

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Departamento de Tecnologia de Alimentos

**Dinâmica Populacional de Leveduras Caracterizadas por
Eletro-cariótipo e Desempenho Fermentativo em
Processos de Fermentação Alcoólica**

Cibele Tosin Stroppa
Autora

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Orientador

Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta
Co-orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Cibele Tosin Stroppa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de maio de 2002.

Campinas, 20 de maio de 2002.


Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas

Maior/2002

i
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DE 80
MADA T/UNICAMP
St 89d
EX
BCI 50211
16-837102
DX
R\$ 11,00
04/08/02
D

00171177-4

D 249050

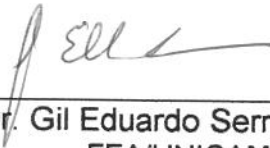
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

~~St 89d~~
St 89d Stroppa, Cibeles Tosin
Dinâmica populacional de leveduras caracterizadas por
eletro-cariótipo e desempenho fermentativo em processos de
fermentação alcoólica / Cibeles Tosin Stroppa. – Campinas, SP:
[s.n.], 2002.

Orientador: Gil Eduardo Serra
Co-orientador: Sílvio Roberto Andrietta
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.Levedos. 2.População – Dinâmica. 3.Fermentação.
4.Cariotipagem. I.Serra, Gil Eduardo. II.Andrietta, Sílvio
Roberto. III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV.Título.

BANCA EXAMINADORA



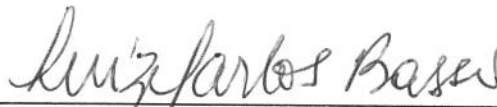
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra – Orientador
FEA/UNICAMP



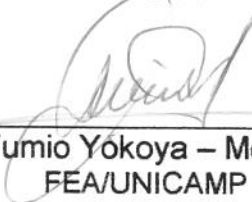
Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta – Membro Titular
CPQBA/UNICAMP



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho – Membro Titular
FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Luiz Carlos Basso – Membro Titular
ESALQ/USP



Prof. Dr. Fumio Yokoya – Membro Titular
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues – Membro Suplente
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana – Membro Suplente
FEQ/UNICAMP

200235207

DEDICATÓRIA

Ao João Carlos, como uma pequena homenagem a duas décadas de companheirismo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio imprescindível prestado por meus pais, Sônia e Carlos. Esse apoio permitiu a realização dessa tese sem prejuízo da vida familiar, especialmente dos cuidados com meus filhos.

Às minhas irmãs Larissa, Cristiane e Milena pela amizade e dedicação; à Heloísa e Neville pelo carinho e apoio no envio dos textos inexistentes no Brasil.

A meus filhos Felipe e Marina pela compreensão, nem sempre explícita.

Ao casal Sílvio e Graça Andrietta pelo tema, viabilização e acompanhamento da tese e, principalmente, pelo respeito, amizade e ensinamentos diários responsáveis pela minha formação como pesquisadora, ao longo dos últimos sete anos.

Ao professor Gil Serra pela disponibilidade, pelo cuidadoso acompanhamento da minha vida acadêmica e pelo enriquecimento que suas observações proporcionaram à versão final desse trabalho.

Ao professor Luiz Carlos Basso pelas sugestões e pela oportunidade de realização dos cariótipos de leveduras na Esalq/USP.

Aos professores Francisco Maugeri e Fumio Yokoya pelas correções e sugestões à primeira versão dessa tese.

Aos companheiros de laboratório Milene, Marcelo, Gisele, Cláudia e Cláudio pela amizade e apoio técnico.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, que proporcionou as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da UNICAMP, especialmente das secretarias de pós-graduação e do Departamento de Tecnologia, bem como da biblioteca, da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Ao CNPq pelo importante apoio financeiro na forma de bolsa de estudos.

Muito obrigada.

ÍNDICE

RESUMO.....	xiii
SUMMURY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1 Evolução dos Processos de Fermentação Alcoólica.....	05
2.2. As Leveduras.....	07
2.2.1 A Utilização de Leveduras como Inóculo na Fermentação Alcoólica.....	07
2.2.2 Leveduras Contaminantes da Fermentação Alcoólica.....	09
2.2.3. Sistemas de Caracterização de Leveduras.....	12
2.2.3.1 A Taxonomia de Leveduras.....	12
2.2.3.2 Meios de Cultivo Diferenciais para Leveduras.....	17
2.2.3.3 Cariotipagem de Leveduras.....	19
2.2.3.4 A Utilização das Características Industriais das Leveduras....	25
2.3 Dinâmica Populacional de Leveduras na Fermentação.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Características e Parâmetros de Operação dos Processos Estudados...	29
3.2 Isolamento dos Microrganismos.....	30
3.3 Teste de Potencial Fermentativo.....	31
3.4 Classificação pelo Teste da Capacidade Fermentativa.....	37
3.5 Taxonomia Numérica.....	40
3.6 Cariotipagem.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Destilaria Clealco.....	47
4.1.1 Safra 95/96.....	47
4.1.1.1 Leveduras Isoladas.....	47
4.1.1.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance.....	48
4.1.1.3 Identificação Taxonômica.....	51
4.1.1.4 Cariotipagem.....	54

4.1.2 Safra 96/97.....	57
4.1.2.1 Leveduras Isoladas.....	57
4.1.2.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance.....	58
4.1.2.3 Identificação Taxonômica.....	61
4.1.2.4 Cariotipagem.....	64
4.2. Destilaria Unialco Safra 97/98.....	69
4.2.1 Leveduras Isoladas.....	69
4.2.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance.....	70
4.2.3 Identificação Taxonômica.....	74
4.2.4 Cariotipagem.....	76
4.3 Destilaria Diana.....	81
4.3.1. Safra 95/96.....	81
4.3.1.1 Leveduras Isoladas.....	81
4.3.1.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance.....	83
4.3.1.3 Identificação Taxonômica.....	88
4.3.1.4 Cariotipagem.....	90
4.3.2. Safra 99/00.....	95
4.3.2.1 Leveduras Isoladas.....	95
4.3.2.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance.....	96
4.3.2.3 Identificação Taxonômica.....	103
4.3.2.4 Cariotipagem.....	106
5. CONCLUSÕES.....	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXO.....	133

RESUMO

Cinco safras de três unidades industriais de fermentação alcoólica foram monitoradas quanto à dinâmica populacional de cepas de levedura. Preliminarmente, foram isoladas 122 leveduras em meio diferencial (WLN). Essas leveduras foram avaliadas e classificadas segundo a performance fermentativa. Desse total, 73 isolados apresentaram participação populacional superior a 10% e foram submetidos à identificação taxonômica e avaliação do perfil de assimilação de fontes de carbono. Eles também foram caracterizados segundo o perfil cromossômico por eletroforese de campo pulsado.

As 73 leveduras selecionadas puderam ser identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com os sistemas aceitos atualmente. Contudo, todos os isolados dominantes da destilaria Clealco e grande parte daqueles da destilaria Unialco não assimilaram maltose, e três isolados da destilaria Diana (safra 95/96) assimilaram melibiose. Todas as repetições de colônias de mesma morfologia em WLN obtiveram desempenho fermentativo e perfil cromossômico iguais. Isto indica que a utilização de um meio diferencial eficiente para o isolamento de leveduras reflete a distribuição das cepas nas amostras. O sistema CHEF de cariotipagem mostrou o desaparecimento das leveduras de panificação e a substituição de diferentes cepas na dominância do processo, nas safras que utilizaram fermento de panificação como inóculo. Nas safras em que o inóculo foi uma levedura nativa, observou-se a manutenção dessa cepa por toda a safra. A avaliação da performance fermentativa mostrou-se necessária para a qualificação industrial das cepas e para diferenciação final entre cepas de mesmo cariótipo. A variedade de cariótipos observada sugeriu a ocorrência de cepas de levedura nativas específicas para cada unidade industrial. Essas cepas representam uma reserva de leveduras melhor adaptadas para utilização como inóculo com maiores garantias de estabilidade microbiológica para os processos de fermentação alcoólica.

SUMMARY

Five seasons of three alcoholic fermentation plants had been monitored in order to verify the yeast strain population dynamics. At first, 122 yeasts had been isolated using a differential media (WLN). These yeasts were evaluated and classified according to their fermentative performance. Seventy-three isolates showed proportion higher than 10% in the population and were subjected to taxonomic identification and evaluation of the profile of carbon sources assimilation. They were also characterized according to the chromosomal profile by pulsed-field electrophoresis.

