5	milho	2 1,47	91 66,91	43 31,61	136
6	chicha	10 6,6	158 94,00	- -	168
7	chicha	17 10,25	149 89,75	- -	166
8	chicha	9 5,89	144 94,11	- -	153
9	chicha	7 8,75	73 91,25	- -	80
10	chicha	4 30,77	9 69,23	- -	13
11	chicha	6 42,85	8 57,15	- -	14
12	chicha	7 9,73	65 90,27	- -	72
13	chicha	13 11,12	104 88,88	- -	117
14	chicha	2 22,22	7 77,77	- -	84
15	chicha	7 8,34	77 91,66	- -	88
16	chicha	3 37,50	5 62,50	- -	41
17	chicha	7 5,00	134 95,00	- -	141
18	chicha	- -	16 100,00	- -	16
19	chicha	2 6,25	30 93,75	- -	32
20	chicha	- -	2 100,00	- -	2
21	chicha	2 22,22	6 66,66	1 11,12	9
22	chicha	- -	11 91,66	1 8,34	12
23	masato	- -	150 100,00	- -	150
24	chicha	15 6,82	170 77,27	35 15,91	220
25	masato	- -	- -	26 100,00	26
26	masato	- -	35 100,00	- -	35
27	masato	- -	42 100,00	- -	42
28	masato	- -	- -	25 100,00	25
29	masato	- -	- -	15 100,00	15
30	masato	- -	36 85,72	5 14,28	35
31	masato	- -	10 28,57	25 71,43	35
32	masato	- -	- -	38 100,00	38
33	masato	- -	- -	17 100,00	17
34	tarubá	17 68,00	- -	10 32,00	27
35	champú	- -	- -	6 100,00	6
36	champú	- -	1 6,25	15 93,75	16
37	masato	5 55,55	1 11,11	3 33,33	9
113	masato	23 65,71	- -	12 34,28	35
115	chicha	10 13,85	112 86,15	- -	130
117	moliente	- -	- -	9 100,00	9
118	chicha	35 46,05	- -	41 53,95	76
119	chicha	45 81,81	- -	10 18,19	55
120-1	chicha	- -	- -	25 100,00	25
377	chicha	- -	- -	25 100,00	25
378	chicha	- -	35 100,00	- -	35
Média (%)		16,58%	55,36%	28,06%	

#### 4.2.2. Desenvolvimento em temperatura elevada

Foi testado o desenvolvimento de 511 cepas de leveduras em meio YPDA e YM à temperaturas de 30, 40, 43, 46 e 47°C (Quadro 4). Nesta pesquisa foram obtidos 2 cepas (115-1g e 115-2p) que cresceram a 46°C e 3 cepas (2-13, 9-75 e 15-72) que cresceram à temperatura máxima testada de 47°C (Quadro 4). Os dados do Quadro 4 indicam que a maioria das leveduras isoladas são mesófilas (364 cepas de leveduras) que representam 71,23% do total de cepas de leveduras isoladas. Além disto, entre as 147 cepas de leveduras termófilas que representam 28,77% do total, as que desenvolvem em temperatura de 43°C estão presentes em maior porcentagem (20,54%).

QUADRO 4

#### DESENVOLVIMENTO DAS CEPAS DE LEVEDURAS CULTIVADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO YPDA E YM

Temperatura máxima de crescimento °C	Cepas que apresentaram desenvolvimento	No	%	Classificação de acordo com a tem- peratura de desen- volvimento
30°C	364	71,23		mesófilas
40°C	37	7,24		termófilas
43°C	105	20,54		termófilas
46°C	2	0,39		termófilas
47°C	3	0,59		termófilas

#### 4.2.3. Detecção do Fator "Killer"

Um total de 511 cepas de leveduras isoladas de diversas fontes foram testadas quanto ao fator "Killer". Os resultados referentes à presença do fator "Killer" em leveduras provenientes das bebidas alcoólicas andinas estão indicados no Quadro 5. Verificou-se que 52 cepas foram sensíveis e 86 cepas

foram neutras ao fator "Killer"  $K_1$ . Nenhuma cepa apresentou sensibilidade ao fator Killer  $K_{11}$ . Somente 3 cepas (9-75, 15-72 e 22-90) apresentaram fator "Killer" sobre Ioruloesis glabrata ATCC 15126 que produzem fator Killer  $K_{11}$  como pode ser observado na Figura 5. Comparativamente, das 376 cepas de leveduras isoladas das bebidas e outras fontes brasileiras, 313 cepas foram neutras ao efeito Killer  $K_1$ , 33 cepas foram sensíveis a  $K_1$ , e todas as cepas apresentaram-se neutras ao  $K_{11}$ . Apenas as cepas 183 e 185 apresentaram efeito Killer contra I. glabrata ATCC 15126 (Killer  $K_{11}$ ).

#### QUADRO 5

RESPOSTA E PRODUÇÃO DE FATOR "KILLER" EM CEPAS DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS E CEPAS DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE BEBIDAS BRASILEIRAS, E DE OUTRAS FONTES (FLORES, FRUTAS, MELAÇO E MOSTO DE USINAS DE ACÚCAR E ÁLCOOL)

Tipo de fator "Killer"	No de cepas isoladas		TOTAL
	Paises andinos	Brasil	
neutra a $K_1$	86	313	399
sensíveis a $K_1$	52	33	85
neutra a $K_{11}$	129	377	506
Killer a $K_{11}$	3	2	5

O Quadro 6 ilustra as 5 cepas que apresentaram o fator Killer contra  $K_{11}$  (9-75, 15-72, 22-90, 183 e 185), bem como as leveduras provenientes do fermento comercial Fleischmann e Itaiquara foram comparadas com as cepas de leveduras indicadas



FIGURA 5. FATOR "KILLER" APRESENTADO PELAS CEPAS DE LEVEDURAS (9-75, 15-72 e 22-90) ISOLADAS DAS BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS

no item 3.2.3, que produzem efeito Killer  $K_E$ ,  $K_A$ ,  $K_4$ ,  $K_{18}$ ,  $K_{48}$ ,  $K_T$ ,  $K_B$ ,  $K_{18}$  e  $K_{188}$ .

Segundo WICKNER (1979) as leveduras com fator Killer  $K_{18}$  podem matar as leveduras com efeito Killer  $K_A$ ,  $K_E$  e  $K_{188}$ ; porém, a levedura produtora de efeito "Killer"  $K_{18}$  pode ser morta pelas demais leveduras "Killer" ( $K_A$  a  $K_{188}$ ).

#### QUADRO 6

##### FATOR "KILLER" DAS CEPAS DE LEVEDURAS SELECCIONADAS

Cepas de leve- duras	Efeito Killer									
	$K_1$	$K_E$	$K_A$	$K_4$	$K_8$	$K_{18}$	$K_T$	$K_B$	$K_{188}$	$K_{18}$
9-75	N	+	+	+	N	N	N	N	N	+
15-72	N	+	+	+	N	N	N	N	N	+
22-90	N	+	+	+	N	+	N	*	*	+
183	N	+	N	+	N	N	N	+	N	+
185	N	+	N	+	N	N	N	+	N	+
Fleisch.	*	N	N	N	N	N	N	*	N	*
Itaiq.	*	N	N	N	N	N	N	*	N	*

+: Killer (Exemplo: Fator "Killer" da levedura 9-75 mata levedura  $K_E$ )

\*: sensível (Exemplo: Levedura 22-90 foi morta pela levedura  $K_B$ )

N: neutra (Exemplo: Levedura 9-75 neutra a  $K_A$ )

Portanto, a cepa em questão de *T. glabrata* pode ser usada para identificar o fator Killer ( $K_A$  a  $K_{188}$ ) produzido por leveduras.

As leveduras que produzem o fator "Killer"  $K_E$ ,  $K_A$ ,  $K_4$  e  $K_{18}$  demonstraram sensibilidade às cepas 9-75 e 15-72.

A cepa 22-90 apresentou maior espectro de atividade "Killer" em relação às demais. As cepas 183 e 185 apresentaram

ligeira diferença com a 22-90 na classificação do fator "Killer" indicada no Quadro 1.

O fator "Killer" foi evidenciado através do halo de inibição de crescimento na área de cruzamento da cepa sensível e cepa testada. As células de leveduras mortas devido a ação da toxina Killer adquirem coloração azul. Esta coloração deve-se provavelmente à adsorção do azul de metileno pelas células de leveduras mortas explicado porque o azul de metileno possui cargas positivas (cátions) que se combina fortemente com os constituintes celulares da levedura carregados negativamente (ácidos nucléicos e polissacarídeos ácidos) segundo o indicado por BORZANI E VAIRO (1958).

#### 4.2.4. Estudo da Fermentação Alcoólica

Neste trabalho as cepas de leveduras foram inoculadas no meio de melão de cana como fonte de sacarose, ajustado a pH 5,0. O valor de pH do meio diminui até 3,5-3,7 em relação ao inicial, devido à produção de ácidos orgânicos pela levedura.

Muitas cepas de *S. cerevisiae* crescem em uma ampla faixa de pH (2,4 a 8,6), mas fermentam em intervalo de pH mais restrito (3,5 a 6,0) (JONES et al., 1981).

No estudo da capacidade fermentativa de 132 cepas de leveduras estudadas, 44 cepas (33,33%), apresentaram maior poder de fermentação alcoólica do que as leveduras comerciais (Fleischmann e Itaiquara) num tempo de 230 horas de fermentação, à temperatura de 30°C. A produção de CO<sub>2</sub> foi utilizada como índice de fermentação alcoólica. Sustentando-se em cálculos estequiométricos da reação de fermentação, pode-se

considerar que 1g de  $\text{CO}_2$  representa aproximadamente 1g de etanol (item 2.3.2.3).

O Quadro 7 ilustra a produção de  $\text{CO}_2$  por cepas de leveduras isoladas das bebidas alcoólicas andinas que apresentaram maior poder fermentativo e a coloração das colônias de levedura com o TTC. Das 27 cepas indicadas como as melhores em poder fermentativo, 7 delas produziram um teor de  $\text{CO}_2$  superior à 20g e coloração vermelho pela redução com o TTC e foram selecionadas para posterior análise de identificação e classificação.

Os resultados do Quadro 7, verificam o indicado por YOSHIDA et al (1982), uma vez que as leveduras que apresentaram colônias de cor vermelho, pelo método de coloração de TTC. Também apresentaram uma capacidade maior de assimilação e fermentação dos carboidratos quando comparada com aquelas que apresentaram colônias de cor rosa ou branca.

Nas figuras 6 a 16 está representado o comportamento das cepas das bebidas alcoólicas andinas quanto à produção de  $\text{CO}_2$  durante a fermentação alcoólica, comparado com o dos fermentos comerciais Fleischmann e Itaiquara.

Observa-se na Figura 6 que o poder fermentativo das leveduras 2-18, 3-22, 3-24, 4-27, 2-14, 1-5, 3-23, 4-28, 1-10, 3-26, 3-21, 2-12, 2-19, 1-11 e na Figura 7 as cepas de leveduras 5-34, 9-75, 15-72, 2-13, 21-82, 2-20, 1-4 e 1-2 isoladas das bebidas alcoólicas andinas foi inferior às comerciais (Fleischmann e Itaiquara), sendo que a produção de  $\text{CO}_2$  das cepas 2-18, 3-22 e

3-24 foi muito próximo à fermento comercial Itaiquara na Figura 6.

QUADRO 7

PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub> POR CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS QUE APRESENTARAM MAIOR PODER FERMENTATIVO, EM CALDO DE MELAÇO E COLORAÇÃO DAS COLÔNIAS DE LEVEDURA COM O TTC

Inóculo: 30 ml de suspensão de levedura em caldo de melaço com 10% de açúcares totais  
temperatura: 30°C; tempo: 230 horas

No de Cepa	formação de CO <sub>2</sub> (g)	coloração das colônias de levedura com o TTC
6-38	20,25	vermelha
6-39	17,80	vermelha
8-43	17,38	vermelha
8-44	16,72	vermelha
10-46	20,00	vermelha
10-48	20,02	vermelha
10-49	20,08	vermelha
11-50	17,81	vermelha
11-51	16,34	vermelha
11-52	21,36	vermelha
11-53	19,17	rosa
11-54	16,92	vermelha
11-55	17,11	vermelha
12-57	16,56	vermelha
12-59	19,36	vermelha
13-61	19,03	vermelha
15-70	20,01	vermelha
16-74	20,00	vermelha
19-81	16,76	vermelha
19-82	19,70	vermelha
20-85	18,08	rosa
21-86	17,11	vermelha
21-87	18,89	rosa
24-2	19,29	vermelha
34-1	17,82	vermelha
118-2	17,88	vermelha
119-2	18,06	vermelha

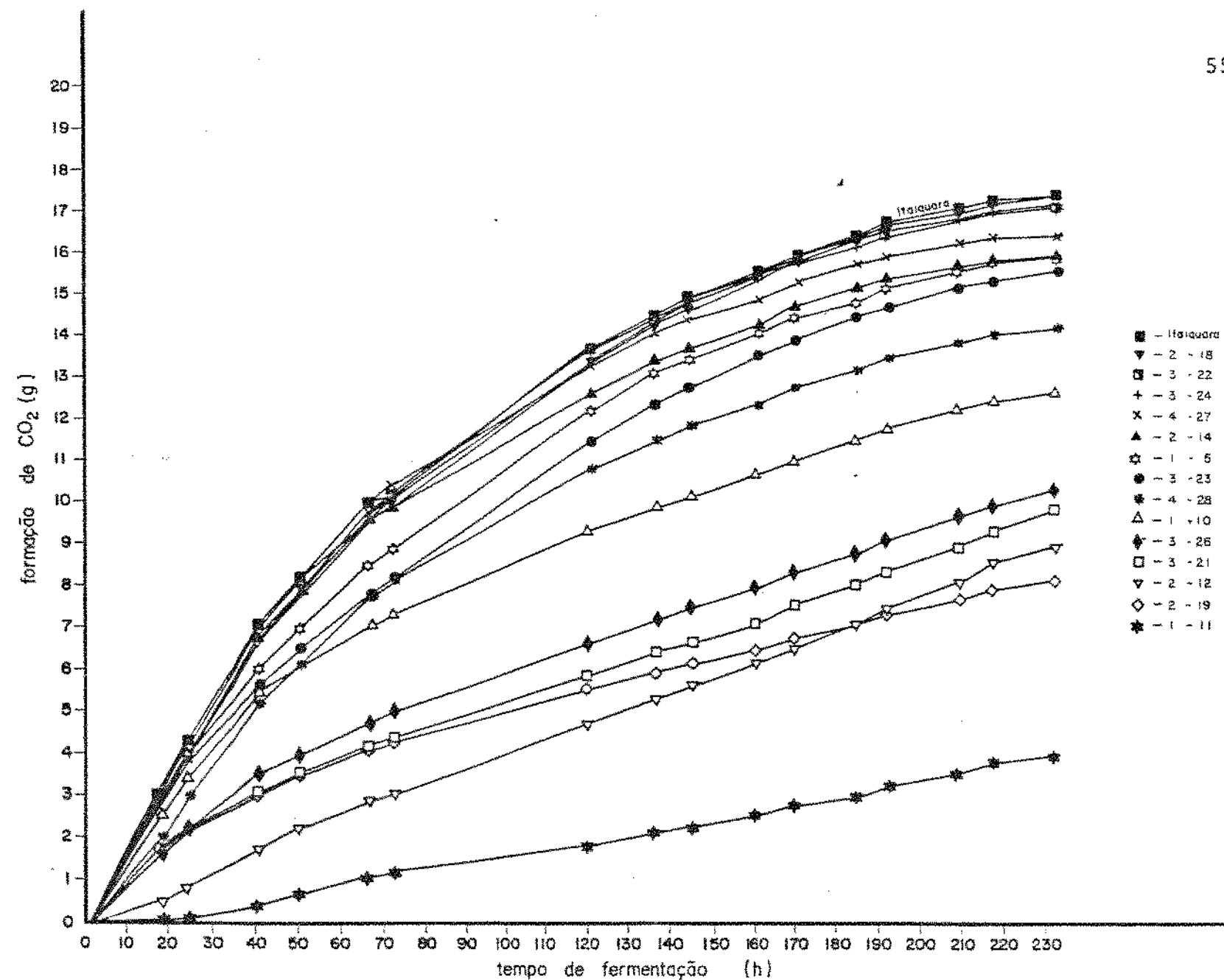


FIGURA 6 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 2-18, 3-22, 3-24, 4-27, 2-14, 1-5, 3-23, 4-28, 1-10, 3-26, 3-21, 2-12, 2-19, E 1-11 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA A 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS.