The selected 73 yeasts were identified as *Saccharomyces cerevisiae*, according to the currently taxonomic systems. However, all the dominant isolates from the Clealco distillery and large part of those from the Unialco distillery didn't assimilate maltose and three isolates from Diana distillery assimilated melibiose. All the same morphology colonies repetition in WLN showed the same fermentative performance and chromosomal profile. This denotes that the utilization of an efficient differential media for yeast isolation reflects the strain distribution in the samples. The karyotyping CHEF system showed the bakers' yeasts used at the plant start disappear and that different strains were substituted in the process dominance. In the seasons when the inoculum was indigenous yeast, the maintenance of this strain had been noticed during all the season. The fermentative performance evaluation showed to be necessary for the strains industrial qualification and for the final discrimination between the same karyotype strains. The noticed karyotype diversity suggests the specific indigenous yeast strains occurrence for each plant. These strains represent a better-adapted yeasts stock for inocula utilization with better microbiological stability guaranties for alcoholic fermentation process.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção atual de etanol combustível a partir da fermentação de cana-de-açúcar, alcança 17 bilhões de litros/ano (Wheals et al., 1999) e o setor sucro-alcooleiro representa um segmento importante na economia e na geração de empregos.

A necessidade permanente de otimização dos processos industriais traduziu-se, entre outras condutas, na busca por linhagens de leveduras adequadas à fermentação alcoólica. Várias técnicas têm sido utilizadas em programas de seleção e de melhoramento de cepas de leveduras para produção de álcool combustível. Porém, a utilização dessas cepas especiais em escala industrial tem sido limitada (Panchal & Tavares, 1990). O aporte contínuo de leveduras “nativas”, presentes na matéria-prima e nos equipamentos, para o processo tem tornado inviável a utilização dessas cepas.

Atualmente, no Brasil, as fontes de *Saccharomyces cerevisiae* para a indústria produtora de etanol são basicamente duas: levedura de panificação prensada e leveduras isoladas de processos industriais. As leveduras de panificação utilizadas como inóculo, pela grande quantidade utilizada, permitem o início mais rápido de operação da unidade industrial. Porém, essas leveduras são substituídas por leveduras “nativas” ainda no início da safra (Basso et al., 1993). A utilização de leveduras “nativas” pré-selecionadas como inóculo, têm se revelado importante para a obtenção da estabilidade microbiológica e operacional dos processos, dominando a fermentação ao longo de toda a safra (Stroppa et al., 2000). Contudo, sob condições operacionais inadequadas, leveduras “nativas” que apresentam baixa produtividade em etanol podem dominar o processo de fermentação causando sérios prejuízos à indústria (Andrietta et al., 1997).

O monitoramento da dinâmica das populações de levedura em processos de fermentação alcoólica exige o emprego de técnicas de identificação que permitam distinguir diferentes cepas, bem como a avaliação de sua performance como produtora de etanol. Os sistemas clássicos de identificação de leveduras baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et

al., 1990) e são incapazes de distinguir facilmente algumas espécies e, sobretudo cepas de uma mesma espécie. O desenvolvimento de técnicas moleculares, como a eletroforese de campo pulsado (PFGE), tem permitido a distinção entre diferentes cepas de *S. cerevisiae*, bem como de outras leveduras (De Jonge et al., 1986; Johnson & Mortimer, 1986; Casey et al., 1988; Tanaka et al., 1989; Vezinhét et al., 1990; Yamamoto et al., 1991; Sheehan et al., 1991; Schütz & Gafner, 1994; Briones et al., 1996; Izquierdo-Canãs et al., 1997; Egli et al., 1998; Basso et al., 2000).

Andrietta et al. (1995) propuseram o monitoramento das leveduras durante a fermentação alcoólica através de uma metodologia denominada "Potencial Fermentativo". O método avalia as leveduras segundo sua capacidade fermentativa, revelando informações pertinentes ao desempenho industrial das cepas em questão. Alguns dos parâmetros cinéticos de rendimento e produtividade obtidos para as linhagens estudadas foram utilizados no desenvolvimento de um sistema que classifica leveduras pela associação de seis dígitos correspondentes aos parâmetros avaliados (Andrietta et al., 1999).

A realização de um controle da dinâmica de populações que associa técnicas de identificação com a avaliação do desempenho fermentativo de cada uma das cepas de levedura dominantes, pode fornecer informações valiosas para o aumento da produtividade dos processos de fermentação alcoólica. As informações obtidas podem ser utilizadas na seleção de leveduras nativas com alto potencial fermentativo e na adequação dos processos às suas necessidades através da elaboração e melhoramento de projetos e também da correção de condutas operacionais inadequadas.

Este trabalho teve como objetivo acompanhar e comparar a dinâmica populacional de leveduras em diferentes processos de fermentação alcoólica industrial: destilarias que utilizam como inóculo leveduras de panificação e outras que utilizam leveduras isoladas do processo; diferentes safras de uma mesma destilaria; processos batelada e contínuos; diferentes plantas de fermentação contínua. Três técnicas de caracterização de leveduras foram utilizadas e avaliadas neste trabalho: cariotipagem, taxonomia numérica e avaliação do

desempenho industrial através das metodologias do “Potencial Fermentativo” e “Capacidade Fermentativa”.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Evolução dos Processos de Fermentação Alcoólica

A produção industrial de etanol por fermentação alcoólica iniciou-se no século XIX, precedida pela produção de aguardente (Almeida, 1940). Até a década de 60, do século passado, foram amplamente utilizados os chamados processos clássicos de fermentação (Lima, 1960; Drews, 1964). Nestes processos, a dorna é parcialmente preenchida com mosto e inoculada com parte do vinho de outra dorna em estágio final de fermentação (sistema de corte) ou inoculada com pé-de-cuba individual produzido a partir de cultura nova, recém ativada em laboratório (Lima, 1960).

A partir da década de 60, o processo Melle-Boinot substituiu os processos clássicos rapidamente (Drews, 1964) e, posteriormente, todas as novas destilarias instaladas sob vigência do Programa Nacional do Alcool (1975) foram equipadas com este processo (Zarpellon & Andrietta, 1992). O processo Melle-Boinot surgiu na França, na década de 30 (Almeida, 1960), e baseia-se na alimentação contínua de substrato ao fermentador até atingir o seu volume máximo. A alimentação deve acompanhar a curva de crescimento celular e conseqüente taxa de consumo de substrato, de maneira que a concentração de açúcares totais permaneça baixa e constante (1,5-3,0g/l). Na prática industrial, a alimentação de substrato é acelerada e observa-se uma concentração de açúcares maior e crescente. Ao final da fermentação, as células de levedura são separadas do meio fermentado por separadoras centrífugas e retornam ao processo como inóculo de uma nova batelada.

As vantagens do sistema Melle-Boinot, segundo Almeida (1960), são: economia de açúcar e elevação do rendimento em etanol devido à diminuição da reprodução celular; eliminação de contaminantes pela centrifugação; diminuição da contaminação devido ao tratamento ácido e eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba (inóculo). Deve-se destacar também a redução no tempo de fermentação alcançada.

A evolução natural do processo batelada-alimentada é a fermentação contínua, que já operava em escala industrial na França na década de 30 (Borzani, 1960; Finguerut et al., 1992). No Brasil, Rousselet (1962) cita estudos sobre fermentação contínua datados a partir de 1951. Neste processo, a levedura é adicionada ao mosto produzindo um fluxo que alimenta continuamente o fermentador. O processo de fermentação inicia-se na primeira dorna e prossegue ao longo de uma linha de mais 3 ou 4 dornas. O vinho levedurado proveniente da última dorna é enviado a um conjunto de separadoras centrífugas. Das duas fases obtidas, o creme de leveduras é enviado à cuba para tratamento ácido e o vinho delevedurado é destinado à destilação. O número total de dornas e seu volume relativo têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores, na busca de melhores arranjos para a fermentação contínua (Ghose & Tyagi, 1979; Andrietta, 1994).

Borzani (1960) e Guerreiro (1995) destacaram os benefícios da fermentação contínua. Segundo o último autor, emprego da fermentação contínua associada à adoção de técnicas modernas como cinética microbiana, otimização, simulação de processos e projetos específicos pode trazer como vantagens: modernização da usina, aumento na produção, redução dos gastos de mão-de-obra, redução de gastos em análises, aumento de produtividade, redução de tempos não produtivos (carga, descarga, limpeza), condução da fermentação em estado estacionário, redução de insumos, uniformidade do produto e maior controle operacional do processo.

Estudos comparativos e avaliações econômicas de diversos processos utilizados na produção de etanol por fermentação concluíram pelas vantagens do processo de fermentação contínua em relação à batelada tradicional (Cysewski e Wilke, 1978; Maiorella et al., 1984). Cysewski e Wilke (1978) demonstraram uma redução de 57% no investimento de capital fixo em destilarias com fermentação contínua quando comparado ao daquelas que utilizam processo de batelada. Reduções ainda maiores, da ordem de 68 e 71%, são obtidas para os processos que utilizam reciclo de células e operação a vácuo, respectivamente.