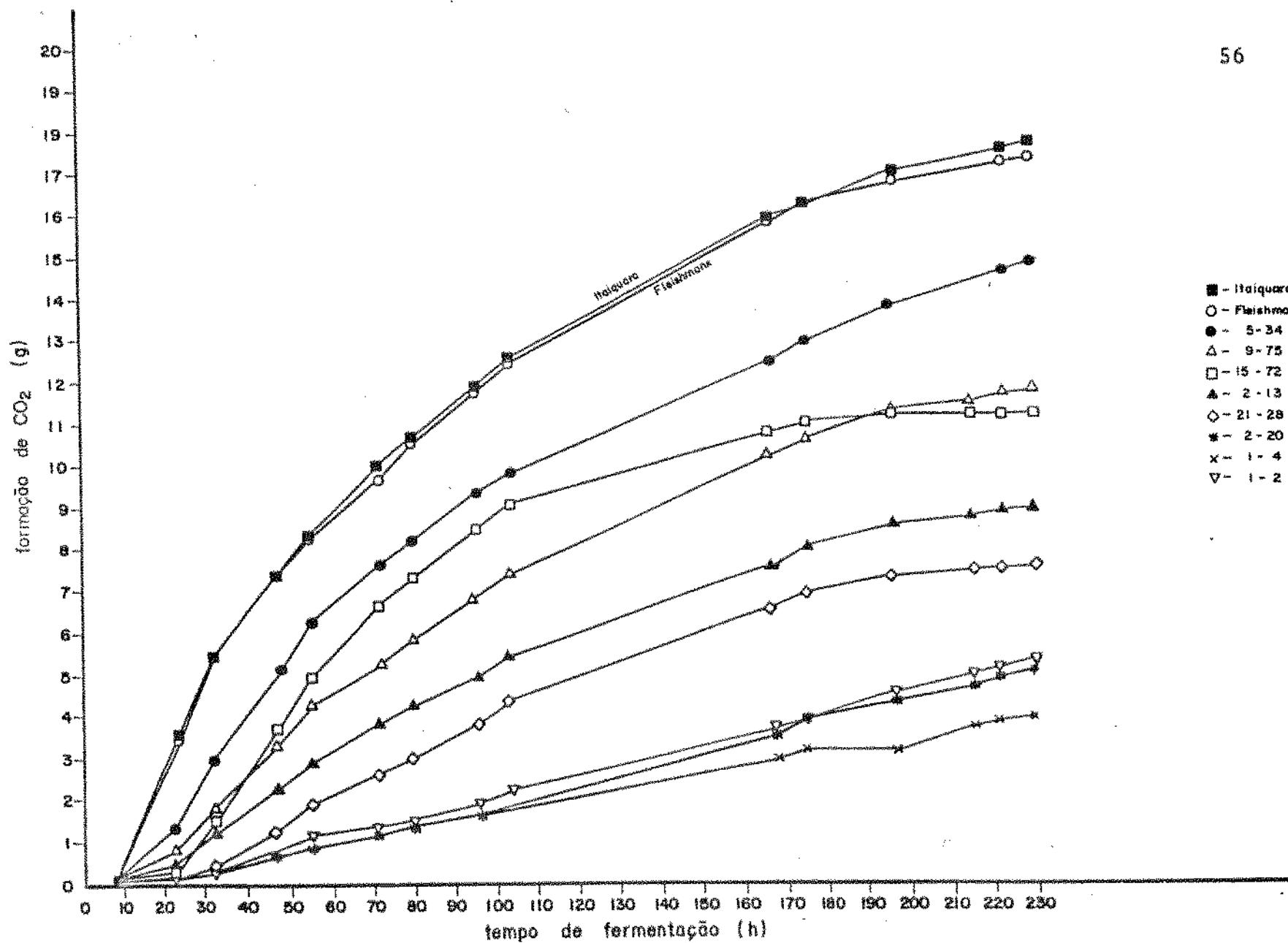


FIGURA 7 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 5-34, 9-75, 15-72, 2-13, 21-28, 2-20, 1-4 E 1-2 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

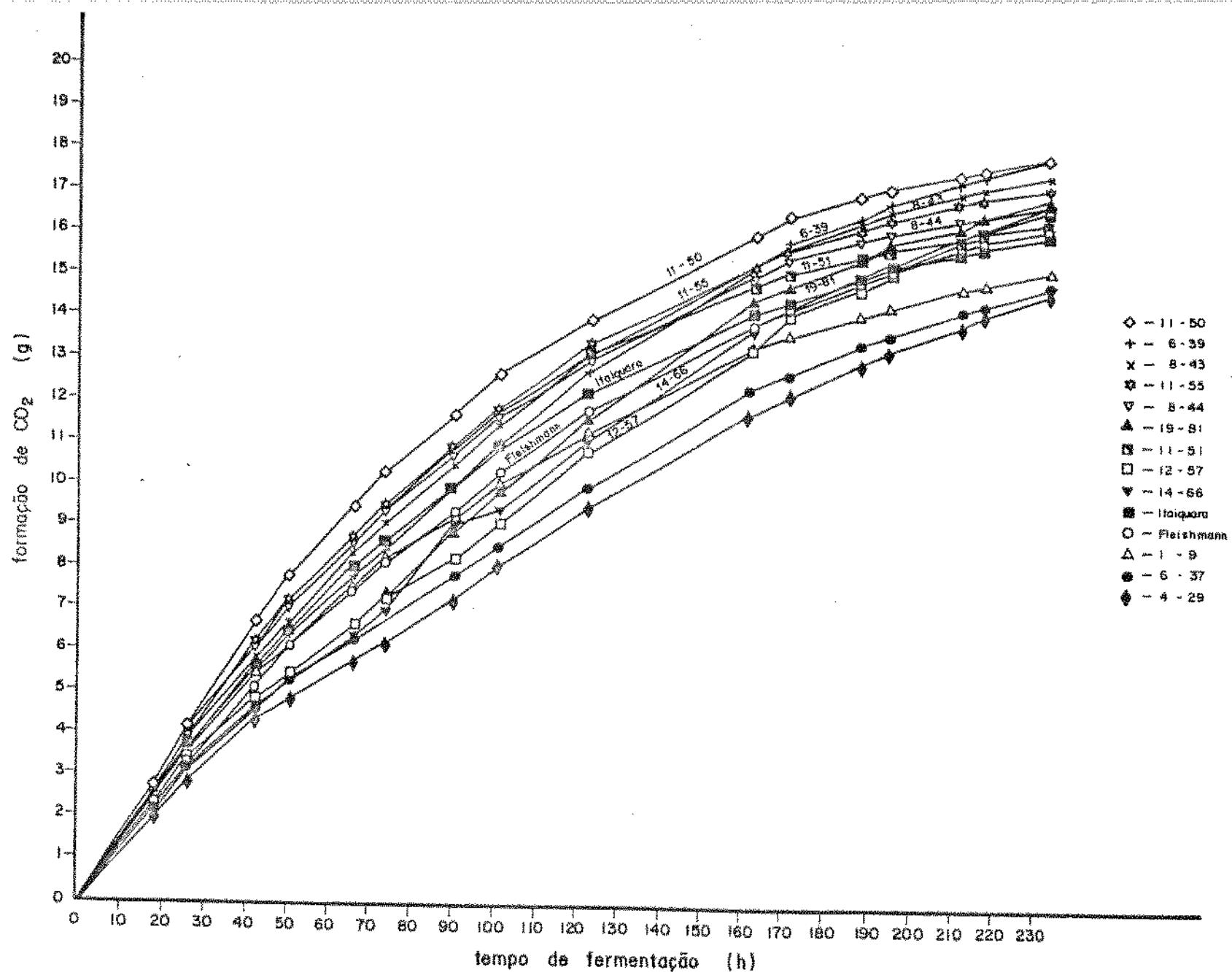


FIGURA 8 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 11-50, 6-39, B-43, 11-55, 6-44, 19-81, 11-51, 12-57, 14-66, 1-9, B-37 E 4-29 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS.

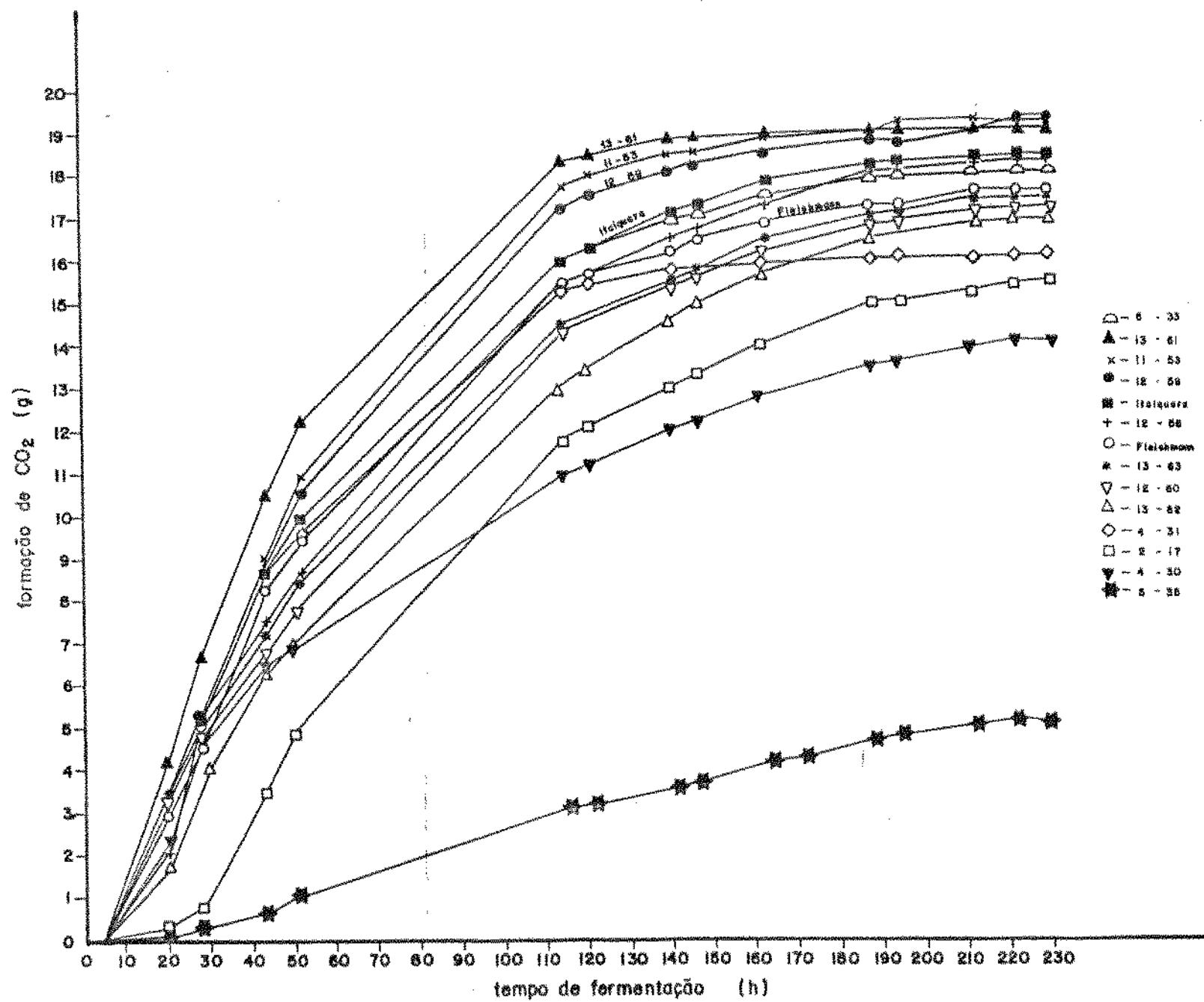


FIGURA 9 FORMAÇÃO DE CO<sub>2</sub> POR CEPAS DE LEVEDURAS 5-33, 13-61, 11-53, 12-59, 12-56, 13-63, 12-60, 13-62, 4-31, 2-17, 4-30 E 5-35 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS.

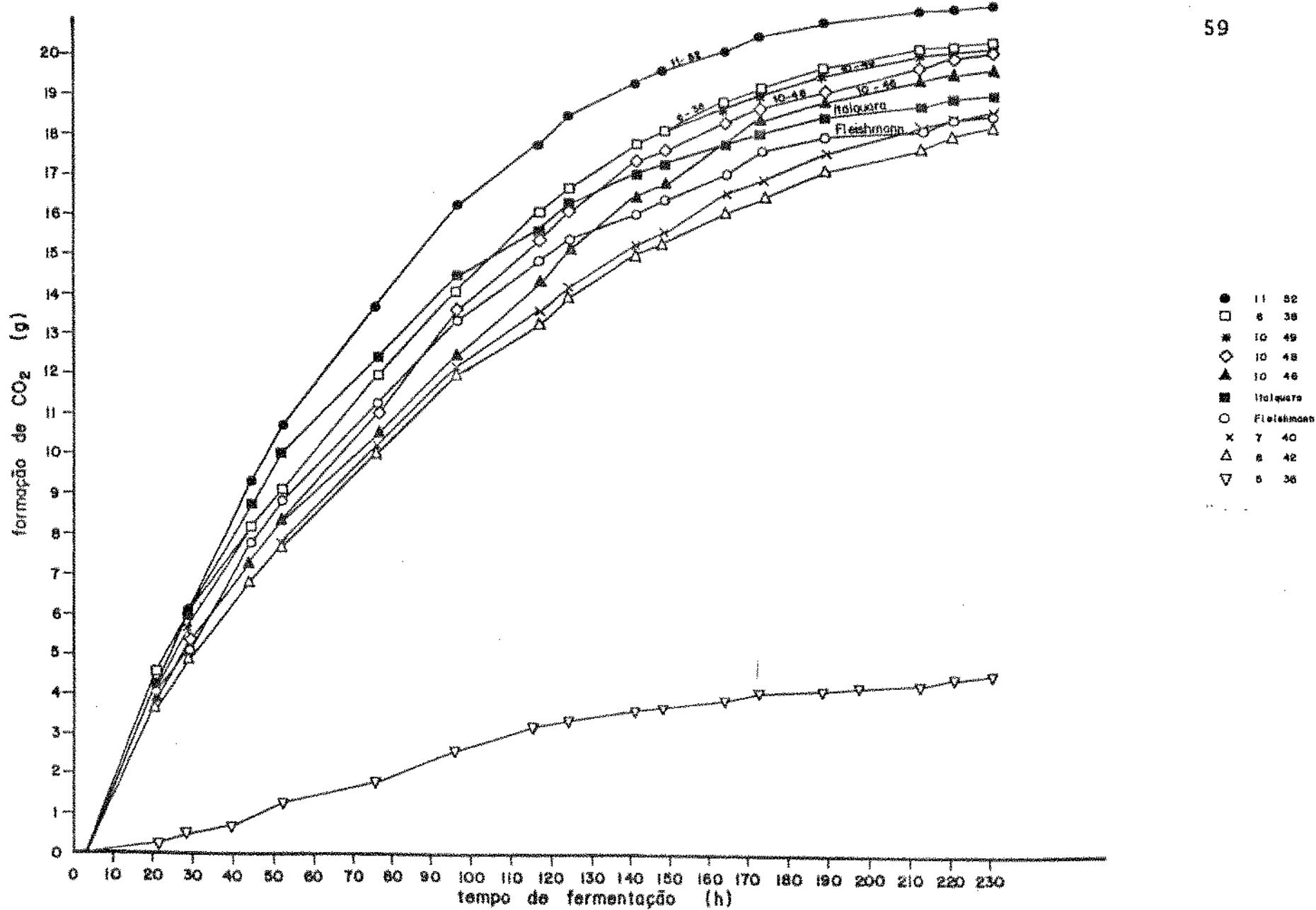


FIGURA 10 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 11-52, 6-38, 10-49, 10-48, 10-46, 7-40, 8-42 E 5-36 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