Andrietta (1997) acredita que a recentrifugação do fermento e processos de separação de fermento sem centrífugas são as duas alterações mais promissoras aos processos atuais de fermentação contínua.

2.2. As Leveduras

Há evidências de que a capacidade de certas leveduras, em converter rápida e eficientemente açúcares em álcool e dióxido de carbono, foi utilizada para a produção de alimentos fermentados por todas as civilizações antigas conhecidas. Provavelmente, as leveduras sejam as mais antigas plantas cultivadas pelo homem (Miller, 1983).

A primeira descrição das leveduras data de 1680 e foi realizada por Antonie van Leeuwenhoek, observando cerveja em fermentação. Pasteur, em estudos divulgados a partir de 1866, provou que a fermentação é fruto da atividade de células vivas, as leveduras, na ausência de oxigênio (Miller, 1983).

As leveduras são hoje o mais importante grupo de microrganismos explorados comercialmente pelo homem, tanto quantitativa como economicamente (Russell et al., 1987). Esses microrganismos têm sido utilizados na produção de produtos químicos, combustíveis e proteínas microbianas para uso alimentar (Rose & Harrison, 1987).

2.2.1 A Utilização de Leveduras como Inóculo na Fermentação Alcoólica

Apesar dos esforços que vêm sendo realizados em pesquisas utilizando bactérias e outras leveduras para produção de etanol, *Saccharomyes cerevisae* continua sendo o microrganismo mais empregado pela indústria. Várias técnicas têm sido utilizadas em programas de seleção e de melhoramento de cepas de leveduras para produção de álcool combustível. As técnicas de melhoramento genético utilizadas incluem cruzamentos naturais, hibridização, cruzamentos forçados, mutações, fusões de protoplastos e tecnologia do DNA recombinante (Panchal & Tavares, 1990).

As técnicas de seleção procuram identificar cepas de levedura que apresentem capacidade fermentativa em altas concentrações de substrato (Bertolini et al., 1991; Lalue et al., 1993), tolerância a altas temperaturas (Rose, 1980; Garcia & Alcina, 1981; Barwald & Hamad citado por Déak, 1991; Van Uden, 1984; Anderson et al., 1988) e tolerância ao etanol (Rose, 1980; Benitez et al., 1983; Casey & Ingledew, 1986; D'amore & Stewart, 1987; Ernandes et al., 1990; Peres & Lalue, 1998).

A indústria brasileira de produção de etanol tem utilizado como inóculo da fermentação alcoólica fundamentalmente leveduras de panificação prensadas ou leveduras isoladas de processos industriais. A primeira estratégia permite o início mais rápido de operação da unidade industrial. Porém, as leveduras de panificação são completamente substituídas por leveduras "nativas" ainda no início da safra (Basso et al., 1993).

Stroppa et al. (2000) acompanharam e compararam a dinâmica populacional de leveduras em dois processos de fermentação distintos. Um dos processos utilizou uma levedura "nativa" pré-selecionada como inóculo, que dominou a fermentação durante toda a safra. No processo que iniciou a fermentação com levedura de panificação, vários tipos diferentes de levedura dominaram a fermentação ao longo da safra.

A utilização de cepas pré-selecionadas tem se revelado um importante fator para a estabilidade microbiológica e operacional dos processos. Porém, sob condições operacionais inadequadas, mesmo as leveduras "nativas" utilizadas como inóculo podem ser substituídas por outras que apresentam baixa produtividade em etanol. Essas leveduras oportunistas passam a dominar o processo de fermentação causando sérios prejuízos à indústria (Andrietta et al., 1997).

Nomear essas leveduras nativas como "leveduras selvagens" não parece adequado. O termo "leveduras selvagens" tem origem na cervejaria, onde tem caráter negativo e refere-se a "leveduras não usadas deliberadamente e fora de controle" (Gilliland citado por Campbell, 1999b). Na produção de etanol carburante, algumas vezes as leveduras nativas invasoras trazem prejuízos à fermentação. Porém, na maioria das vezes, as leveduras nativas substituem

aquelas utilizadas como inóculo mostrando-se plenamente adaptadas às condições industriais.

2.2.2 Leveduras Contaminantes da Fermentação Alcoólica

O processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar é normalmente habitado por microrganismos deterioradores, encontrados desde a matéria-prima até a fermentação.

A fonte primária dos contaminantes na fermentação alcoólica da cana-de-açúcar é a própria matéria-prima. Esses contaminantes são habitantes naturais da planta, do solo, matéria orgânica em decomposição e microrganismos associados às pragas e moléstias da cultura (Yokoya, 1991). Duncan & Colmer (1964) encontraram níveis de 10^4 a 10^8 bactérias e de 10^3 a 10^4 fungos por grama de cana saudável. Bevan & Bond (1971) isolaram 50 microrganismos diferentes de cana-de-açúcar sadia, entre eles as leveduras *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*.

A prática da queima deixa a planta ainda mais susceptível ao ataque de microrganismos (Bevan & Bond, 1971) e os instrumentos de corte podem representar uma fonte extra de contaminação (Egan, 1965, 1968; Tilbury, 1968). Bevan & Bond (1971) isolaram as leveduras *Torula*, *Rhodotorula* e *Candida* da superfície de cana após 24 horas da queima e encontraram leveduras no interior dos gomos imediatamente depois do corte.

Vários trabalhos demonstraram a deterioração da cana após a queima em função do tempo de armazenamento (Hes, 1952; Egan, 1965, 1966, 1968; Brujin, 1966). Tilbury (1975) verificou níveis de 10^7 a 10^8 bactérias lácticas/ml no caldo extraído da cana até o 4º dia de armazenamento. Perdas de açúcar devido à deterioração da cana têm sido estimadas geralmente entre 1 e 3%, do conteúdo inicial. Porém, perdas de até 13% têm sido relatadas (Morel Du Boil, 2001).

O processo de lavagem da cana também pode representar um foco de contaminação da matéria-prima, dependendo da qualidade microbiológica da água empregada (Serra et al., 1979; Stupiello, 1982). Em sistemas que utilizam recirculação de água de lavagem sem tratamento, o pH próximo da neutralidade

favorece o desenvolvimento microbiano que pode atingir níveis acima de 10^8 células/ml.

A literatura é farta ao reconhecer no caldo de cana extraído um meio favorável ao crescimento de uma flora microbiana abundante e variada (Lima et al., 1974; Rodini, 1985; Yokoya, 1989; Ganou-Parfait, 1989; Gallo & Canhos, 1991) devido à sua rica composição em nutrientes orgânicos e inorgânicos, pH, alta atividade de água e temperatura. Focos de contaminação nas moendas, esteiras, tubulações e outros equipamentos certamente devem contribuir para o aumento da microbiota presente.

Lima et al. (1974) isolaram de água de embebição, caldo bruto e caldo misto as leveduras *Candida didensii*, *C. fabiani*, *C. intermedia*, *C. santamariae*, *Cryptococcus kvetzingii*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera corticis*, *Rhodotorula pallida*, *R. rubra*, *Saccharomyces uvarum*, *Torulopsis norvegica* e *Trichosporon cutaneum*.

Castro (1995) isolou do mosto de duas usinas produtoras de etanol principalmente os gêneros de leveduras contaminantes *Saccharomyces* (40,7%) e *Candida* (37,9%). Também foram isolados representantes de *Zygosaccharomyces/Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycodes/Hanseniaspora* e *Trichosporon*.

Cabrini & Gallo (1999a) utilizaram a metodologia da taxonomia numérica proposta por Griffiths (1981) para isolar e identificar leveduras contaminantes de um processo de produção de etanol. Os autores isolaram de amostras de caldo primário *Candida* (43,4%), *Saccharomyces* (36,6%), *Torulopsis* (10,0%) e *Pichia* 10,0%). Em amostras de mosto foram identificadas as espécies *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (42,9%), *S. coreanus* (28,6%), *S. chevalieri* (14,3%) e *Schizosaccharomyces pombe* (14,3%).

Ao isolar leveduras de outra unidade industrial ainda utilizando o sistema de identificação de Griffiths (1981), Cabrini & Gallo (1999b) identificaram em caldo primário: *Candida* (64%), *Saccharomyces* (28%) e *Torulopsis* (8%). Na amostras de mosto foram identificados: *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (53,9%), *S.*

bayanus (15,4%), *Candida entomophila* (11,6%), *S. chevalieri* (7,7%), *C. membranaefaciens* (3,8%), *Torulopsis dattila* (3,8%) e *Rhodotorula glutinis* (3,8%).