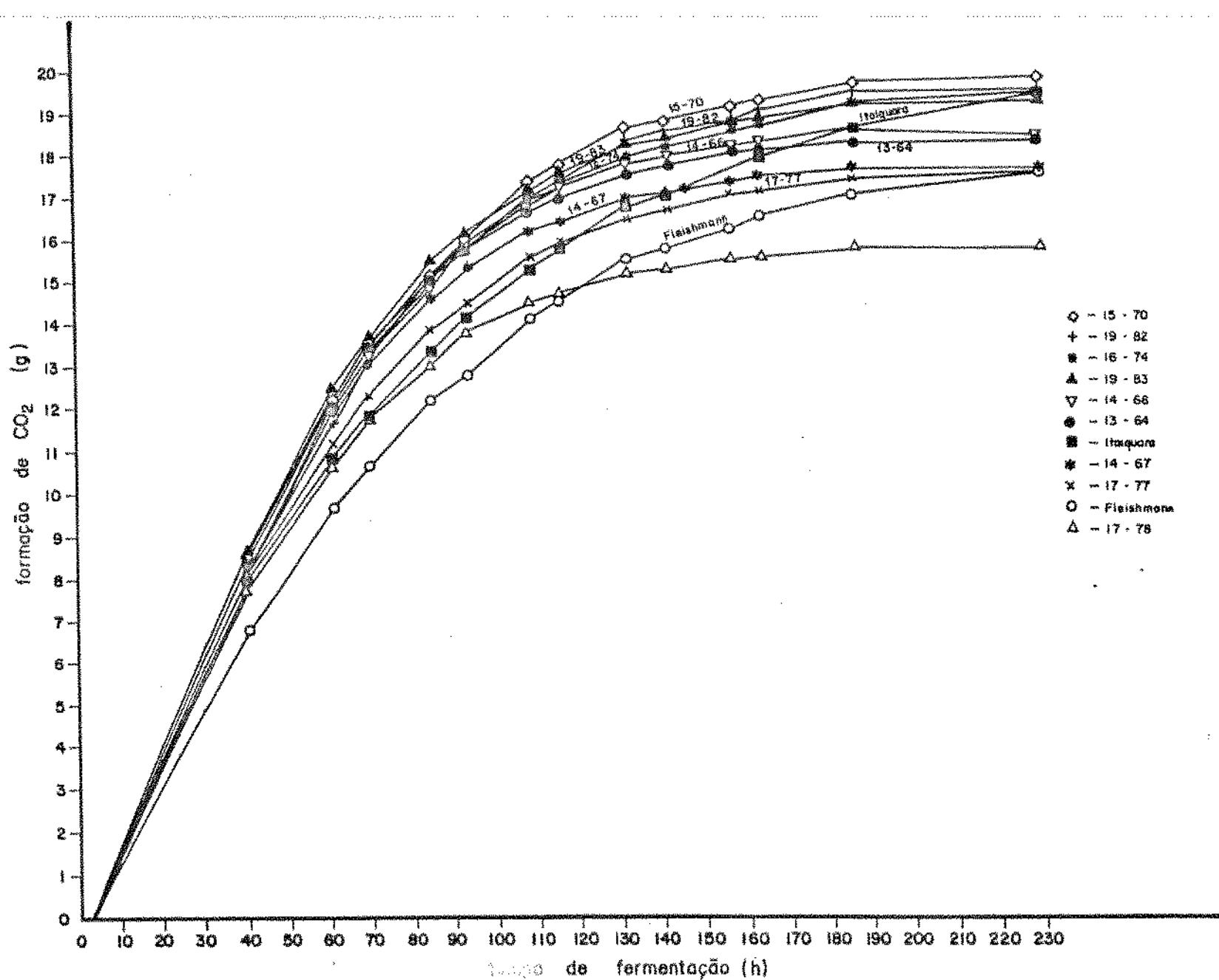


FIGURA 11 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 15-70, 19-82, 16-74, 19-83, 14-66, 13-64, 14-67, 17-77 E 17-78 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

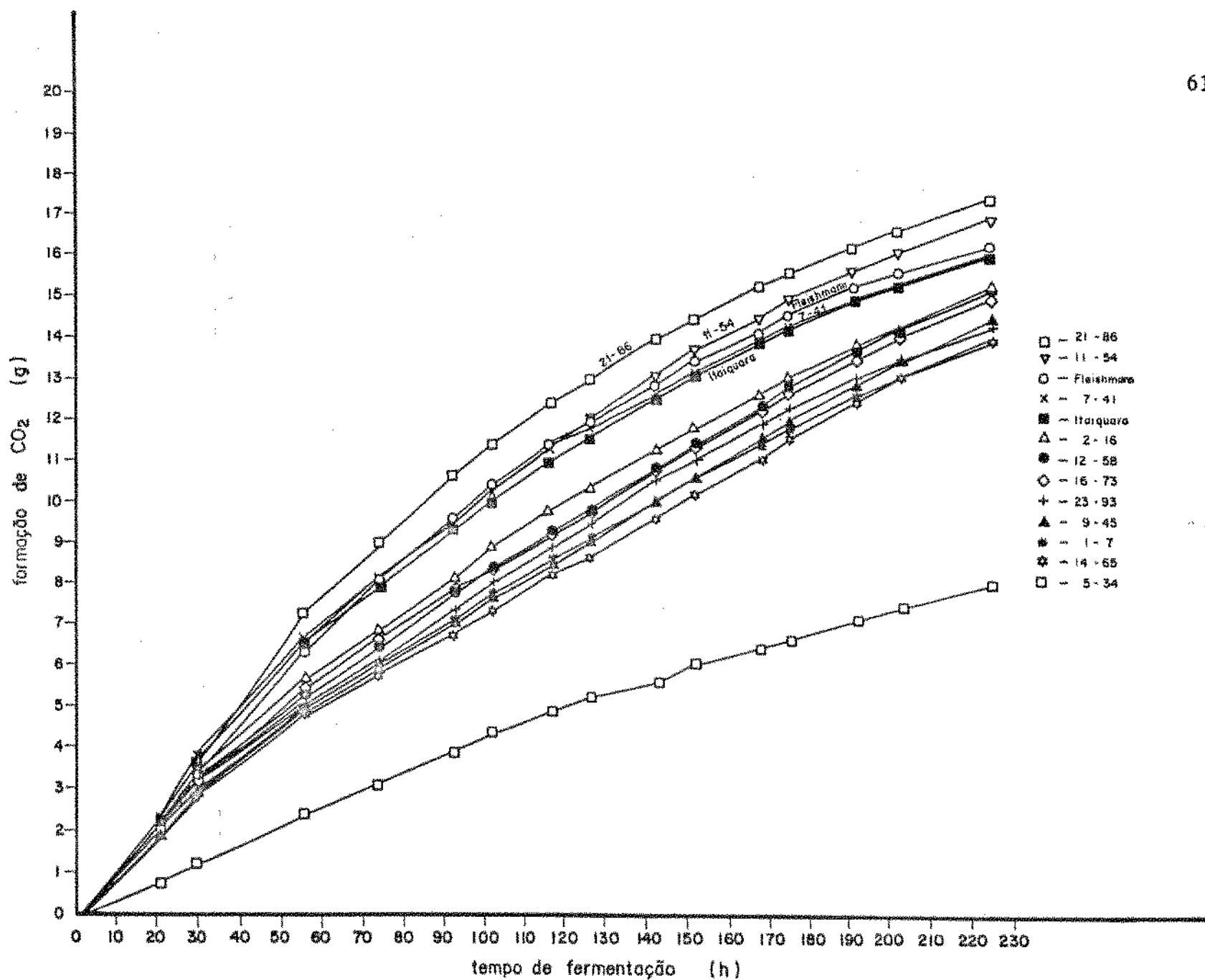


FIGURA 12 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 21-86, 11-54, 7-41, 2-16, 12-58, 16-73, 23-93, 9-45, 1-7, 14-65 E 5-34 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS.

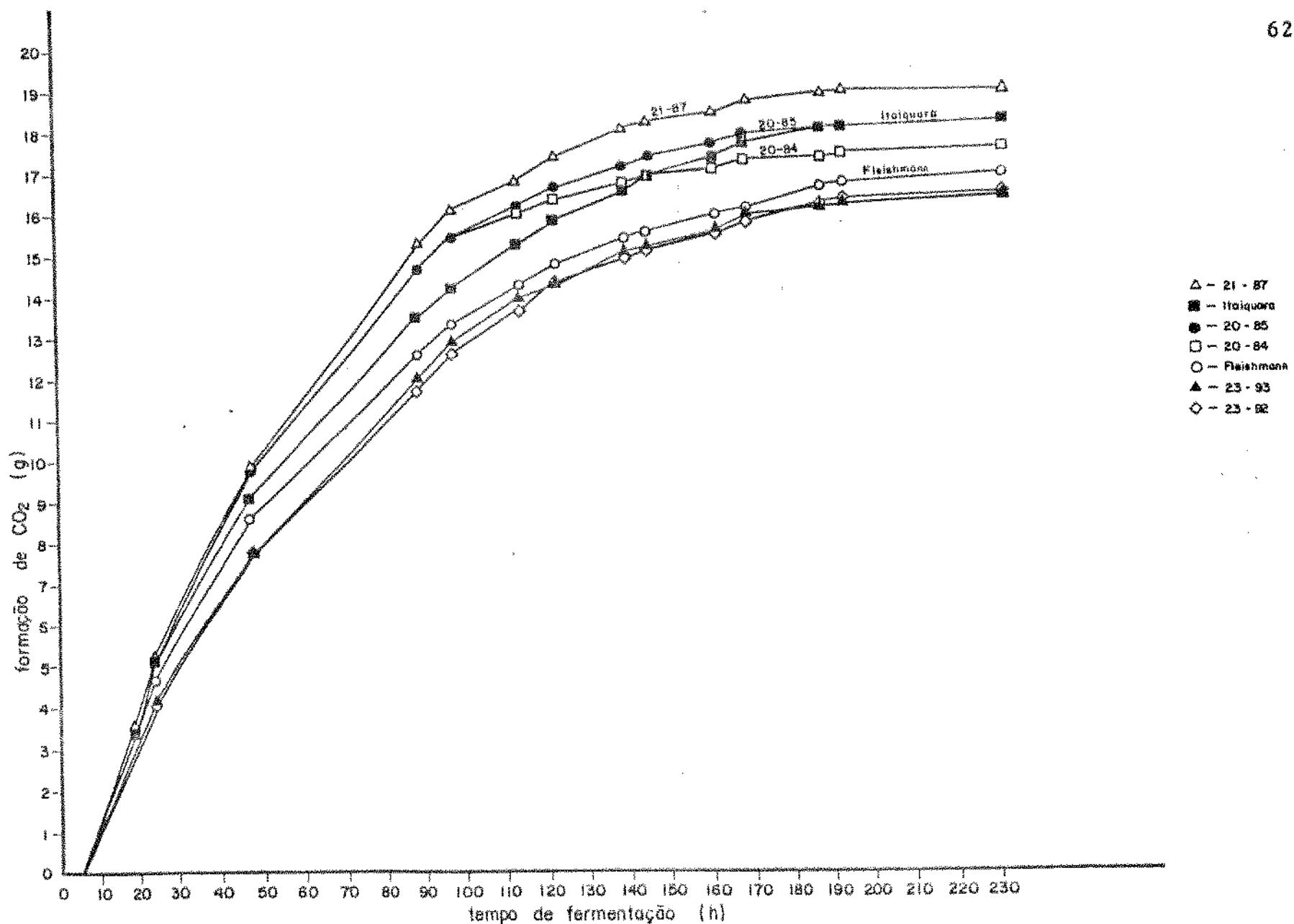


FIGURA 13 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CÉPAS DE LEVEDURAS 21-87, 20-84, 20-85, 23-93 E 23-92 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CÉPAS COMERCIAIS.