O tratamento com cal e a elevação da temperatura durante a etapa de clarificação do caldo reduzem substancialmente a contagem microbiana (Yokoya, 1991) representando a primeira grande barreira ao desenvolvimento microbiano. O número de sobreviventes pode diminuir em 10^5 indivíduos para leveduras e formas vegetativas de bactérias. Esse processo elimina as células vegetativas, porém, seleciona bactérias esporuladas e produtoras de gomas (Skole et al., 1977) que permanecem viáveis em caldo tratado a 115°C (Lucredi et al., 1984).

O melaço, resíduo da fabricação de açúcar, muitas vezes compõe o mosto da fermentação misturado ao caldo da cana-de-açúcar. Souza et al. (1977) isolaram os seguintes grupos de levedura em amostras de melaço de açúcar cristal e demerara: *Hansenula henricii*, *H. canadensis*, *Rhodotorula pallida*, *Sporobolomyces roseus*, *Cryptococcus albidus* var. *albidus*, *C. infirmominiatus*, *Candida melinii*, *Debarryomyces cantarelli*, *Oosporidium margaritiferum*, *Rhodotorula graminis*, *Torulopsis candida* e *Torula*.

Ao serem introduzidos na fermentação, os microrganismos presentes no mosto encontram um ambiente restritivo. Temperaturas relativamente altas, pH baixo, concentrações baixas de oxigênio, altas de ácidos e álcool, concentrações variáveis de açúcar e a presença de microrganismos competidores determinam a proliferação de algumas espécies e a morte ou a manutenção de um estado de latência por muitas outras espécies, durante a fermentação (Yokoya, 1991). Algumas poucas leveduras que conseguem ultrapassar a barreira da clarificação e aquelas presentes nos equipamentos e instalações após tratamento térmico poderão encontrar um ambiente favorável nas dornas de fermentação.

Oliveira e Pagnocca (1988) identificaram as leveduras contaminantes *Hansenula anomala*, *Candida famata*, *Saccharomyces kluyveri* e *S. cerevisiae* em amostras de fermento centrifugado, fermento tratado e vinho levedurado.

Silva (1994) isolou de um processo de produção de etanol principalmente representantes da levedura *Dekkera bruxellensis* e também outras espécies como *Candida maltosa*, *C. mogii*, *Issatchenkia occidentalis* (*C. sorbosa*), *Rhodotorula*

minuta/mucilaginosa, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Torulaspora delbrueckii* (*Candida colliculosa*).

Castro (1995) isolou e identificou linhagens de leveduras contaminantes, a partir de amostras de vinho levedurado e fermento centrifugado, pertencentes principalmente aos gêneros *Candida* (42,8%) e *Saccharomyces* (38,1%). Os outros gêneros presentes foram *Zygosaccharomyces/Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Issatchenkia*, *Saccharomycodes/Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, e *Trichosporon*.

Em acompanhamento realizado durante cinco safras objetivando a detecção de leveduras contaminantes em diversas unidades produtoras de etanol, Oliveira et al. (1996) isolaram representantes de *Saccharomyces capensis*, *S. bayanus*, *Pichia ohmeri*, *Trichosporon brassicae*, *Torulaspora pretoriensis* e *Kluyveromyces vanudenii*.

Cabrini & Gallo (1999a) identificaram através da taxonomia numérica proposta por Griffiths (1981) *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (50,0%), *S. bayanus* (21,4%), *S. pretoriensis* (10,7%), *Candida entomophila* (10,7%), *S. chevalieri* (3,6%) e *Pichia ohmeri* (3,6%) presentes no leite de leveduras de unidade de produção de etanol.

Em Cabrini & Gallo (1999b), além da caracterização das leveduras presentes no caldo primário e no mosto já descrita, os autores identificaram no leite de levedura *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (41,2%), *S. bayanus* (35,3%), *S. coreanus* (5,9%), *S. pretoriensis* (5,9%), *Candida entomophila* (5,9%) e *C. rhagii* (5,9%).

2.2.3. Sistemas de Caracterização de Leveduras

2.2.3.1 A Taxonomia de Leveduras

Leveduras são fungos essencialmente unicelulares e a maioria se reproduz vegetativamente por brotamento (Barnett, 1992). Campbell (1999a) considera esse grupo de difícil definição já que vários outros fungos podem apresentar forma

semelhante à das leveduras e, por outro lado, as leveduras são capazes, sob condições de cultivo apropriadas, de crescer em forma micelial.

Os sistemas de classificação aceitos pela maioria dos micologistas para leveduras permanecem basicamente aqueles propostos por Kreger-van Rij (1984) e Barnett et al. (1990).

Os fungos são classificados com base na forma de crescimento vegetativo e tipo de esporos, se produzidos. Apesar de não utilizadas na identificação de fungos filamentosos, as propriedades fisiológicas são utilizadas na distinção de espécies de leveduras (Campbell, 1999a).

Três dos quatro grupos de fungos incluem leveduras: Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. As leveduras pertencentes aos dois primeiros grupos produzem esporos, com exceção de alguns basidiomicetos, enquanto que as do grupo Deuteromycetes (fungos imperfeitos) não produzem esporos. Essas últimas são definidas como leveduras imperfeitas e são distinguidas pela forma de crescimento vegetativo, pela habilidade fermentativa e por outros testes bioquímicos (Kreger-van Rij, 1984). Os gêneros de maior importância na indústria da fermentação alcoólica pertencem aos ascomicetos e deuteromicetos (Tabela 1).

A esporulação é uma propriedade fundamental para a taxonomia clássica de leveduras e impõe a observação de esporos como uma primeira etapa na identificação clássica proposta pela escola holandesa (Lodder, 1970; Kreger-van Rij, 1984). Na tentativa de evitar as dificuldades surgidas pelo uso da esporulação na identificação de leveduras, vários autores têm fornecido esquemas de identificação alternativos nos quais ignoram essa característica. Esses esquemas culminaram na elaboração de um sistema complexo de identificação por propriedades fisiológicas proposto por Barnett et al. (1990). Os kits de teste API® para identificação de leveduras são uma versão simplificada, porém efetiva desse sistema. Enquanto a escola holandesa identifica seguindo estritamente uma ordem hierárquica de descendência, Barnett et al. (1983 e 1990) inicialmente subdividem as leveduras em grandes grupos fisiológicos, que desprezam o grau

de parentesco, e depois identificam as espécies de cada grupo pela realização de testes complementares (Campbell, 1999a) (Tabela 2).

Tabela 1 – Principais gêneros de leveduras.

Classe	Gêneros
Ascomycetes	<i>Metschnikowia</i> , <i>Nematospora</i>
	<i>Schizosaccharomyces</i>
	<i>Hanseniaspora</i> , <i>Nadsonia</i> , <i>Saccharomycoides</i>
	<i>Lipomyces</i>
	<i>Debaryomyces</i> , <i>Dekkera</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Schwanniomyces</i> , <i>Torulaspora</i> , <i>Zygosaccharomyces</i>
Basidiomycetes	<i>Sporobolomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Cryptococcus</i>
Deuteromycetes	<i>Kloeckera</i> , <i>Brettanomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Torulopsis</i> (<i>Candida</i>).

Adaptado de Kreger-van Rij (1984).

Griffiths (1981) propôs um sistema simplificado de identificação de leveduras baseado, principalmente, em testes bioquímicos de assimilação e fermentação de fontes de carbono. O autor utilizou as descrições de Lodder (1970) e da chave de Barnett & Pankhurst (1974) para compor seu sistema de identificação. No sistema de taxonomia numérica é atribuído um valor numérico específico a cada um dos 21 testes realizados, de acordo com o resultado observado. Os 21 testes são agrupados de três em três e são somados os resultados de cada trinca gerando um código numérico final de identificação composto de sete dígitos.

Historicamente, a classificação do gênero *Saccharomyces* tem apresentado muitas mudanças. Nas últimas décadas, o número de espécies variou de 41 (Van der Walt, 1970) para somente 7 (Barnett et al., 1983; Kreger-van Rij, 1984) e atualmente para 10 (Barnett et al., 1990). Essas dez espécies são:

Saccharomyces castellii, *S. cerevisiae*, *S. dairensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. servazzii*, *S. unisporus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* e *S. bayanus*.

Tabela 2 – Princípios de identificação de leveduras.

Identificação pelo sistema clássico (Kreger-van Rij, 1984)	Identificação somente por testes fisiológicos	
	Barnett et al. (1983 e 1990)	API (Anon., 1994)
Isolado	Isolado	Isolado
↓	↓	↓
Observação da morfologia de células vegetativas e esporos	Testes de crescimento aeróbico em várias fontes de C e N	Testes de crescimento aeróbico em várias fontes de C
↓	↓	↓
Família, gênero	Grupo fisiológico	Gênero, espécie
↓	↓	
Testes de fermentação e crescimento aeróbico	Testes apropriados para cada grupo (geralmente testes adicionais de crescimento)	
↓	↓	
Espécie	Gênero, espécie	

Cambell (1999a)

Novas técnicas baseadas em outras propriedades bioquímicas têm sido sugeridas para classificação e identificação de leveduras. A porcentagem de guanina mais citosina (G+C) tem sido de grande valor prático na classificação (Barnett et al., 1990).