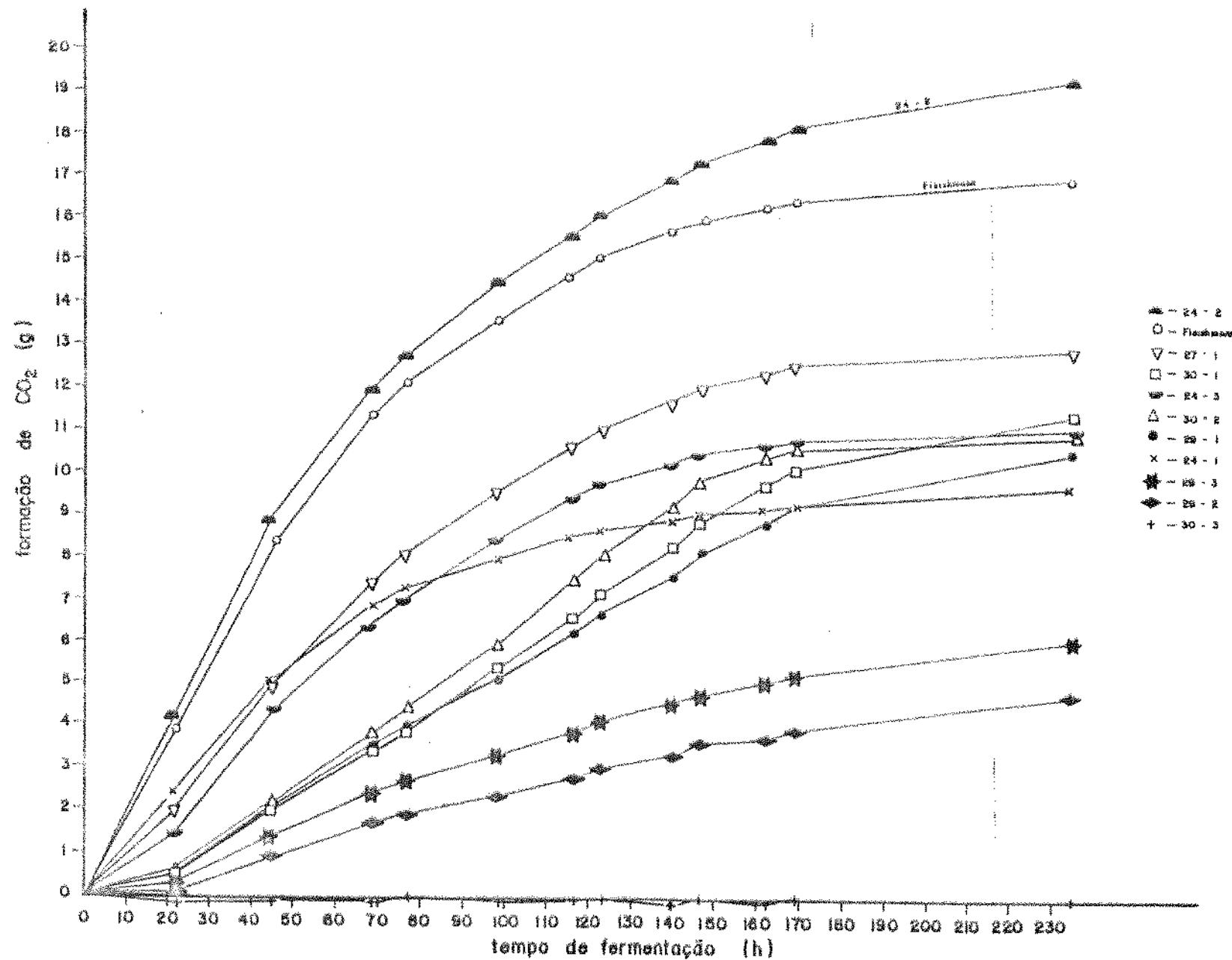


FIGURA 14 FORMAÇÃO DE CO<sub>2</sub> POR CEPAS DE LEVEDURAS 24-2, 27-1, 30-1, 28-3, 29-2 E 30-3 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

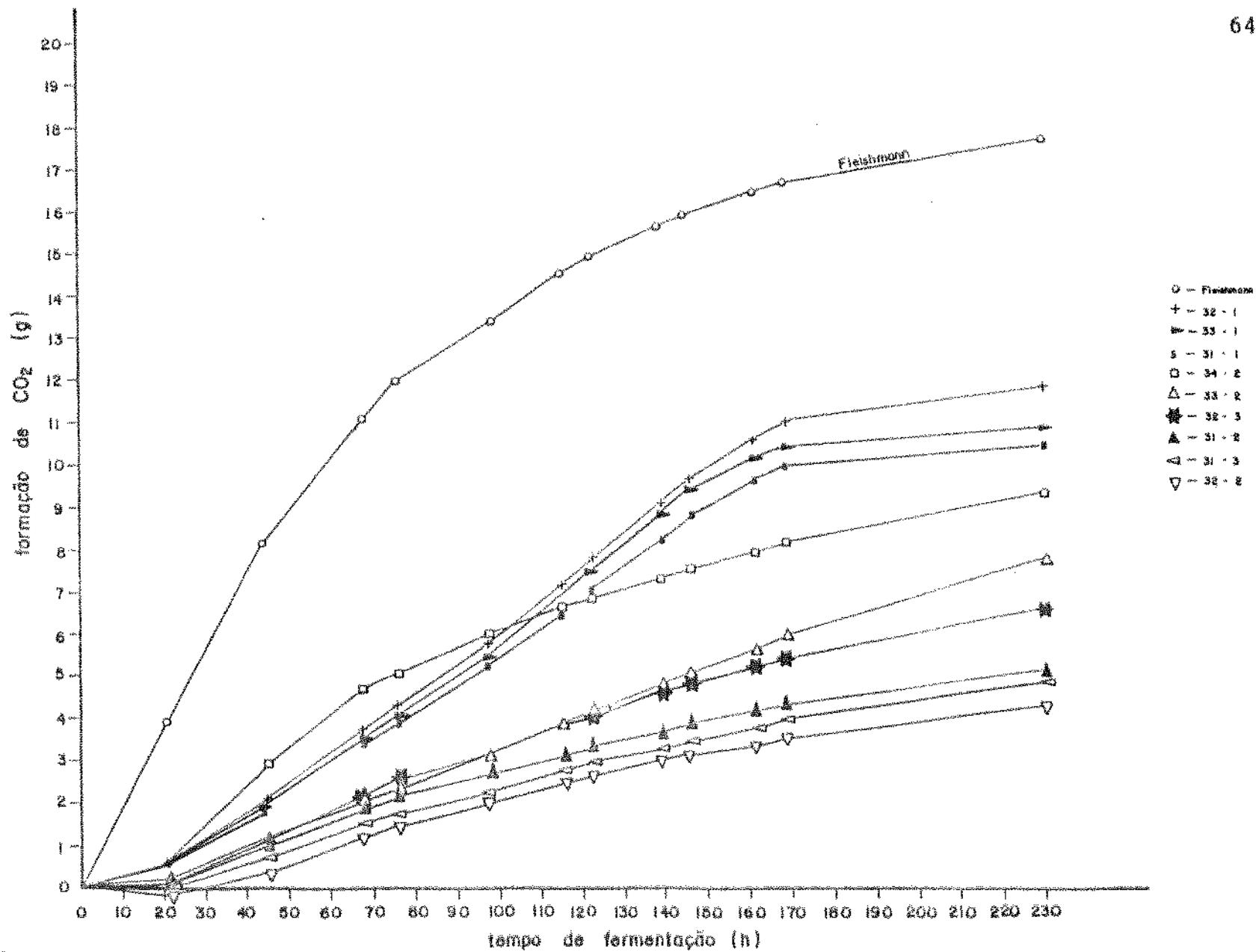


FIGURA 15 FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 32-1, 33-1, 31-1, 34-2, 33-2, 32-3, 31-2, 31-3 E 32-2 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

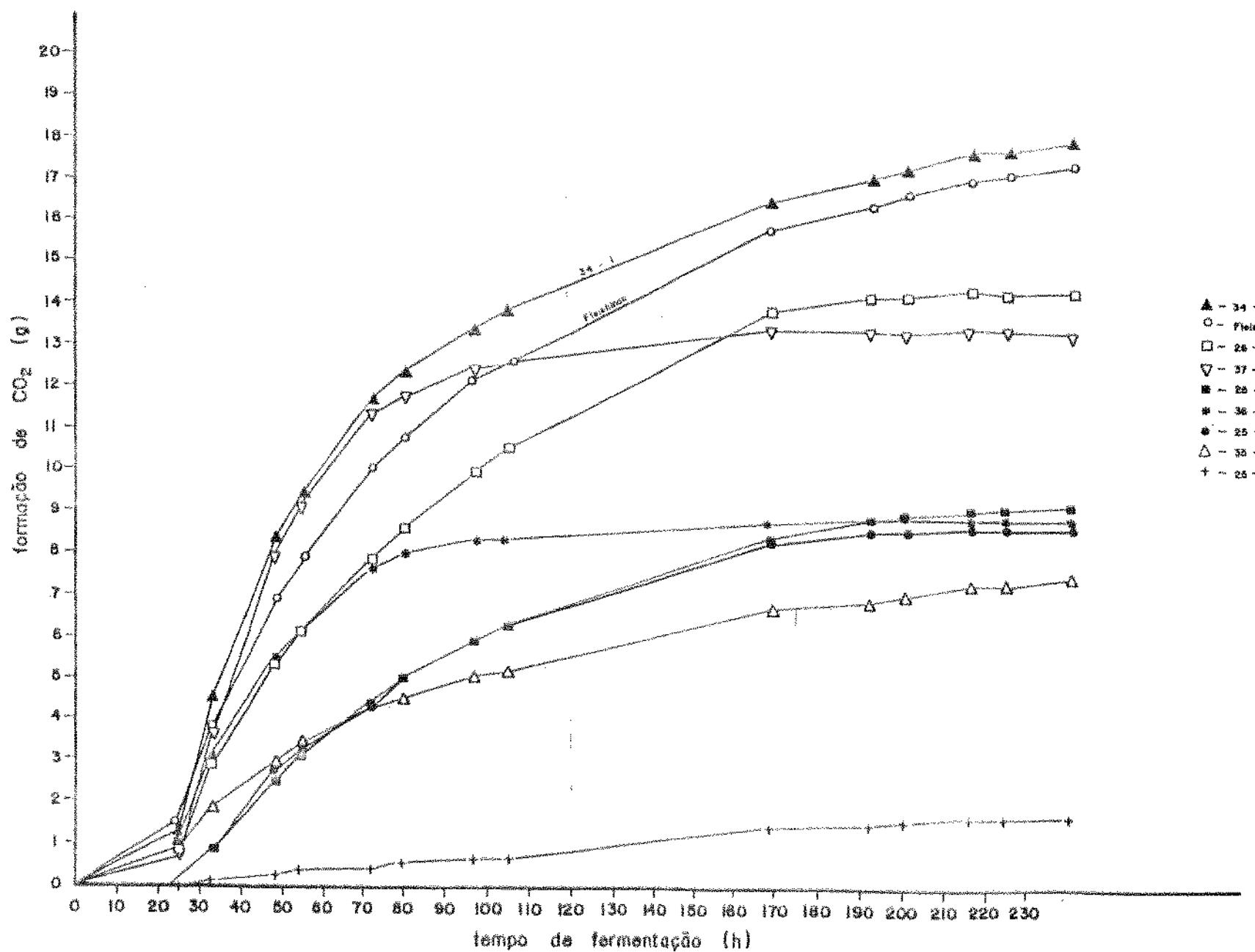


FIGURA 16 FORMAÇÃO DE CO<sub>2</sub> POR CEPAS DE LEVEDURAS 34-1, 26-1, 37-2, 28-1, 36-2, 25-1, 35-2 E 25-2 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS.

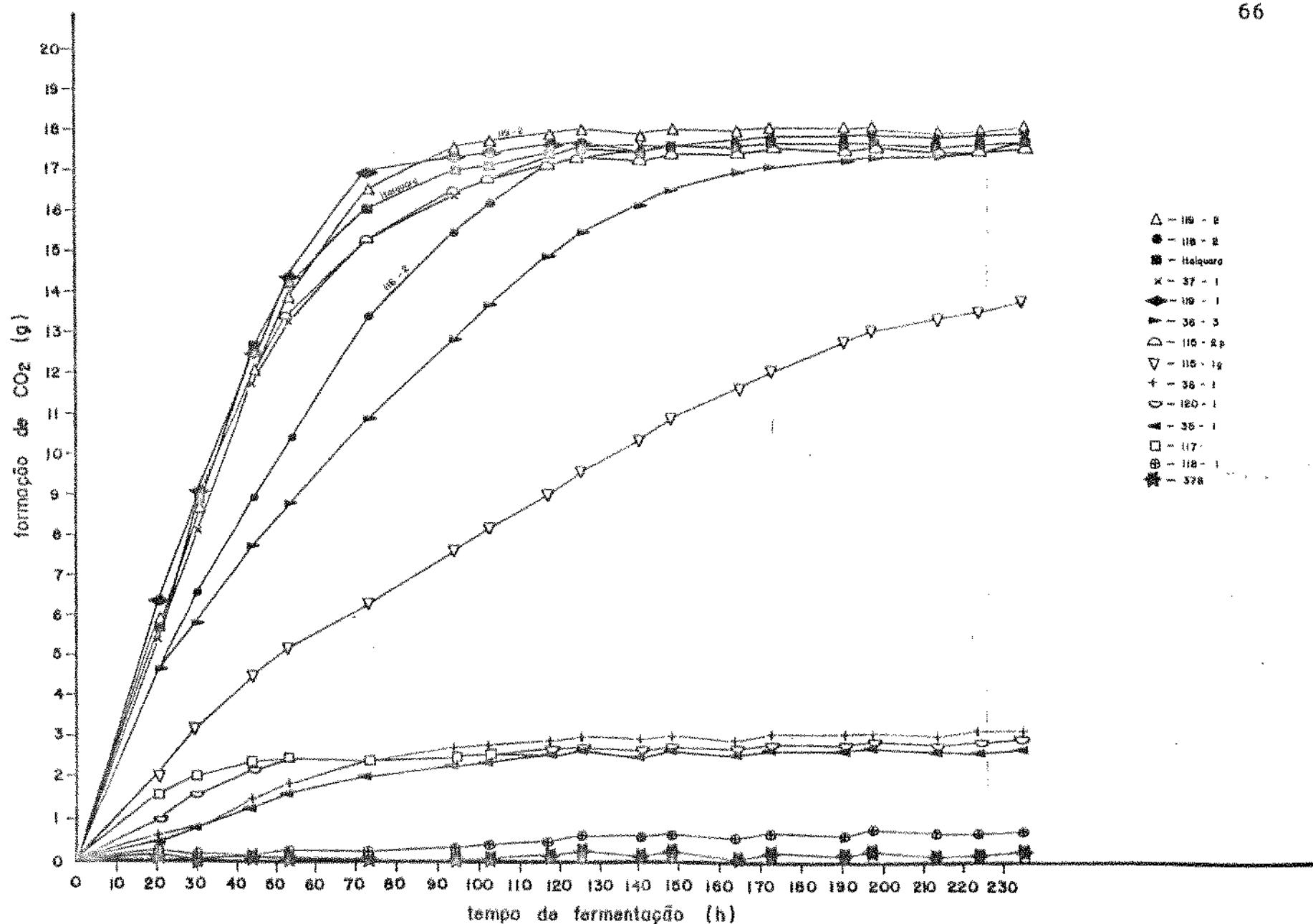


FIGURA 17 FORMAÇÃO DE CO<sub>2</sub> POR CEPAS DE LEVEDURAS 119-2, 118-2, 37-1, 119-1, 36-3, 116-2p, 116-1g, 36-1, 120-1, 117, 116-1 E 378 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 30°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

A Figura 8 ilustra que as cepas 11-50, 6-39, 8-43, 11-55, 8-44, 19-81, 11-51, 12-57 e 14-66 apresentaram maior produção de  $\text{CO}_2$  em relação as cepas comerciais Fleishmann e Itaiquara.

A figura 9 ilustra que as cepas 12-59, 11-53, 13-61 apresentaram maior produção de  $\text{CO}_2$ . A Figura 10 ilustra que as cepas 12-59, 11-53, 13-61 assim como a Figura 11 ilustra que as cepas 15-70, 19-82, 16-74 e 19-83 apresentaram maior produção de  $\text{CO}_2$  em relação as cepas comerciais Fleishmann e Itaiquara. Obteve-se com esses dados de formação de  $\text{CO}_2$  segundo pode constatar-se com os dados do Quadro 7, que as cepas 11-52, 10-46, 10-48, 10-49 (Figura 10) e 15-70, 16-74 (Figura 11) foram as maiores produtoras de  $\text{CO}_2$  (superior à 20g).

As Figuras 12, 13, 14, 16 e 17, apresentam algumas cepas que produzem  $\text{CO}_2$  em quantidade um pouco superior a dos fermentos comerciais como as cepas 21-86, 11-54 (Figura 12), cepa 21-87 (Figura 13), cepa 24-2 (Figura 14), cepa 34-1 (Figura 16) e cepas 119-2, 118-2 (Figura 17). A Figura 15 ilustra que as cepas 32-1, 33-1, 31-1, 34-2, 33-2, 32-3, 31-3 e 32-2 submetidas a fermentação foram muito inferiores ao fermento comercial Fleischmann.

Posteriormente, foram testadas também as cepas 15-70, 2-13, 9-75 e 15-72 em temperaturas de fermentação de 40 a 43°C.