Muitas mudanças de nomenclatura taxonômica têm sido associadas à mudanças nos critérios aceitos pelos taxonomistas para delimitar espécies. Os critérios iniciais eram baseados em características fenotípicas, como aparência microscópica e capacidade de usar certos substratos. Atualmente, é amplamente

aceito que a classificação deve refletir, tanto quanto possível, as relações evolutivas entre as leveduras. Sob esse ponto de vista, quanto mais próximas as relações de parentesco, mais seqüências de bases de DNA em comum (Barnett, 1992). Cepas que apresentam uma homologia de seqüência de bases superior a 80% são consideradas como pertencentes à mesma espécie (Kurtzman & Phaff, 1987; Van der Walt, 1987). Um alto grau de homologia de DNA pode indicar uma relação de parentesco próxima, porém valores baixos são mais difíceis de interpretar, já que a taxa de mutação do DNA é desconhecida, algumas cepas diferem no número de transposons Ty e apresentam aneuploidias (Barnett, 1992).

Outras técnicas têm sido empregadas na classificação e identificação taxonômicas de leveduras como aquelas baseadas em análises genéticas (Pedersen et al., 1987), sorologia (Yarrow & Nakase, 1975; Fukazawa et al. 1980a e 1980b) e análises de DNA (Yarrow & Nakase, 1975; Carlson & Botstein, 1983; Vaughan-Martini & Kurtzman, 1985; Seehaus et al., 1985; Johntson & Mortimer, 1986; Vaughan-Martini & Martini, 1987; Vaughan-Martini & Kurtzman, 1988; Vaughan-Martini, 1989; Vezinhét et al., 1990; Vaughan-Martini et al., 1993; Guillamón et al., 1994; Cardinali & Martini, 1994; Baleiras-Couto et al., 1995; Mani et al., 1998).

Apesar dos esforços dos taxonomistas, os métodos de classificação falham na distinção de propriedades industriais importantes das leveduras e, por isso, têm sido criticados por microbiologistas ligados à atividade industrial (Russell, 1995; Campbell, 1999a). Na cervejaria, a distinção definitiva entre a levedura cultivada e leveduras contaminantes somente é alcançada pela avaliação de suas características industriais (floculação, pH final, consumo de N, produção de células, taxa de fermentação, aroma final da cerveja, etc) em fermentações de escala de laboratório (Campbell, 1999b).

Barnett (1992) conclui que não há um sistema taxonômico definitivo para leveduras e que suas mudanças não afetam o trabalho dos biólogos industriais. Obviamente, trata-se de abordagens diferentes, cada qual contribuindo significativamente para o esclarecimento da natureza desses microrganismos.

2.2.3.2 Meios de Cultivo Diferenciais para Leveduras

A fermentação de suco de uvas em vinho é um processo microbiológico complexo envolvendo interações entre diferentes espécies de leveduras e bactérias lácticas. Destes organismos, as leveduras ocupam uma função central. Durante a produção tradicional de vinho, as diferentes espécies presentes inicialmente nas uvas e equipamentos são substituídas e *Saccharomyces cerevisiae* passa a predominar (Fleet et al., 1984; Heard & Fleet, 1985; Querol et al., 1994) sendo a principal responsável pela fermentação alcoólica (Boulton et al., 1996). O monitoramento microbiológico de fermentações artificialmente inoculadas deixou claro que a qualidade do vinho é uma consequência da dinâmica e composição dos microrganismos envolvidos na sua produção (Querol et al., 1992; Schütz & Gafner, 1993). Atualmente, a seleção de leveduras vinícolas para produção de levedura seca e seu uso como inóculo é amplamente difundida (Degré et al., 1989) resultando em alta reprodutibilidade das características sensoriais típicas dos vinhos produzidos em cada região, em sucessivas safras.

Na indústria cervejeira, desde o século XIX, a produção comercial utiliza uma cultura pura de levedura tornando o controle microbiológico da fermentação ainda mais importante do que na produção vinícola. A estabilidade e a pureza das cepas de leveduras tem uma importância particular, já que estas são as principais responsáveis pela formação do aroma e sabor da cerveja. As características da levedura também afetam o tempo de fermentação, a eficiência da fermentação e a qualidade da floculação (Quain, 1986 e 1988; Stewart & Russell, 1986).

Meios seletivos têm sido desenvolvidos com o objetivo de selecionar e diferenciar leveduras de processos fermentativos. Van der Aa Kühle & Jespersen (1998) apresentam uma revisão sobre meios seletivos idealizados para detecção de leveduras selvagens (contaminantes) em cervejarias e relacionam os princípios seletivos utilizados: lisina (meio Lisina); cadaverina, lisina, etilamina e nitrato (meio CLEN); xilose, manitol, adonitol, celobiose e sorbitol (meio XMACS); actidiona; cobre; cristal violeta ou sulfito fucsina (meios SDM, Lin ágar e Lin ágar modificado); incubação de meios não seletivos a 37°C; dextrina como fonte única de carbono.

Alguns dos meios seletivos e diferenciais mais utilizados para detecção de leveduras contaminantes na indústria cervejeira são: Lisina ágar, Cristal Violeta ágar, SDM, WLN, Lin ágar, Actidiona ágar e Sulfato de cobre ágar (Lin, 1975; Longley et al., 1978; Harper, 1981). Tradicionalmente as leveduras contaminantes de cerveja têm sido divididas em não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* selvagem (Van der Aa Kühle & Jespersen, 1998), sendo que muitos representantes do último grupo são cepas de *S. cerevisiae* (Campbell, 1999b). O meio Lisina ágar é amplamente utilizado para diferenciar leveduras não-*Saccharomyces*. Nesse meio, a lisina é a única fonte de nitrogênio e não permite o crescimento da maioria das espécies de *Saccharomyces*. Já as *Saccharomyces* selvagens têm sido detectadas nos meios que utilizam cristal violeta (SDM, Cristal Violeta ágar, Lin ágar e Lin ágar modificado) (Taylor & Marsh, 1984). Lin (1975) e Hope (1987) recomendam a utilização dos meios Lisina e Lin para detecção de leveduras selvagens em cervejaria, no isolamento de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*, respectivamente.

O meio WLN ágar contém um indicador de pH, o verde de bromocresol, que colore diferencialmente colônias como resultado dos graus variáveis de afinidade entre os microrganismos e o corante (Lewis & Young, 1998).

Longley et al. (1978) apresentou uma modificação dos meios Cristal Violeta ágar e WLN ágar pela adição de uma mistura de ergosterol e Tween 80. Os meios modificados permitiram o desenvolvimento de colônias maiores de *Saccharomyces* em relação às colônias de outros gêneros.

Harper (1981) utilizou WLN ágar acrescido de 25ppm de clorotetraciclina e isolou vários gêneros de levedura, dentre eles *Saccharomyces*, presentes na cerveja.

Oliveira & Pagnocca (1988) testaram e modificaram meios de cultivo utilizados em cervejaria para análise de leveduras de usinas de açúcar e álcool. Os autores utilizaram o meio WLN para contagem total de leveduras; os meios WLD ágar (WLN adicionado de actidiona) e Lisina ágar para detecção de leveduras selvagens não-*Saccharomyces*; Lin ágar adicionado de ergosterol + Tween 80 e modificado na concentração de cristal violeta para detecção de *Saccharomyces*; Nakagawa ágar para detecção de *S. diastaticus*.

Castro (1995) também utilizou meios de cultivo de cervejaria para avaliação da diversidade de leveduras em duas usinas de açúcar e álcool. Os meios testados foram: WLN ágar para contagem total de leveduras, WLD ágar e Lisina ágar para contagem de leveduras não-*Saccharomyces* e Lin ágar para detecção de *Saccharomyces*. Os meios foram eficientes no isolamento de leveduras e permitiram o desenvolvimento de um número diversificado de linhagens. Comparativamente, o meio WLN ágar possibilitou a discriminação e/ou recuperação do maior número de linhagens de *Saccharomyces*, nas duas indústrias estudadas.

Campbell (1999b) indica a análise da variação de morfologia e cor de colônias gigantes de leveduras crescidas em meio WLN como um dos testes para distinção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo o autor, este é um teste simples e suficiente para reconhecer similaridades ou diferenças entre isolados de levedura, apesar de não fornecer informações sobre sua identidade.