A cepa 15-70 foi selecionada por ser sensível ao fator "Killer" K<sub>s</sub> e apresentar alto índice de formação de etanol e desenvolvimento a 37°C. As cepas 9-75 e 15-72 foram

selecionadas pelo efeito "Killer" e desenvolvimento demonstrado à 47°C.

Os resultados estão ilustrados no Quadro 8 e nas Figuras 18 e 19. Nota-se que a fermentação se completa após 160 horas de fermentação à 40°C e 43°C onde a produção de CO<sub>2</sub> se mantém praticamente constante. Na fermentação alcoólica à 43°C as cepas de leveduras 9-75, 15-72 apresentaram maior produção de CO<sub>2</sub> do que o fermento comercial Fleischmann. A cepa 9-75 apresentou maior produção de CO<sub>2</sub> na fermentação a 40°C e 43°C em relação as outras cepas.

#### QUADRO 8

PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub> DURANTE A FERMENTAÇÃO A 40°C E A 43°C, POR CEPAS SELECCIONADAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS

No Cepa	formação de CO <sub>2</sub> a 40°C (g)	formação de CO <sub>2</sub> a 43°C (g)
1-5	7,87	4,4
2-13	5,49	2,69
15-70	5,53	4,40
15-72	8,53	6,72
9-75	8,69	7,15
Fleischmann	5,86	4,20

O fato da produção de etanol ocorrer em temperaturas elevadas, da ordem de 40-43°C deve-se provavelmente ao fato da atividade do álcool desidrogenase ser favorecida a 40°C (JONES et al, 1981). De acordo com D'AMORE e STEWART, 1987 ocorre um aumento do teor de ácidos graxos insaturados com o aumento da temperatura, proporcionando uma ótima fluidização na membrana para as atividades celulares, isto também poderia ser um dos

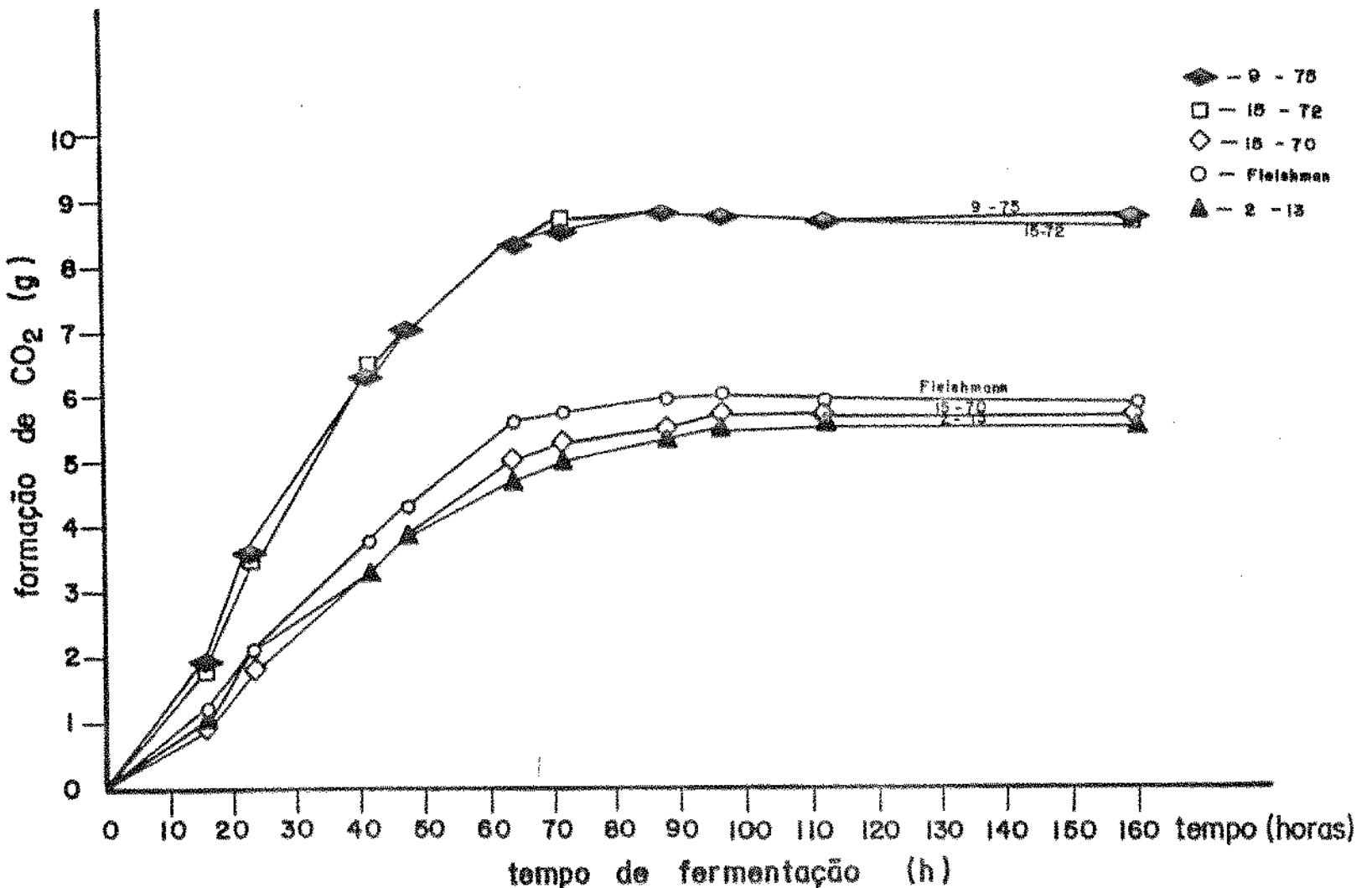


FIGURA 18 - FORMAÇÃO DE CO<sub>2</sub> POR CEPAS DE LEVEDURAS 9-75, 15-72, 15-70 E 2-13 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 40°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS

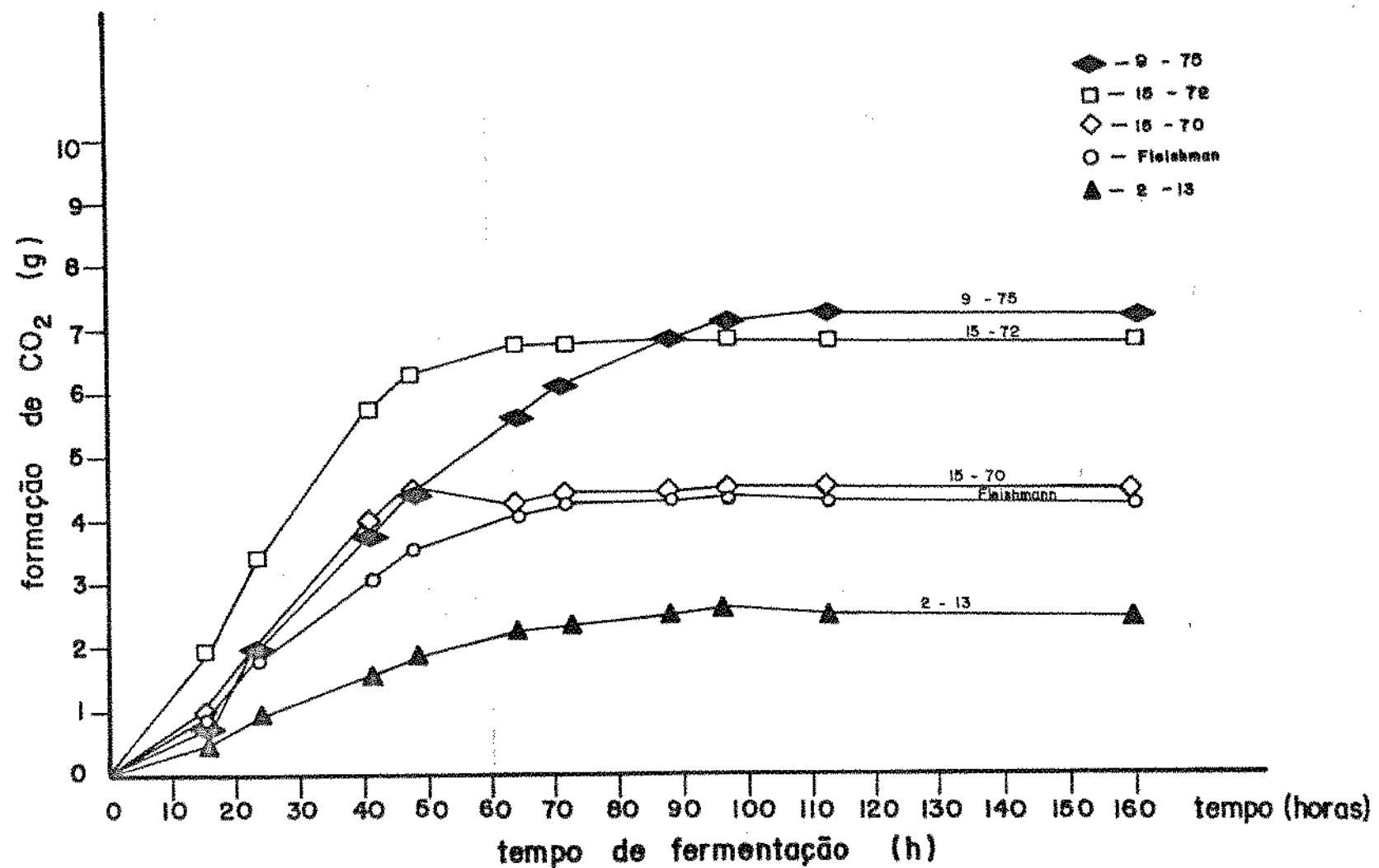


FIGURA 19 - FORMAÇÃO DE  $\text{CO}_2$  POR CEPAS DE LEVEDURAS 9-75, 15-72, 15-70 E 2-13 ATUANDO SOBRE MELAÇO DE CANA À 43°C COMPARADAS COM AS CEPAS COMERCIAIS.

fatores da produção de etanol à temperaturas elevadas pelas leveduras estudadas.

Assim, trabalhos anteriormente realizados indicam que os gêneros de leveduras que se desenvolvem a elevadas temperaturas como *Kluyveromyces* e *Candida* são importantes para obtenção de cepas de leveduras com esta característica e alta produção de álcool (D'AMORE et al 1989).

Além disso, os resultados obtidos são concordantes com os de NAGODOWITHANA et al (1974), que indicam que a elevação da temperatura provoca um grande efeito de inibição na capacidade fermentativa das leveduras sobre ação dos açúcares, segundo corrobora-se nos resultados da cepa 15-70, Fleischmann e Itaiquara.

#### 4.3. IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

A partir de 511 cepas de leveduras isoladas foram selecionadas 30 cepas, segundo os critérios mencionados anteriormente e indicadas nos Quadros 9 e 10, para a identificação e classificação a nível de gênero por meio da observação da morfologia e de provas bioquímicas segundo recomendado nas chaves de classificação de Kreger-Van Rij (1984).

#### 4.3.1. Características Morfológicas

As características de morfologia, tipo de reprodução, formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro, formação de película, floculação, presença e número de ascospores estão ilustrados no Quadro 9.

As cepas 9-75, 15-72, 22-90, 183, 185, 6-38, 10-46, 10-48, 10-49, 11-52, 15-70, 16-74, 24-1, 24-3, 29-1, 29-3, 30-1, 30-2, 31-1, 32-1, 35-2, 36-2, 115-1, 115-2P, 118-1, 118-2, 120-1, 377 e 378 apresentaram brotamento multipolar com exceção da cepa 33-1 que apresentou brotamento monopolar.

As cepas 10-46, 10-48 e 118-1 não apresentaram pseudomicélio. As cepas 36-2, 115-2P e 377 apresentaram cadeias ramificadas de pseudohifas e as cepas 33-1 e 120-1 foram as que apresentaram micélio verdadeiro.

Com respeito à formação de película as cepas que apresentaram foram várias como 15-72, 22-90 (rapidamente), 183, 185, 6-38, 10-46, 10-48, 10-49, 11-52, 15-70, 16-74, 24-1, 24-3, 31-1, 32-1, 35-2, 36-2, 115-2P, 118-1, 118-2 e 378.

As cepas 9-75, 15-72, 22-90, 183, 185, 11-52 apresentaram floculação.

QUADRO 9. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS LEVEDURAS SELECIONADAS, OBSERVADAS EM MEIO SÓLIDO E EM MEIO LÍQUIDO

Linhagens de levedura	razão da seleção da levedura	Características das colônias					Flocação	Presença e número de ascosporos
		Morfologia em meio líquido	Morfologia das colônias em meio sólido	tipo de reprodução vegetativa	formação de pseudomicélio verda-deiro	formação de película		
9-75	produtora do efeito Killer $K_1$ , desenvolvimento até 47°C e poder de fermentação alcoólica superior às leveduras comerciais a 40 e 43°C	ovóides	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa lisa BORDA: regular, inteira TEXTURA: macio ao início e depois reticulado BRILHO: +/-	brotamento multipolar	pseudomicélio abundante. Pseudohifas ramificadas que produzem cadeias de blastosporos.	-	+	-
15-72	produtora do efeito Killer $K_1$ , desenvolvimento até 47°C e poder de fermentação alcoólica superior às leveduras comerciais à 40 e 43°C	esferoidais	COR: creme SUPERFÍCIE: lisa quase plana e após 1 mês apresenta pouca elevação. BORDA: regular, inteira TEXTURA: firme e compacta BRILHO: +	multipolar	pseudomicélio de cadeias ramificadas de células com blastosporos formados em verticilos.	+/- com sedimento	+/-	-
22-90	produtora do efeito Killer contra $K_2$ , $K_3$ , $K_4$ e $K_{11}$	ovais a cilíndricas	COR: branca e após 2 dias rosa SUPERFÍCIE: convexa granulosa BORDA: ondulada TEXTURA: pastosa e após 1 semana granulosa BRILHO: -	multipolar	pseudomicélio abundante de cadeias ramificadas tipo (d) de Kreger-Van Rij.	+ com sedimento	+	2, 3 e 4 ascosporos
183	produtora do efeito Killer contra $K_2$ , $K_4$ , $K_9$ e $K_{11}$ é desenvolvimento até 37°C	globosas redondas	COR: rosa tenua e após 1 mês marrom clara SUPERFÍCIE: lisa, brilhante BORDA: inteira TEXTURA: granulosa e compacta BRILHO: -	multipolar	pseudomicélio de cadeias curtas com sedimento	+ com sedimento	+	2, 3 e 4 ascosporos

continua...