2.2.3.3 Cariotipagem de Leveduras

As leveduras do gênero *Saccharomyces* têm sido domesticadas como resultado de milênios de exploração em ambientes industriais criados pelo homem. Como consequência, essas leveduras são frequentemente homotáticas ou aneuplóides e, portanto, difíceis de serem utilizadas como modelos para estudo e melhoramento genéticos. Análises genéticas têm demonstrado que a variedade na expressão fenotípica de características de desempenho frequentemente observada em cepas de *Saccharomyces* pode ser resultado da presença de genes de múltiplos loci que podem estar ativos, silenciosos ou perdidos em diferentes cepas da mesma espécie. Isto pode explicar a freqüente dificuldade na identificação de isolados de *S. cerevisiae* pela taxonomia convencional, que baseia-se nas características morfológicas e fisiológicas expressas pelas leveduras (Cardinali & Martini, 1994).

Outras técnicas alternativas de identificação de leveduras baseadas em traços fenotípicos têm sido utilizadas como: sorologia (Tsuchiya, et al., 1965); padrões de fermentação e assimilação em tiras API (Subden et al., 1980; Degré et al., 1989);

conteúdo de trealose (Gutierrez, 1990); composição de ácidos graxos (Tredoux et al., 1987; Oothuizen et al., 1987; Bendová et al., 1991; Steckelberg, 2001); eletroforese de proteínas extracelulares (Bouix & Leveau, 1983) e intracelulares (Van Vuuren & Van der Meer, 1987); inibição por diferentes compostos (Simpson et al., 1992). Porém, essas técnicas estão baseadas em características que podem variar segundo diferentes estados fisiológicos da célula (Ness et al., 1993) e algumas delas, como a composição de ácidos graxos e eletroforese de proteínas, falham em distinguir diferentes cepas de uma mesma espécie (Querol et al., 1992).

Os métodos mais úteis na identificação de cepas de levedura envolvem análise de DNA. Como as leveduras industriais têm um grau de parentesco muito próximo, várias cepas apresentam grande homologia entre as moléculas de DNA e conteúdo de GC (guanina+citosina) idêntico. Portanto, métodos baseados nesses parâmetros são de pouca utilidade na diferenciação de cepas (Boulton et al., 1996).

Vários outros métodos moleculares têm sido desenvolvidos recentemente com o propósito de apresentar um único padrão de DNA para uma cepa ou espécie. Esses métodos recebem o nome genérico de DNA fingerprinting (Tabela 3).

Entre as técnicas de análise de DNA mais utilizadas para identificação de cepas de levedura estão: padrões eletroforéticos de cromossomos; PCR e RFLP de DNA mitocondrial e nuclear (Freizer & Dubourdieu, 1992; Ness, et al., 1993; Schütz & Gafner, 1993; Briones et al., 1996; Lopes, et al., 1996; Egli et al., 1998; Pramateftaki et al., 2000).

Tabela 3 – Técnicas moleculares para identificação de cepas/espécies de leveduras (Adaptado de Deák, 1995).

Método	Referências
PCR (reação em cadeia da polimerase): Um DNA de fita dupla é inicialmente desnaturado à temperatura elevada. Dois primers oligonucleotídeos de fita simples flanqueando este segmento são anelados, depois da redução da temperatura, e iniciam a extensão (polimerização do DNA). Pelo uso de DNA-polimerase termo-estável, ciclos de desnaturação, anelamento e extensão podem ser produzidos repetidamente, resultando na amplificação do DNA.	Ness et al., 1993; Lopes et al., 1996; Pramateftaki et al., 2000.
PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado): Uma técnica eletroforética em que cromossomos inteiros são submetidos a campos elétricos alternados. Como a direção do campo elétrico é mudada (pulsos), a separação do DNA cromossômico de acordo com o tamanho ocorre no gel. As bandas resultantes representam o cariótipo eletroforético (análogo ao tamanho e número de cromossomos) de um organismo.	Johnston & Mortimer, 1986; Casey et al., 1988; Johnston et al., 1988; Degré et al., 1989; Vezinhét et al., 1990; Sheehan & Weiss, 1991; Frezier & Dubourdieu, 1992; Vaughan-Martini et al., 1993; Schütz & Gafner, 1993; Basso et al., 1993; Cardinali & Martini, 1994; Schütz & Gafner, 1994; Briones et al., 1996; Izquierdo-Cañas et al., 1997; Egli et al., 1998; Basso et al., 2000; Tornai-Lehoczki & Dlačny, 2000.
Análise de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso): O DNA é amplificado numa reação de PCR usando um único primer compreendendo uma sequência arbitrária. O primer oligonucleotídeo hibridiza com sequências homólogas do DNA ao acaso, e gera segmentos de DNA amplificados. O produto corre num gel que é observado sob luz UV, após ser corado com brometo de etídio. Diferenças nos padrões de banda indicam diferenças de sequências nas moléculas de DNA.	Quesada & Cenis, 1995; Baleiras-Couto et al., 1995; Mani et al., 1998; Gomes et al., 2000; Tornai-Lehoczki & Dlačny, 2000.
Análise de RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição): O DNA é clivado por enzimas de restrição em sequências de nucleotídeos específicas e os fragmentos resultantes são separados eletroforéticamente em géis. Diferentes padrões de bandas (polimorfismos) podem ser observados diretamente sob luz UV, depois dos géis serem corados com brometo de etídio, ou indiretamente, depois da transferência dos fragmentos de DNA para membranas apropriadas (blotting) e hibridização com sequências (sondas) conhecidas de DNA marcadas radioativamente; as regiões de hibridização são então observadas em filmes de raio-X.	Degré et al., 1989; Vezinhét et al., 1990; Guillamón et al., 1994; Querol et al., 1994; Constanti et al., 1998; Jespersen et al., 2000; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Pramateftaki et al., 2000.

A cariotipagem é a determinação do número e tamanho dos cromossomos, que é característico de uma dada espécie. Contudo, variações intraespecíficas consideráveis têm sido observadas. As espécies de levedura podem apresentar polimorfismo de tamanho cromossômico, rearranjos cromossômicos e aneuploidias que são úteis para identificar cepas específicas (Deák, 1995). Esse polimorfismo observado em cepas industriais de levedura é aparentemente resultado de uma evolução acelerada, baseada em algum tipo de mecanismo somatogâmico, em ambientes únicos e segregados (plantas de fermentação em áreas distintas) que provêm condições excepcionais de crescimento e que são apropriados somente para microrganismos tolerantes ao etanol como *S. cerevisiae* (Cardinali & Martini, 1994).

Schwartz & Cantor (1984) e Carle & Olson (1984) foram os primeiros a aplicar os princípios da eletroforese de campo pulsado (PFGE) ou cariotipagem ao estudo de leveduras.

Em uma eletroforese em gel de agarose convencional, o DNA move-se através de um campo elétrico uniforme e moléculas de DNA maiores que 50 Kb, como cromossomos, migram independentemente do seu tamanho e, portanto, não são separadas. Com a aplicação de duas orientações de campos elétricos alternados (pulsos), os cromossomos menores respondem mais rapidamente às mudanças de carga elétrica e movem-se mais rapidamente através do gel produzindo a separação dos cromossomos por tamanho. Depois de corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, o gel exhibe bandas que correspondem aos cromossomos inteiros (Meaden, 1990).

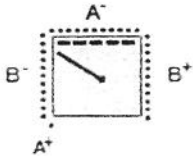
Estudos comparativos de alguns métodos de caracterização de cepas de levedura demonstraram que a análise eletroforética de cromossomos é capaz de diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Degré et al., 1989; Casey et al., 1990; Querol et al., 1992; Mani et al., 1998).

Cepas isoladas de viniculturas (Degré et al., 1989; Vezinhét et al., 1990; Frezier & Dubourdieu, 1992; Schütz & Gafner, 1993 e 1994; Briones et al., 1996; Izquierdo-Cañas et al., 1997; Egli et al., 1998), cervejarias (Pedersen, 1987; Casey et al., 1988; Sheehan & Weis, 1991; Jespersen et al., 2000) e da produção de etanol

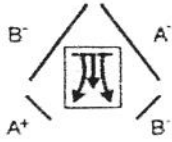
carburante (Basso et al., 1993; 2000) têm sido identificadas com sucesso pela cariotipagem eletroforética.

Nas últimas duas décadas progressos consideráveis têm sido feitos em PFGE pelo ajuste das condições de eletroforese e desenvolvimento de aparelhos que trazem inovações técnicas (Deák, 1995). A principal diferença entre os métodos disponíveis para cariotipagem reside na diferença de orientação dos campos alternados durante a eletroforese (Figura 1).