continuação do Quadro 9

105	produtora do efeito Killer contra $K_2$ , $K_4$ , $K_9$ e $K_{11}$ é desenvolvimento até 40°C	subglobosas	COR: rosa tênue e após 1 mês marrom clara SUPERFÍCIE: compacta e estriada BORDA: uniforme e inteira TEXTURA: granulosa BRILHO: -	multipolar pseudomicélio com cachos espessos com sedimento	+	+	+	2, 3 e 4 ascosporos
6-38	cor vermelha com o TTC, desenvolvimento até 37°C, e poder de fermentação alcoólica elevada a 30°C	globosas	COR: creme SUPERFÍCIE: convexas BORDA: estriações com certos rizoides TEXTURA: macio BRILHO: -	multipolar pseudomicélio muito rudimentar com sedimento e anel brilhante	+	-	+	1 - 4 ascosporos
10-46	cor vermelha com o TTC, desenvolvimento até 37°C, e poder de fermentação alcoólica elevada a 30°C	globosas	COR: creme claro SUPERFÍCIE: quase lisa, convexa em YM e liso com YPDA BORDA: inteira e regular TEXTURA: lisa, lustrosa com YM e mais brilhante com YPDA BRILHO: - com YM e +/- com YPDA	multipolar	-	+/-	-	1 - 4 ascosporos
10-48	cor vermelha com o TTC, sensível ao efeito Killer tipo $K_1$ , desenvolvimento até 37°C, e poder de fermentação de etanol elevada a 30°C	globosas e medianas	COR: branco e após 1 mês creme SUPERFÍCIE: elevação moderada no centro BORDA: ligeras estriações como rizóide com YM e inteira com YPDA TEXTURA: pastosa e após 1 mês granulosa BRILHO: - com YM e +/- com YPDA	multipolar	-	+/-	-	1 - 4 ascosporos
10-49	cor vermelha com o TTC, sensível ao efeito Killer tipo $K_1$ , desenvolvimento até 40°C e poder de fermentação alcoólica elevada a 30°C.	elipsoidais	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa com YM e elevação mais pronunciada com YPDA BORDA: ondulada com YM e inteira e lustrosa com YPDA TEXTURA: granulosa com YM e compacta com YPDA BRILHO: - com YM e +/- com YPDA	multipolar pseudomicélio bem ramificado tipo d (KREGER-VAN RIJ, 1984)	+	-	-	1 - 4 ascosporos
11-52	cor vermelha com o TTC, sensível ao efeito Killer tipo $K_1$ , desenvolvimento até 37°C e poder de fermentação alcoólica elevada a 30°C	globosas	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa com rugas e dobras com YM e ligera elevação com YPDA BORDA: ligeras estriações com YM e borda inteira e lisa TEXTURA: granuloso com YM, convexa e lisa com YPDA BRILHO: -	multipolar pseudomicélio bem ramificado tipo d (KREGER-VAN RIJ, 1984)	+/-	com sedimento e anel compacto	+	1-4 ascosporos
15-70	cor vermelha com o TTC, sensível ao efeito Killer tipo $K_1$ , e poder de fermentação alcoólica elevada a 30°C	cilíndricas	COR: creme com YM e branco com YPDA SUPERFÍCIE: convexa com YM e liso com pouca elevação e uniforme com YPDA BORDA: estriada com YM e inteira com YPDA TEXTURA: parcialmente estriado com YM e compacto com YPDA BRILHO: -/+	multipolar pseudomicélio bem ramificado, tipo d (KREGER-VAN RIJ, 1984)	+/-	com sedimento e anel compacto	-	1-4 ascosporos

continua...

continuação do Quadro 9

16-74	cor vermelha com o TTC, sensível ao efeito Killer tipo K <sub>1</sub> e poder de fermentação alcoólica elevada a 30°C	globosas	COR: creme com YM e branco com YPDA SUPERFÍCIE: certa elevação no centro com estriações com YM e convexa com YPDA BORDA: ondulada com ligeiras ramificações que cubrem a colônia toda com YM e anel tênue com YPDA TEXTURA: hirsuto pelas estriações que cobrem totalmente a colônia com YM e irregular com YPDA	multipolar bem ramificado, tipo d (KREGER-VAN RIJ, 1984)	pseudomicélio +/-	-	+ i-4 ascosporos
24-1	sensível ao efeito Killer tipo K <sub>1</sub> , desenvolvimento até 43°C	ovaladas	COR: creme com YM e branco com YPDA SUPERFÍCIE: com pouca elevação no centro e quase lisa BORDA: inteira, uniforme TEXTURA: compacta BRILHO: - com YM e +/- com YPDA	multipolar cadeias rami- ficadas de cé- lulas ovais que que suportam mui- tos blastosporos	-	-	-
24-3	cor rosa com o TTC, desenvolvimento até 43°C	ovaladas em cadeias pequenas e em pares	COR: creme com YM e branco com YPDA SUPERFÍCIE: com elevação pronunciada no centro BORDA: enrugada com borda micelial que se compactam TEXTURA: enrugada, áspera BRILHO: -	multipolar com formação de pseudohifas	pseudomicélio - com sedimento e um anel não muito nítido	-	-
29-1	desenvolvimento até 43°C	ovaladas em cadeias pequenas	COR: creme SUPERFÍCIE: elevação pronunciada no centro e enrugada BORDA: micelial que se compacta apresentando pronuncia- mento TEXTURA: enrugada, áspera BRILHO: -	multipolar de pseudohifas	pseudomicélio - que forma uma cadeia de blas- tosporos tipo b (KREGER-VAN RIJ 1984)	-	-
29-3	desenvolvimento até 43°C	ovaladas alongadas em cadeias curtas e medianas	COR: branca SUPERFÍCIE: convexa, elevação moderada BORDA: inteira TEXTURA: macia, flexível, regular e lisa BRILHO: +	multipolar que produz muitas blastosporos que dão uma aparência abun- dante das ramificações	pseudomicélio com cadeias ramificadas de células alongadas	-/+	-
30-1	desenvolvimento até 43°C	alongadas em cadeias curtas e grandes	COR: branca e creme após 1 mês SUPERFÍCIE: elevação no centro, como algodão e enrugado ao redor BORDA: micelial que se compacta, espalha-se após 1 mês e reduz seu tamanho TEXTURA: enrugada e áspera BRILHO: -	multipolar cadas de células e blastosporos ocorren- do a intervalos irre- gulares	pseudomicélio com cadeias muito ramifi- cadas de células e blastosporos ocorren- do a intervalos irre- gulares	-	-

continua...

continuação do Quadro 9

30-2	cor rosa com o TTC, desenvolvimento até 43°C	ovais e algumas ovóides menores	COR: crema SUPERFÍCIE: convexa, filamentosa, cotonosa BORDA: apresenta halo com borda micelial não muito perceptível em YM e mais pronunciada com YPDA TEXTURA: pastosa, pouco enrugada BRILHO: -	multipolar	pseudomicélio de cadeias ramificadas de células e blastosporos ocorrendo a intervalos irregulares.	-	-
31-1	cor rosa com o TTC, desenvolvimento até 43°C	ovais em cadeias curtas e grandes	COR: branca amarelada SUPERFÍCIE: convexa, filamentosa, cotonosa BORDA: apresenta cílios bem marcantes e pronunciados com YM e margem ciliada não muito perceptível com YPDA TEXTURA: aspecto de algodão no centro e enrugada ao redor BRILHO: -	multipolar	pseudomicélio de cadeias ramificadas de células com blastosporos formada em verticilos	+/- com sedimento	-
32-1	desenvolvimento até 43°C	ovais a cilíndricas	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa, filamentosa, cotonosa BORDA: micelar e compacta TEXTURA: rugosa BRILHO: -	multipolar	pseudomicélio abundante de cadeias ramificadas com células alongadas	+/- com sedimento	-
33-1	desenvolvimento até 43°C	ovais a cilíndricas	COR: creme SUPERFÍCIE: convexas, filamentosa, cotonosa BORDA: micelial TEXTURA: no centro cotonosa e compacta e ao redor rugosa e áspera BRILHO: -	monopolar	micélio verdadeiro abundante	- com sedimento	+ após 1 mes
35-2	sensível ao efeito Killer tipo K <sub>1</sub> e desenvolvimento até 43°C	esferoidais	COR: branca SUPERFÍCIE: convexa BORDA: inteira e regular TEXTURA: macia, lisa e compacta BRILHO: +/- com YM e + com YPDA	multipolar	pseudomicélio de cadeias ramificadas de células com blastosporos formada em verticilos	+ com sedimento	-
36-2	sensível ao efeito Killer tipo K <sub>1</sub> e desenvolvimento até 43°C	ovais	COR: branca com YPDA e creme com YM SUPERFÍCIE: convexa e com elevação moderada BORDA: inteira e regular TEXTURA: macia, lisa e flexível BRILHO: +	multipolar	cadeias ramificadas de pseudohifas que produz cadeias e grupos de blastosporos	+/- com sedimento	-
115-1g	cor rosa com o TTC e desenvolvimento até 46°C	ovais	COR: creme SUPERFÍCIE: elevação moderada quase lisa BORDA: inteira e regular TEXTURA: macia e uniforme BRILHO: + com YM e +/- com YPDA	multipolar	pseudomicélio consiste de pseudohifas espessas e alongadas arranjadas em formações ramificadas irregulares.	- com sedimento	-

continuação do Quadro 9

115-2p	cor vermelha com o TTC, desenvolvimento até 46°C e boa fermentação alcoólica a 30°C	globosas	COR: branca SUPERFÍCIE: elevação pronunciada no centro (YM) e quase lisa com YPDA BORDA: inteira e regular TEXTURA: lisa, lustrosa e compacta BRILHO: +/−	multipolar	apresenta pseudohifas em forma rudimentar	+/- com sedimento e e formação de anel	-	+	1-4	ascosporas
118-1	desenvolvimento até 46°C	esferoidais, algumas cilíndricas	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa com elevação moderada BORDA: inteira e levemente lobulada TEXTURA: macia, semi-lisa BRILHO: -	multipolar	-, sómente apresenta cadeia de células curtas	+/- com sedimento	-	-	-	
118-2	cor vermelha com o TTC, desenvolvimento até 40°C e poder de fermentação de etanol elevada a 30°C	ovais e algumas sub-globosas	COR: branca SUPERFÍCIE: elevação no centro BORDA: lobulada e uniforme TEXTURA: lisa e compacta BRILHO:	multipolar	pseudomicélio com pseudohifas de cadeias curtas de células	+/- com sedimento	-	+	1-3	ascosporas
120-1	sensível ao efeito Killer tipo K <sub>1</sub> e desenvolvimento até 40°C	ovais cilíndricas	COR: creme SUPERFÍCIE: elevação no centro BORDA: borde micelial não perceptível com YM e perceptível com YPDA TEXTURA: enrugada, áspera e no centro com aspecto de algodão BRILHO: -	multipolar	-, micélio verdadeiro com sedimento	-	-	-	-	
377	desenvolvimento até 40°C	ovais	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa e apresenta um anel ao redor da colônia BORDA: apresenta um anel e é uniforme TEXTURA: macia e compacta BRILHO: +/−	multipolar	cadeias ramificadas de pseudohifas alongadas que produzem pares de blastospores	-	-	-	-	
378	desenvolvimento até 40°C	ovais e	COR: creme SUPERFÍCIE: convexa e pouca elevação BORDA: inteira e apresenta um anel uniforme TEXTURA: compacta BRILHO: +/−	multipolar	pseudomicélio de células cilíndricas com cachos de blastosporos em verticilos com sedimento	+ com sedimento	-	-	-	

- não apresenta; -/+ fraca; + apresenta

As cepas 22-90, 183, 185, 6-38, 10-46, 10-48, 10-49, 11-52, 15-70, 16-74, 115-2p e 118-2 apresentaram ascosporos que variam de 1 a 4. Sendo que as cepas 6-38, 10-46, 10-48, 10-49, 11-52, 15-70, 16-74 e 115-2p que possuem o maior poder de fermentação alcoólica apresentaram ascosporos de 1 a 4 contidos num asco não conjugado. Foi observado, em alguns casos, que ascosporos apresentaram forma globosa e elipsoidal curtas, característica provável no gênero Saccharomyces. As cepas 183 e 185 apresentaram asco com tubo de conjugação abortivo e a cepa 118-2 apresentou asco conjugado.

Em alguns casos a forma da célula pode ser característica de um gênero particular ou espécie (LODDER, 1970), o que não aconteceu nesta pesquisa.

Os resultados mostrados no Quadro 9 indicam que as cepas 15-70, 6-38, 10-46, 10-48 e 115-2p apresentaram um anel compacto e nítido.

As características de cor das colônias de leveduras em meio sólido apresentaram cor branca ou creme na sua maioria e somente as cepas 183, 185 apresentaram cor rosa ténue e após 2 dias se alterou para marron clara, a cepa 22-90 apresentou cor branca e após 2 dias marrom clara indicando presença de pigmentos nestas leveduras.

Na Figura 20 vimos que a cepa 9-75 apresenta a morfologia quase similar a cepa 15-72, variando as características da textura que no caso da 9-75 apresenta-se reticulado após um tempo. Na Figura 21 vimos que a cepa 10-46 e

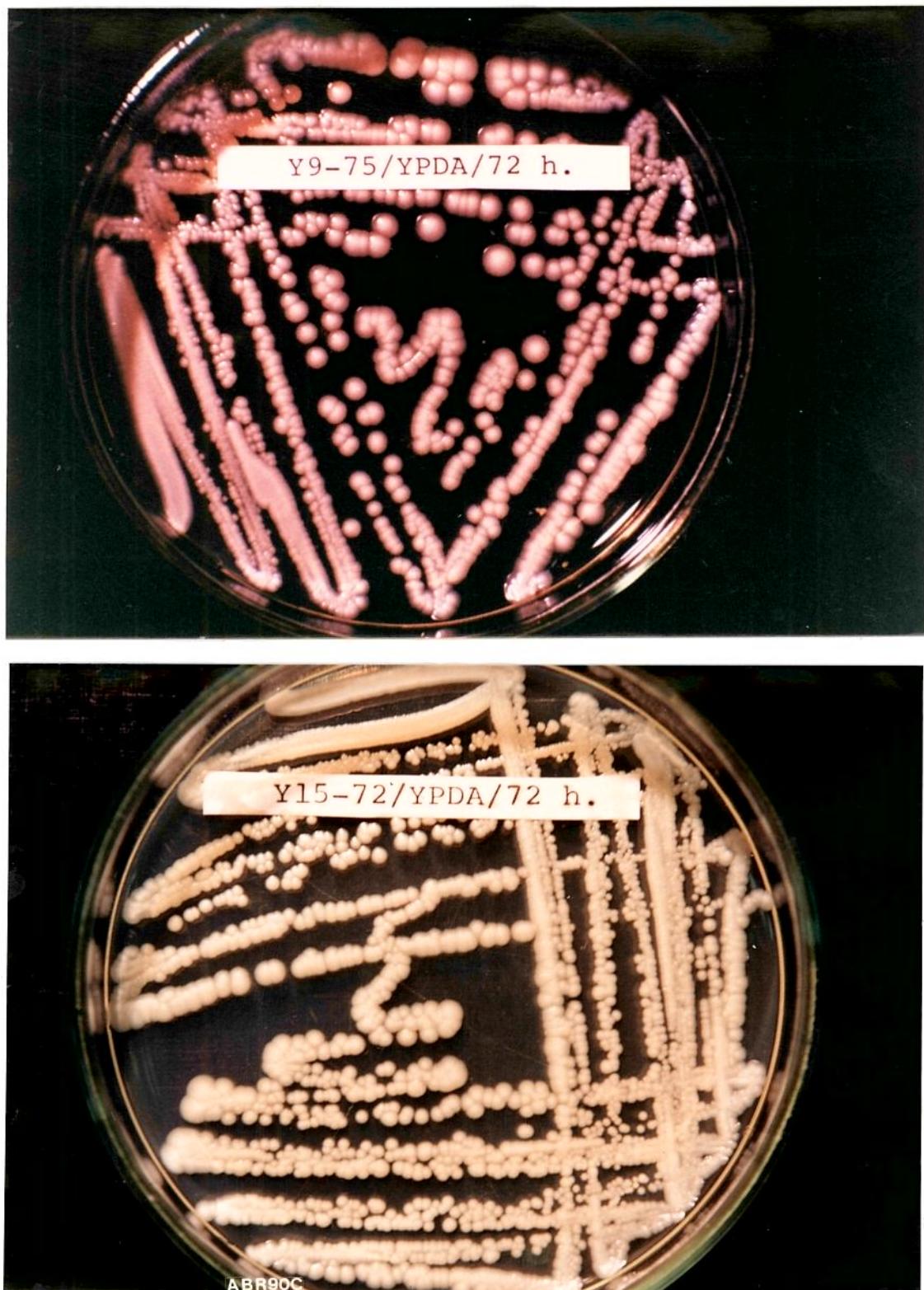


FIGURA 20. CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO (YPDA) DAS  
CEPAS DE LEVEDURAS 9-75 e 15-72 ISOLADAS  
DAS BEBIDAS ALCOÓLICAS ANDINAS.