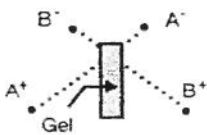
O sistema CHEF de cariotipagem de leveduras tem sido amplamente utilizado na distinção de leveduras industriais (Casey et al., 1988; Sheehan & Weiss, 1991; Frezier & Dubourdieu, 1992; Oakley-Gutowski et al., 1992; Schütz & Gafner, 1993; Vaughan-Martini et al., 1993; Schütz & Gafner, 1994; Cardinali & Martini, 1994; Guillamón et al., 1994; Briones et al., 1996; Izquierdo-Cañas et al., 1997; Egli et al., 1998; Basso et al., 2000). O desenvolvimento de aparelhos comerciais e novos métodos de preparação das amostras de DNA resultaram em cariótipos de maior resolução que representam um método relativamente simples de identificação de cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* (Vaughan-Martini et al., 1993). Sheehan & Weiss (1991) ajustaram as condições de eletroforese do sistema CHEF para alcançar uma melhor resolução dos cromossomos na diferenciação de cepas de alto grau de parentesco. Os autores concluem, em comparação com os sistemas OFAGE e TAFE, pela maior capacidade do sistema CHEF na diferenciação de cepas de leveduras e também pela sua aplicabilidade no controle de qualidade em cervejarias e para estudos genéticos.

**PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

Emprega 2 campos alternados, um homogêneo, um não-homogêneo (Schwartz & Cantor, 1984).

**OFAGE (Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis)**

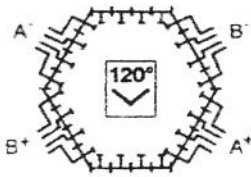
Emprega 2 campos alternados não-homogêneos (Carle & Olson, 1984).

**TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis)**

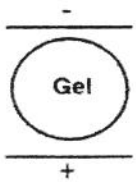
O campo elétrico é orientado transversalmente ao gel (Beckman Instruments).

**FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis)**

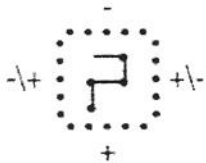
Um campo elétrico uniforme é periodicamente invertido em uma dimensão usando um ângulo de reorientação de 180° (Carle et al., 1986).

**CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field)**

Os 24 elétrodos são dispostos em um contorno hexagonal que oferece ângulos de reorientação de 60 ou 120° (Chu et al., 1986).

**Crossed Field e RFE (Rotating Field Electrophoresis)**

Emprega um único campo homogêneo e muda a orientação em relação ao gel por descontinuidade e rotação periódica do gel (Gekeler e Server citados por Casey, 1990).

**PHOGE (Pulsed Homogeneous Orthogonal Gel Electrophoresis)**

Emprega um ângulo de orientação de campo de 90° (Bancroft & Wolk, 1988).

Figura 1 – Exemplos de sistemas de eletroforese em gel comuns para cariotipagem de leveduras (adaptado de Russell & Dowhanick, 1999).

2.2.3.4 A Utilização das Características Industriais das Leveduras

Uma outra abordagem na diferenciação de cepas industriais de leveduras é possível na indústria cervejeira: a utilização de características de desempenho industrial. Fermentações em pequena escala são conduzidas para distinguir a levedura inoculada de outras suspeitas de serem contaminantes. Algumas das propriedades avaliadas são floculação, pH final, consumo de nitrogênio, produção de células, taxa de fermentação e aroma final da cerveja (Campbell, 1999b).

A utilização de características de desempenho na diferenciação de leveduras também foi proposta para a indústria de produção de etanol carburante. Andrietta et al. (1995) desenvolveram um método de caracterização de leveduras através das determinações da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e do “potencial fermentativo”. O índice “potencial fermentativo” é obtido pela determinação dos rendimentos em etanol, glicerol, ácidos e massa celular relacionadas com o açúcar consumido. O método permite a diferenciação entre cepas de levedura baseada na avaliação de seu desempenho durante a fermentação, quanto às suas qualidades fermentativas. Esse trabalho foi utilizado no desenvolvimento de um sistema que classifica leveduras pela associação de seis dígitos correspondentes a parâmetros cinéticos de rendimento e produtividade (Andrietta et al., 1999). Os parâmetros utilizados são: rendimento em células, velocidade de consumo de substrato, nível de conversão de substrato, velocidade específica máxima de crescimento, produtividade e rendimento em etanol. Várias pesquisas recentes em fermentação alcoólica no Brasil têm utilizado a técnica de caracterização de leveduras proposta por Andrietta: Viegas, 1999; Pulzatto, 2000; Migliari, 2001; Steckelberg, 2001.

2.3 Dinâmica Populacional de Leveduras na Fermentação

Várias pesquisas têm objetivado o monitoramento da dinâmica populacional de leveduras em fermentações vinícolas inoculadas e espontâneas (Querol et al., 1992 e 1994; Schütz & Gafner, 1993 e 1994; Querol & Ramon, 1996; Egli et al., 1998). Vezinhét et al. (1992), utilizando análise de DNA mitocondrial, encontraram evidências da ocorrência de cepas nativas específicas de *Saccharomyces*

cerevisae representantes de uma região vinícola particular. Frezier & Dubourdiou (1992) diferenciaram cepas de *Saccharomyces cerevisae* por cariotipagem e análise de DNA mitocondrial, demonstrando a presença de uma cepa dominante e estável em duas safras consecutivas. Outros trabalhos utilizando também técnicas de análise de DNA (Versavaud et al., 1995; Guillamón et al., 1996, Nadal, 1996; Pramateftaki et al., 2000) indicaram a existência de cepas específicas de *S. cerevisae* em diferentes regiões vinícolas. Esteve-Zaroso et al (2000) selecionaram, utilizando características industriais, cepas de *Saccharomyces* previamente isoladas e diferenciadas por métodos moleculares.

Na indústria de produção de etanol carburante, o acompanhamento da dinâmica de populações pode fornecer informações valiosas para o aumento da produtividade dos processos de fermentação alcoólica. As informações obtidas podem ser utilizadas na seleção de leveduras nativas com alto potencial fermentativo e na adequação dos processos às suas necessidades através da elaboração e melhoramento de projetos e também da correção de condutas operacionais inadequadas.

Basso et al. (1993) realizaram estudo de dinâmica de leveduras em indústrias de fermentação alcoólica brasileiras utilizando a técnica da cariotipagem. Os autores concluíram que as leveduras “estrangeiras” utilizadas como inóculo são completamente substituídas por leveduras “nativas”, ainda no início da safra. A única levedura que persistiu no processo até o final da safra foi isolada da própria unidade industrial em safras anteriores e utilizada como inóculo no início da safra estudada.

Andrietta et al. (1997) acompanharam a dominância anormal de um processo industrial de fermentação alcoólica por cepas que apresentavam características desfavoráveis. A técnica utilizada para caracterização das cepas (Andrietta et al., 1995) avaliou-as segundo suas características fermentativas e velocidade específica máxima de crescimento. Os autores concluíram que as condições operacionais inadequadas proporcionaram a dominância do processo à leveduras “nativas” de baixa produtividade em etanol e baixa velocidade de crescimento, causando sérios prejuízos à indústria.

Basso et al. (2000) acompanharam, por realização de análises de cariótipagem, as populações de levedura em 5 destilarias durante uma safra. Estas indústrias utilizaram como inóculo uma mistura de 1 a 10 toneladas de levedura de panificação e 0,5 kg de biomassa de linhagens previamente selecionadas. As leveduras de panificação foram incapazes de sobreviver no ambiente industrial, enquanto que as leveduras selecionadas permaneceram até o final da safra, algumas vezes representando a totalidade da biomassa. Essas linhagens foram testadas quanto ao desempenho fermentativo revelando-se mais adequadas à fermentação industrial por seus altos conteúdos de glicogênio e trealose, baixa produção de glicerol e alto rendimento em etanol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características e Parâmetros de Operação dos Processos Estudados

CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOL

Tem uma unidade de fermentação constituída de um processo contínuo, adaptado de um batelada preexistente, composto de duas linhas de fermentação com 4 estágios, sistema de agitação mecânico e trocadores de calor externos tipo placa.

UNIALCO S.A. ÁLCOOL E AÇÚCAR

Conta com um sistema de fermentação tipo batelada alimentada, composto por 10 dornas de 300m^3 com trocadores externos de calor compartilhados para cada duas dornas.

DIANA DESTILARIA DE ÁLCOOL NOVA AVANHANDAVA LTDA

Possui um sistema de fermentação contínua constituído por dois reatores tipo torre de 200m^3 , ligados em série, e um tanque final de 150m^3 com agitação mecânica. Os reatores têm trocadores de calor externos a placas. Na safra 95/96, a separação das células foi realizada por decantação e, na safra 99/00, por decantação e por separadoras centrífugas.

Os principais parâmetros de operação dos processos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Principais parâmetros de operação das unidades de fermentação.