FIGURA 21. CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO (YPDA) DAS CEPAS DE  
LEVEDURAS 10-46 E 115-2P ISOLADAS DAS BEBIDAS  
ALCOÓLICAS ANDINAS

115-2p apresentaram características morfológicas de suas colônias similares como indicados no Quadro 9. A morfologia de colônias em meio sólido, com formas de crescimento rugosas, verrugosas e estriadas, que apresentam certas cepas, estão geralmente associadas a abundante produção de pseudomicélio ou micélio verdadeiro (LODDER, 1970).

#### 4.3.2. Características Fisiológicas e Bioquímicas

Através do estudo das propriedades fisiológicas pode-se descrever, diferenciar e identificar as linhagens de levedura.

##### 4.3.2.1. Utilização de Compostos de Carbono

As leveduras podem fermentar e assimilar determinadas fontes de carbono.

###### 4.3.2.1.1. Fermentação de Açúcares

Segundo o Quadro 10, as cepas 6-38, 10-46, 10-48, 10-49, 11-52, 15-70 e 16-74 são caracterizadas pela fermentação vigorosa de açúcares como glicose, galactose, sacarose e maltose. LODDER (1970) indica como exemplo o gênero Saccharomyces com característica de apresentar fermentação vigorosa. Leveduras do gênero Lipomyces e Rhodotorula são estritamente não fermentativos, enquanto que gênero como Hansenula apresentam espécies que são não fermentativos e espécies fortemente fermentativos.

No caso em que ocorre a fermentação, a glicose sempre será fermentada, como sucedeu com as 30 cepas experimentadas, isso porque a hexoquinase (EC 2.7.1.1) da levedura é mediada pela fosforilação da glicose. As cepas 31-1, 118-1 e 378

QUADRO 10. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DAS DIFERENTES LINHAGENS DE LEVEDURAS SELECIONADAS

No de classificação das leveduras	Crescimento a 25°C 30°C 35°C 37°C 42°C						Fermentação de Açúcares glic gal sac mal lac mel raf						Assimilação de diversos Compostos como única Fonte de Carbono						Assimilação do Nitrato		Crescimento em meio sem vitamina		Crescimento 10% C1Na + 5% glicose		Crescimento em presença de Cicloheximida com DBB		Reação de coloração	
	gal	sac	mal	lac	mel	raf	gal	sac	mal	cel	tre	lac	raf	ami.	D-xi	L-ar	L-ram	D-man	ac.suc	ac.ci	inos	sol	em meio	vitamina	em meio sem vitamina	10% C1Na + 5% glicose	em presença de Cicloheximida com DBB	coloração
9-75	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-/+	-	-	-	-	+	+
15-72	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+/-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
22-90	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
183	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+/-	-/+	-/+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
185	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-/+	-/+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6-38	+	+	+	+	-	+	-/+	+	-/+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-/+	+	-
10-46	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-/+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
10-48	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-/+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10-49	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
11-52	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	+	+	-/+
15-70	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-/+	-/+
16-74	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-/+
24-1	+	+	+	+	+	+	-/+	-/+	-	-	-/+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
24-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-/+	-	-	+	+	+	-	+	-/+	-/+	-	-	+	+	+/-	-	+	-/+	-/+	-/+
29-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-/+	-	-	+	+	+	-	+	-/+	-/+	+	-	+	+	+	-	-	-	-/+	-/+
29-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-/+	-/+	
30-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-	-	+	+	+	-	-/+	+	+	-	-	+	-/+	+	-	-	-/+	-/+	
30-2	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-	-	-	-	-/+	
31-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-/+	
32-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-/+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	
33-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-/+	-	-	+	+	-/+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-/+	-/+
35-2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-/+
36-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-/+	+	-	-	-	+	-	-
115-1g	+	+	+	+	+	+	-/+	-/+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-/+	+	-	-	+	-	-	-
115-2p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-/+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118-1	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
118-2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-/+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-/+	-/+
120-1	+	+	+	+	-	+	-	+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
377	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
378	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

+: reação positiva; -: reação negativa; -/+ reação fraca  
 glic = glicose, gal = galactose, sac = sacarose, mal = maltose, lac = lactose, mel = melibiose, raf = rafinose, cel = cellobiose, tre = trealose, ami. sol. = amido solúvel, D-xi = D-xilose, L-ar = L- arabinose, L-ram = L-ramnose, D-man = D-manitol, ac. suc. = ácido succínico, ac. ci. = ácido cítrico, inos = inositol

fermentaram somente glicose, com exceção da cepa 22-90 que não fermentou nenhum dos açúcares testados.

A fermentação de galactose é mediada pela enzima galactoquinase e 50% das leveduras testadas fermentaram este carboidrato.

A fermentação de sacarose é mediada pela invertase  $\beta$ -D-fructofuranosidase ou por  $\alpha$ -D-glicosidase EC 3.2.1.26 e está associada a capacidade de fermentar rafinose. Segundo os resultados indicados no Quadro 10 as cepas 9-75, 183, 10-46, 10-48, 16-74, 24-i, 115-2p, 118-2 e 377 de leveduras confirmam esta associação.

A fermentação da maltose é mediada por sistemas  $\alpha$ -glicosidase, e é sempre associada com a fermentação de sacarose. A maioria das cepas testadas seguiram esta associação.

A fermentação de lactose é mediada pela  $\beta$ -galactosidase ou lactase (EC 3.2.1.2.3). Mas as linhagens 9-75 e 15-72 foram as únicas que fermentaram este carboidrato. A rafinose pode ser hidrolizada pela invertase e  $\beta$ -galactosidase na proporção de 1/3 e 2/3, respectivamente, ou pode fermentar a molécula inteira.

#### 4.3.2.1.2. Assimilação de Compostos de Carbono

As características de assimilação de compostos de carbono das leveduras estão ilustrados no Quadro 10.

As provas de assimilação de carbono, são mais sensíveis que as de fermentação, revelam a presença de sistemas

enzimáticos e permitem a adaptação da levedura a certos compostos.

Esta prova de assimilação foi realizada em temperatura de 28°C. Outro parâmetro importante foi o pH, principalmente na presença de ácido succínico a pH 5,8, pois este valor pode influenciar a assimilação de açúcares.

A maioria das cepas de leveduras em estudo apresentaram assimilação de D-galactose com exceção das cepas 118-1 e 378.

Em relação a assimilação de dissacarídeos a maioria das cepas de leveduras testadas apresentaram assimilação de sacarose e maltose com exceção das cepas 118-1 e 378.

Aproximadamente 70% das cepas de leveduras testadas apresentaram assimilação do trissacarídeo rafinose enquanto que 35% das cepas apresentaram assimilação do polissacarídeo amido.

Os resultados obtidos indicam a facilidade de assimilação de fonte de carbono simples como monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos e polissacarídeos, respectivamente.

\* A porcentagem de leveduras capazes de assimilar pentose como L-arabinose e L-ramnose foi menor do que cepas capazes de assimilar D-xilose.

#### 4.3.2.2. Assimilação de Compostos de Nitrogênio - Nitrato de Potássio

Os resultados estão indicados no Quadro 10, sendo as 30 cepas de leveduras em estudo negativa quanto a assimilação do nitrato.

Para propósitos de identificação e classificação, a capacidade de usar o nitrato como fonte de nitrogênio é avaliada pela determinação do crescimento.

A capacidade de assimilação de nitrato depende da ação sequencial de uma série de sistema redutases. A ausência ou baixa atividade de alguns dos sistemas participantes resultaria na incapacidade de utilizar nitrato.

#### 4.3.2.3. Crescimento em Solução de 10% de Cloreto de Sódio e 5% de Glicose

Segundo os dados mostrados no Quadro 10, poucas cepas não são osmotolerantes, como as cepas 183, 10-46, 10-48, 24-i, 29-i, 118-i, 377 e 378. Cepas recuperadas de substratos com alta concentração de açúcar como no caso das cepas isoladas são geralmente resistentes a alta pressão osmótica.

#### 4.3.2.4. Crescimento à 37°C e outras Temperaturas Máximas de Crescimento

Observa-se que as temperaturas na faixa de 20 a 30°C são ótimas para o crescimento de muitas espécies de leveduras. Para identificação e classificação foi de interesse determinar o crescimento das leveduras à 37°C. Constatou-se que poucas leveduras (linhagens 22-90 e 34-2) não cresceram nesta temperatura e as linhagens 9-75, 15-72, 2-13 cresceram à 47°C, pelo teste de termoresistência. Em geral, a capacidade de crescimento a 37°C é empregado como um teste confirmativo.

#### 4.3.2.5. Crescimento em Meio Livre de Vitaminas

Os resultados obtidos nestes testes estão indicados na Tabela 10. Nota-se que a maioria das linhagens crescem em meio livre de vitaminas, enquanto um pequeno número de células não cresceram como 9-75, 10-48 16-74, 34-2, 115-19, 115-2p e 118-i.

Vitaminas essenciais ao metabolismo de leveduras indicam exigências delas ou apenas de uma delas, e constituem um critério de diagnóstico útil na identificação e classificação de leveduras. A capacidade de crescimento num meio livre de vitaminas é aceito como critério taxonômico e variável. A detecção da necessidade de vitaminas está baseado na proliferação celular sob condições aeróbicas em meio sintético completo, porém sem fatores de crescimento.

#### 4.3.2.6. Resistência a Cicloheximida (Actidiona)

A resistência das cepas de leveduras à cicloheximida estão indicados no Quadro 10. Verificou-se que 17% das leveduras testadas são resistentes, 30% moderadamente sensíveis e 53% são sensíveis a cicloheximida.

Porém, este teste tem aplicação limitada porque há possibilidade das linhagens se adaptarem em concentrações baixas de cicloheximida. Os resultados obtidos estão indicados no Quadro 10.

#### 4.3.2.7. Coloração com Diazonium Blue (DBB)

Observa-se no Quadro 10 que as cepas de leveduras em estudo não apresentaram reação com reagente de DBB, confirmando que não pertencem à grupo de Basidiomicetos.

#### 4.3.3. Identificação e Classificação das Cepas de Leveduras Selecionadas

Através das características testadas como as morfológicas, características fisiológicas e bioquímicas foram identificadas 30 cepas de leveduras a nível de gênero. O resultado pode ser observado na Quadro 11.

Das 30 cepas identificadas obteve-se 16 cepas (60%) do gênero Candida, 8 cepas (26,66%) do gênero Saccharomyces, 2 cepas (6,66%) do gênero Torulaspora, 1 cepa (3,33%) do gênero Zygosaccharomyces e 1 cepa (3,33%) do gênero Pichia. Observou-se que a maioria das cepas pertencem ao gênero Candida.

A Candida normalmente é um gênero constituído por espécies contaminantes não desejáveis na fermentação e são provenientes da contaminação durante o processo de elaboração, principalmente nos tratamentos posteriores ao cozimento da chicha. As cepas (9-75 e 15-72) identificadas como Candida sp foram isoladas de "chicha".

A chicha é submetida ao cozimento por tempo mais ou menos prolongado (1 a 24 e 48 horas) e contínuo segundo VINAS (1951); este tratamento térmico é de importância fundamental porque permite a ação das amilases. Desta forma, a chicha deveria manter-se livre de agentes contaminantes. Os problemas de contaminação podem ser decorrentes de procedimentos inadequados e anti-higiênicos utilizados na sua preparação. Por exemplo, o enchimento da chicha nos "porongos" para a fermentação, e o uso de "fermentos iniciadores", que com frequência são resíduos de fermentações anteriores cujo

## QUADRO 11

## IDENTIFICAÇÃO DAS DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURA SELECIONADAS

No de cepa de levedura selecionada	Gênero
9-75	<u>Candida</u> sp
15-72	<u>Candida</u> sp
22-90	<u>Pichia</u> sp
183	<u>Torulaspora</u> sp
185	<u>Torulaspora</u> sp
6-38	<u>Saccharomyces</u> sp
10-46	<u>Saccharomyces</u> sp
10-48	<u>Saccharomyces</u> sp
10-49	<u>Saccharomyces</u> sp
11-52	<u>Saccharomyces</u> sp
15-70	<u>Saccharomyces</u> sp
16-74	<u>Saccharomyces</u> sp
24-1	<u>Candida</u> sp
24-3	<u>Candida</u> sp
29-1	<u>Candida</u> sp
29-3	<u>Candida</u> sp
30-1	<u>Candida</u> sp
30-2	<u>Candida</u> sp
31-1	<u>Candida</u> sp
32-1	<u>Candida</u> sp
33-1	<u>Candida</u> sp
35-2	<u>Candida</u> sp
36-2	<u>Candida</u> sp
115-1g	<u>Candida</u> sp
115-2p	<u>Saccharomyces</u> sp
118-1	<u>Candida</u> sp
118-2	<u>Zygosaccharomyces</u> sp
120-1	<u>Candida</u> sp
377	<u>Candida</u> sp
378	<u>Candida</u> sp

conteúdo é uma mistura de leveduras e bactérias. A possibilidade destes microrganismos sobreviverem é limitada devido as condições de pH ácido, anaerobiose, presença de CO<sub>2</sub> e álcool durante o processo. Por outro lado, estes fatores não são limitantes para o desenvolvimento de leveduras tolerantes

como Candida, Pichia que competem com as leveduras fermentativas.

As características bioquímicas como efeito Killer tipo K<sub>s</sub>, termoresistência até 47°C e grau de fermentação alcoólica a 40 e 43°C observadas em 2 cepas de Candida sp (9-75 e 15-72) são muito interessantes e desejáveis para cepas do gênero Saccharomyces, que podem ser transferidas mediante a introdução de genes com as características desejáveis através de fusão protoplasmática ou esferoplasmática ou de outros mecanismos utilizados pela genética hoje em dia.

### 5. CONCLUSÕES

5.1. As colônias de leveduras provenientes das bebidas alcoólicas andinas apresentaram a seguinte classificação percentual em relação a coloração com o TTC: 55,36% de colônias de cor rosa, 16,58% de cor vermelho e 28,06% de cor branca. A coloração vermelha das colônias com reagente de TTC indica a viabilidade destas leveduras relacionado com uma maior capacidade na fermentação de açúcares que aquelas colônias de cor rosa e branca, respectivamente.

5.2. Com relação ao desenvolvimento a temperaturas elevadas, das 511 cepas de leveduras isoladas das diferentes bebidas alcoólicas e outras fontes, foram obtidas 364 cepas (71,23%) mesófilas que se desenvolvem a 30°C e 147 cepas (28,77%) termófilas das quais 37 cepas (25,17%) se desenvolvem a 40°C, 106 cepas (72,10%) a 43°C e 4 cepas (2,73%) a 47°C. O interesse de obter cepas de leveduras que se desenvolvam a elevadas temperaturas está na utilização para processos de fermentação alcoólica que acontece a temperaturas superiores a 40°C e evitar a inibição do microrganismo, o prejuízo econômico e a qualidade inferior do produto final.

5.3. As cepas de leveduras 9-75 e 15-72 isoladas de bebidas alcoólicas andinas foram identificadas como pertencentes ao gênero Candida sp. Estas duas cepas apresentaram coloração rosa com o TTC, desenvolvimento a 47°C, fator "Killer" tipo K<sub>1</sub>, que refuta a atribuição desta característica apenas a gênero Saccharomyces e poder de fermentação alcoólica superior às cepas comerciais Fleischmann e Itaiquara, à 40 e 43°C, indicando ótimas características a ser aproveitada na fermentação alcoólica.

5.4. A cepa 22-90 isolada de bebidas alcoólicas andinas ("chicha de jora") foi identificada e classificada como Pichia sp e as cepas 183 e 185 provenientes de frutas (mamão) do Brasil identificadas como Torulaspora sp apresentaram efeito Killer contra K<sub>1</sub>. Não se determinou o tipo de fator "Killer" que apresentaram estas cepas devido que o espectro de atividade "Killer" de Pichia sp e Torulaspora sp ser ligeiramente mais amplo que o de Candida sp.

Uma vez que a maioria das usinas não esterilizam eficientemente o material a ser fermentado, a aplicação de leveduras "Killer" na fermentação alcoólica seria útil para inibição de microrganismos contaminantes. Através da manipulação genética é possível a introdução de gens do fator "Killer" na cepa industrial.

5.5. As cepas 6-38, 10-46, 10-48, 10-49, 11-52, 15-70, 16-74 e 115-2p isoladas das bebidas alcoólicas andinas ("chicha de jora") foram identificadas como *Saccharomyces* e apresentaram as seguintes características: coloração vermelha com o TTC, poder de fermentação alcoólica superior aos fermentos comerciais Fleishmann e Itaiquara à 30°C, e desenvolvimento à 37°C, sendo as cepas 10-49 e 115-2p que apresentaram desenvolvimento à 40°C e 46°C, respectivamente. Estas cepas de leveduras selvagens apresentam características importantes para o processo de fermentação alcoólica que podem ser melhoradas e aplicadas na fermentação industrial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIBA, S.; SHODA, M. & NAGATARI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotech. Bioeng. 10: 845-864, 1968.
2. AKIYAMA, H. & SUGANO, N. The use of the TTC-agar-overlay technique for the differentiation of sake yeasts. J. Ferment. Technol., 45: 1093-1100, 1967.
3. ANDERSON, P.J.; MC NEIL, K. & WATSON, K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by Kluyveromyces marxianus var. marxianus isolated from sugar mills. Applied and Environmental Microbiology, 51: 1314-1320, 1986.
4. ANTUNEZ DE MAYOLO, R. S. Reseña de la nutrición en el Perú precolombino. Parte II. Bebidas, 1988. Ed. U.N.M.S.M., Lima, Perú.
5. BAERWALD, G. Biochemical determination of living yeast cells. Brauwissenschaft, 25: 192-196, 1972.
6. BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeasts characteristics and identification. Ed. Cambridge University Press, London, 1987.
7. BEVAN, E.A.; HERRING, A. J.; MITCHELL, B. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "Killer" character. Nature: 145-1..., 1973.

8. BEVAN, E.A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the Killer character in yeast. Proceeding of the 11th. International Conference on Genetics 1: 203, 1963.
9. BORZANI,W. & VAIRO, R. M. Quantitative adsorption of methylene blue by dead yeast cells. J. Bacteriol., 76: 251-255, 1958.
10. BORZANI,W. & VAIRO,M. The influence of relative dye and cell concentration on the adsorption method for the measurement of the specific areas of microorganisms. J. Ferment. Tech., 48: 329-333, 1970.
11. BUSSEY,H. Phisiology of Killer factor in yeast. Ad. in Microbiol. Phisiol., 22: 93-121,1981.
12. BUSSEY,H.; SHERMAN, D.; SOMERS, J. M. Action of yeast Killer factor: a resistant mutant with sensitive spheroplasts. J. Bacteriol., 113: 1193-1197, 1973.
13. BUSSEY, H. & SKIPPER, N. Killing of Torulopsis glabrata by Saccharomyces cerevisiae Killer factor. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 9: 352-354, 1976.
14. CAMARA, C. L. Historia da alimentação no Brasil. Ed. Nacional, São Paulo, V. 1, 1967.
15. CLARE,J.J. & OLIVER, G. S. The regulation of RNA synthesis in yeast IV. Synthesis of double-stranded RNA. Molec. Gen. Genet., 171: 161-166, 1979.
16. COTTRELL, H.J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. Nature, 159: 748, 1947.

17. D'AMORE, T.; CELOTTO, G.; RUSSELL, I.; STEWART, G. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 411-416, 1989.
18. D'AMORE, T. & STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 322-330, 1987.
19. DE LA PENA, S.; BARROS, F.; GASCON, S.; RAMOS, S. & LAZO, P. Effect of yeast Killer toxin on sensitive cells of Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.*, 256: 10420-10425, 1981.
20. DUBOIS, M.; GILLES, A. K.; HAMILTON, P.; REBERS, A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 28: 350-356, 1956.
21. EDELENYI, M. Microbiological control of champagne production (Tank fermentation procedure) by means of 2,3,5 Trifenyttetrazolium chloride (TTC). *Nahrung*, 14: 395-401, 1970.
22. EPHRUSI, B.; L'HERITIER; HOTTINGUER, H. Action de l'acriflavine sur les levures. VI. Analyse quantitative de la transformation des populations. *Ann. Inst. Pasteur*, 77: 64-83, 1949.
23. FARKCES, S. Determination of the number of live cells in fermenting wort, by measurement of the reducing capacity. *Szerziper*, 33: 105-108, 1985.

24. FINK, G. & STYLES, A. Curing of a Killer factor in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Nat. Acad. Sci., 69: 2840-2846, 1972.
25. GUNZ, F. W. Reduction of tetrazolium salts by some biological agents. Nature, 163: 98, 1949.
26. GUNGE, N. & SAKAGUCHI, K. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid Killer plasmids, pGKI<sub>s</sub> and pGKI<sub>a</sub>, from Kluyveromyces lactis into Saccharomyces cerevisiae by cell fusion. J. Bacteriol., 147: 155-160, 1980.
27. HARA, S.; Iimura, Y. & OTSUKA, K. Breeding of useful Killer wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic., 31: 28-33, 1980.
28. HARA, S. Application of Killer yeasts in wine making-monograph. Hakkokogaku, 62: 325-339, 1984.
29. HARA, S.; IIMURA, Y.; OYAMA, H.; KOZEKI, T.; KITANO, K. & OTSUKA, K. The breeding of cryophilic Killer wine yeasts. Agric. Biol. Chem., 45: 1327-1334, 1981.
30. HARA, S. Seibutsuto Kagaku, 23: 151-161, 1985.
31. HERRERA, T. & ULLOA, M. Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. Rev. Latinoamericana de Microbiología, 12: 67-121, 1970.
32. INGRAM, L. O. & BUTTKE, T. M. Effects of alcohols on micro-organisms. Ad. Microb. Physiol., 25: 253-300, 1984.
33. JAMBOR, B. Reduction of tetrazolium salt. Nature, 173: 774-775, 1954.

34. JONES, R.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* 16: 42-49, 1981.
35. KOTANI, H.; SHINMYO, A. & ENATSU, T. Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on killing action. *J. Bacteriol.* 129: 640-650, 1977.
36. KREGER-VAN RIJ. The yeasts, a taxonomic study. 3rd. ed. Ed., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1984.
37. KUKN, R. & JERCHEL, D. Reduktion von tetrazoliumsalzen durch bakterien, garende hefe und keimende samen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 74B: 941-952, 1941.
38. LEDERBERG, J. Detection of fermentative variants with tetrazolium. *J. Bacteriol.*, 56: 695, 1948.
39. LEE, F. J. & HASSAN, M. H. Effect of oxygen tension on stability and expression of a Killer toxin chimeric plasmid in a chemostat culture of Saccharomyces cerevisiae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 72-74, 1987.
40. LEIBOWITZ, M. & WICKNER, R. B. pet 18: A chromosomal gene required for cell growth and for the maintenance of mitochondrial DNA and the Killer plasmid of yeast. *Molec. Genet.* 165: 115-121, 1978.
41. LIEVENSEN, J. C. & LIM, H. C. The growth and dynamics of Saccharomyces cerevisiae. In: TSAO, G. ed. *Annual Reports on Fermentation Processes*. 1982. vol. 6, cap. 6, p. 211-261.

42. LODDER, J.; SLOOFF, W. & KREGER-VAN RIJ, N. The classification of yeasts. In: A. H. Cook (Ed.) *The Chemistry and Biology of Yeasts* Academic Press, New York, 1-62, 1958.
43. LODDER, J. General classification of the yeasts. In: J. Lodder (Ed.). *The Yeasts, a taxonomic study*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam: 1-33, 1970.
44. LORENTZ, R. & HOFFMEISTER, H. Influence of the hydrogen ion concentration on the specificity of the TTC reaction. *Mikrochem.* 66: 1062-1067, 1967.
45. MATTSON, A. M.; JENSEN, C. O. & DUTCHER, R. A. Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues. *Science*, : 294-295, 1947.
46. MURAKAMI, H.; YOSHIDE, K.; NORI, F.; INAHASHI, M. & HATTORI, H. Grouping of the Kyobai yeasts by TTC. Staining used some carbohydrates as carbon source. Part. I. *J. Brew. Soc. Japan*, 77: 181-184, 1982.
47. MENEZES, T. J. *Etanol, combustivel do Brasil*. Ed. Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 1980, p. 229.
48. NAGAI, S. Induction of the respiration-deficient mutation in yeast by various synthetic dyes. *Science*, 130: 1188-1189, 1959.
49. NAGAI, S.; YANAGISHIMA, N. & NAGAI, H. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. *Bacteriology Reviews*, 24: 404-426, 1960.

50. NAGODAWITHANA, T. W.; CASTELLAND, C.; STEINKRAUS, K. H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of Saccharomyces cerevisiae in rapid fermentations. *Applied Microbiology*, 28: 383-391, 1974.
51. NAVARRO, J. M. & DURAND, G. Fermentation alcoolique: influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Ann. Microbiol.*, 129B: 215-221, 1978.
52. NORKHEIRMER, H. Alimentación y obtención de alimentos en el Perú Prehispánico. Comentarios del Perú No 13, 1973. Ed. U.N.M.S.M. Lima, Perú.
53. OGUR, M.; JOHN, ST. & NAGAI, S. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science*, 125: 926-929, 1957.
54. OGUR, M. & JHON, ST. A differential and diagnostic plating method for population studies of respiration deficiency in yeast. *J. Bacteriol.*, 72: 500-504, 1958.
55. OSMAN, Y. A. & INGRAM, L. O. Mechanism of ethanol fermentation in Zymomonas mobilis CP4. *J. Bacteriol.*, 164: 173-180.
56. PARK, Y. K. & RIVERA, B. C. Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. *Biotechn. and Bioeng.*, 24: 495-500, 1982.

- 57 PELCZAR, M. J. & RIED, R D. Microbiologia. Ed. Mc Graw Hill, Mexico, 1978.
58. PHAFF, J. H. & STARMER, W. Yeast associated with plants, insects and soil, 123-179. In. ROSE, A. & HARRISON, J. The yeasts. Vol. 1. Ed. Academic Press, London, 1987.
59. PHEIFFER, P. & RADLER, F. Comparison of the Killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K<sub>m</sub>.
60. PHILLISKIRK, G. & YOUNG, T. The occurrence of Killer character in yeast of various genera. J. Microbiol. Serol., 41: 147-151, 1975.
61. RAUT, C. A cytochrome deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae. Exp. Cell Research, 4: 295-305, 1953.
62. RAUT, C. Heritable non-genic changes induced in yeast by ultraviolet light. J. Cellular Comp. Physiol., 44: 463-475, 1954.
63. RIED, W. Formazane und tetrazoliumsalze, ihre synthesen und ihre bedeutung als reduktionsindikatoren und vitalfarstoffe. Angewandte Chemie, 14: 391-396, 1952.
64. SANCHEZ, C. H. El maiz: composición química y utilización. Programa Cooperativo de Investigaciones de maiz, 1966. UNA. Lima- Perú.
65. SCRIBAN, R. B. Biotecnologia. Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1985.

66. SEKI, T.; MYOGA, S.; LIMTONG, S.; VEDONO, S.; KUMNVANTA, J.; TAGUCHI, H. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnology Letters*, 5: 351-356, 1983.
67. SHIMIZU, K.; ADACHI, T.; KITANO, K.; SHIMAZOKI, T.; TOTSUKA, A.; HARA, S. & DITTRUCH, H. Killer properties of wine yeasts and characterization of Killer wine yeasts. *J. Ferment. Technol.*, 63: 421-429, 1985.
68. SKOTNICKI, M. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Comparison of ethanol production by different Zymomonas strains. *Appl. Env. Microbiol.*, 41: 889-893, 1981.
69. SMITH, F. E. Tetrazolium salt. *Science*, 113: 751-754, 1951.
70. SPENCER, T. F. & SPENCER, M. D. Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 121-142, 1983.
71. STOKES, J. L. Mesophilic yeasts. In *The yeasts*. Rose, A. & Harrison, J. S. Vol. 2: 119-134, 1971.
72. STRAUS, H. F.; CHERONIS, D. N.; STRAUS, E. Demonstration of reducing enzyme systems in neoplasms and living mammalian tissues by triphenyltetrazolium chloride. *Science*, 108: 113-115, 1948.
73. TIPPER, D. & BOSTIAN, A. Double-stranded ribonucleic acid Killer systems in yeasts. *Microbiological Reviews*, 48: 125-156, 1984.

74. VASQUEZ, V. J. Estudio químico-bromatológico de la chicha de jora. Tesis Farmacia y Bioquímica. U.N.M.S.M. Lima- Perú, 1950.
75. VASQUEZ, C. M. La chicha en los países andinos. Revista Americana Indigena, 27: 265-282, 1967.
76. VODKIN, M.; KATTERMAN, F. & FINK, G. Yeasts Killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acid. J. Bacteriol., 155: 681-686, 1974.
77. WICKNER, R. B. "Killer character" of Saccharomyces cerevisiae: Curing by growth at elevated temperature. J. Bacteriol. 117: 1356-1357, 1974.
78. WICKNER, R. B. The Killer double-stranded. Plasmid, 2: 303-322, 1979.
79. WOOD, D. R. & BEVAN, E. A. Studies on the nature of the Killer factor produced by Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol., 51: 115-126, 1968.
80. YOSHIDA, K.; NORO, F.; INAHASHI, M. & MURAKAMI, N. General characteristics and applicability to sake brewing of various Kyokai yeasts showing different colony colors by the TTC staining. J. Brew. Soc. Japan, 77: 413-418, 1982.
81. YOUNG, W. T. Killer yeasts, 131-164. In: The Yeasts. Rose, A. & Harrison, J. S. Vol. 1. Ed. Academic Press, London, 1987.

82. YOUNG, W. T. The genetic manipulation of Killer character into brewing yeasts. J. Inst. Brew., 87: 292-295, 1981.
83. ZORG, J.; KILIAN, S. & RADLER,F. Killer toxin producing strains of the yeasts Hanseniospora uvarum and Pichia kluyveri. Arch. Microbiol., 149: 261-267, 1988.