Parâmetros de Operação	Clealco	Unialco	Diana	
			95/96	99/00
Matéria-prima	Caldo tratado	Caldo tratado	Caldo tratado	Caldo tratado + mel de baixo esgotamento
Temperatura (°C)	33,0 – 36,0	34,0 – 37,0	37,0 (média)	37,0 (média)
Concentração de etanol no vinho (°GL)	8,0	8,0	8,5	8,5
Concentração de células nas dornas (%v/v)	16	10	45	45
pH do tratamento ácido	2,2	2,5	3,0	3,0
Tempo de tratamento ácido (h)	1,5	2,0	1,2	1,2
Tempo de fermentação (h)	4,5 (média)	8,0 (média)	3,0 – 3,5	3,0 – 3,5

3.2 Isolamento dos Microrganismos

Foram utilizadas cepas isoladas de três unidades industriais de fermentação alcoólica. Essas indústrias apresentam diferenças significativas de processo e estratégias de partida (Tabela 5). As leveduras da maior parte desses processos foram isoladas durante as safras 95/96, 96/97, 97/98 por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP.

As amostras de vinho levedurado foram coletadas mensalmente durante o período de safra, de modo que o número total de coletas variou conforme o número de meses de moagem, para cada unidade estudada. Estas amostras foram submetidas à diluição serial e plaqueadas em duplicata no meio diferencial para leveduras WLN (DIFCO 0424), adicionado de antibiótico (100ppm) para inibição das bactérias. A técnica "spread plate" foi utilizada no plaqueamento. As placas foram incubadas a 32°C por sete dias para seleção das cepas que apresentaram contagem populacional acima de 10^6 UFC/ml. As cepas foram diferenciadas segundo os seguintes atributos de morfologia das colônias: tamanho, padrão de cores, aspecto da superfície e contorno. Para a safra 99/00 da destilaria Diana, foram selecionadas três colônias representantes de cada padrão morfológico

apresentado em WLN. Desta maneira, pôde-se avaliar a eficiência do meio diferencial WLN na distinção de cepas de levedura.

Tabela 5 – Estratégias de partida das unidades industriais nas safras pesquisadas.

Indústria	Safra	Estratégia de partida
Clealcol	96/97	Cepas isoladas do próprio processo
	97/98	
Diana	95/96	Fermento comercial
	99/00	Cepas isoladas do próprio processo
Unialco	97/98	Fermento comercial

3.3 Teste de Potencial Fermentativo

A avaliação do potencial fermentativo (Andrietta et al., 1995) é realizada pela determinação dos rendimentos em: etanol ($Y_{P/S}$), células ($Y_{X/S}$), glicerol ($Y_{G/S}$) e ácidos orgânicos ($Y_{Ac/S}$), todos em relação à massa de glicose (GLI) consumida. Os rendimentos e a relação glicose residual/glicose consumida determinam as características fermentativas das cepas.

Obtenção dos Rendimentos

Os valores de rendimento foram obtidos através de balanço de massa de fermentações conduzidas, em triplicata, em Erlenmeyers de 250ml de capacidade contendo 100ml do meio de fermentação: glicose 15%; fosfato de potássio 0,5%; cloreto de amônio 0,5%; sulfato de magnésio 0,1%; cloreto de potássio 0,1%;

extrato de levedura 0,6%; água destilada (qsp) 1000ml; pH 6,0. O inóculo foi produzido pela suspensão, em água estéril, de células crescidas por 24 horas em agar inclinado de PDA e utilizado num volume de 10%, em relação ao volume do meio. Os frascos inoculados foram incubados a 32°C e 150rpm por 24 horas.

Foram realizadas as seguintes análises para obtenção dos rendimentos:

ART (meio de cultivo e vinho fermentado)

Foi utilizado o método enzimático da glicose-oxidase. O método baseia-se na oxidação da glicose catalisada pela enzima glicose oxidase. Esta reação é associada à redução do reativo cor (aminofenazona e fenol) com desenvolvimento de uma coloração rósea de intensidade proporcional à concentração de glicose na amostra. A determinação é realizada através de leitura em espectrofotômetro a 505nm. Para realização dos testes foi utilizado o kit para determinação de glicose da Laborlab S/A Produtos para Laboratórios.

Etanol (vinho fermentado)

Foi determinado em solução hidroalcoólica (50ml) obtida pela destilação de 25ml do vinho fermentado em microdestilador. O teor alcoólico foi determinado pelo método descrito por Salik & Povh (1993) que baseia-se na oxidação do etanol a ácido acético através da reação com dicromato de potássio, em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional a concentração de álcool na amostra. A determinação é realizada através de leitura em espectrofotômetro a 600nm.

Glicerol (vinho fermentado)

A metodologia empregada baseia-se no princípio da mudança de cor do reagente e leitura em espectrofotômetro (410nm). Para realização dos testes foi utilizado o kit para determinação de triglicerídeos da Laborlab S/A Produtos para Laboratórios.

Massa Celular (inóculo e vinho fermentado)

A massa celular produzida foi obtida por determinação do peso da amostra de vinho (20ml) ou inóculo (10ml) após secagem em estufa a 80°C, até peso constante. A amostra do vinho foi previamente centrifugada (4000rpm por 5

minutos) e ressuspensa em água destilada em três ciclos sucessivos, para eliminação de contaminantes superficiais (açúcares, sais, etc).

Acidez (meio de cultivo e vinho fermentado)

Foi medida por titulação, a 70°C, do vinho fermentado para pH 7,0 com NaOH 0,1 N padronizada utilizando fenolftaleína como indicador (AOAC, 1997).

Os rendimentos foram calculados segundo as equações:

$$GLI = \frac{M_M \times C_{SM}}{d_M} - \frac{M_V \times C_{SV}}{d_V} = GLI_I - GLI_F$$

onde:

GLI = massa de glicose consumida (g)

GLI_I = massa inicial de glicose (g)

GLI_F = massa final de glicose (g)

M_M = massa no mosto (g)

M_V = massa no vinho (g)

C_{SM} = concentração de substrato no mosto (g/ml)

C_{SV} = concentração de substrato no vinho (g/ml)

d_M = densidade do mosto (g/ml)

d_V = densidade do vinho (g/ml)

$$Y_{P/S} = \frac{\frac{M_V \times C_{EV} \times d_E}{d_V \times 100}}{GLI} = \frac{ETOH}{GLI}$$

onde:

$Y_{P/S}$ = rendimento em etanol (g etanol/g substrato)

ETOH = massa de etanol produzido (g)

M_V = massa de vinho (g)

C_{EV} = concentração de etanol no vinho (ml/100ml)

d_E = densidade do etanol (0,79g/ml)

d_V = densidade do vinho (g/ml)

$$Y_{X/S} = \frac{\frac{M_V \times C_{XV}}{d_V} - \frac{M_I \times C_{XI}}{d_I}}{GLI} = \frac{MX}{GLI}$$

onde:

$Y_{X/S}$ = rendimento em células (g massa seca/g substrato)

MX = massa de celular produzida (g)

M_V = massa de vinho (g)

d_V = densidade do vinho (g/ml)

C_{XV} = concentração de células do vinho (massa seca em g)

M_I = massa seca do inóculo (g)

d_I = densidade do inóculo (g/ml)

C_{XI} = concentração de células do inóculo (massa seca em g)

$$Y_{G/S} = \frac{\frac{M_V \times M_{GV}}{d_V}}{GLI} = \frac{GROL}{GLI}$$

onde:

$Y_{G/S}$ = rendimento em glicerol (g glicerol/g substrato)

GROL = massa de glicerol produzida (g)

M_V = massa de vinho (g)

M_{GV} = massa de glicerol no vinho (g)

d_V = densidade do vinho (g/ml)

$$Y_{Ac/S} = \frac{\frac{M_V \times M_{AcV}}{d_V} - \frac{M_M - M_{AcM}}{d_M}}{GLI} = \frac{ACID}{GLI}$$

onde:

$Y_{Ac/S}$ = rendimento em ácidos (g ácidos/g substrato)

ACID = massa de ácidos produzida (g)

M_V = massa de vinho (g)

M_{AcV} = massa ácidos no vinho (g)

d_V = densidade do vinho (g/ml)

M_M = massa do mosto (g)

M_{AcM} = massa de ácidos no mosto (g)

d_M = densidade do mosto (g/ml)

Os valores de rendimento de cada produto (etanol, células, glicerol e ácidos) e a relação entre glicose residual e glicose consumida obtidos pela cepa testada são comparados aos alcançados por uma cepa de referência, que possui um

desempenho médio dentre as utilizadas normalmente nas destilarias brasileiras. Os valores de desempenho da cepa de referência são médias de dezenas de dados obtidos empiricamente. Essa comparação produz os fatores para a produção de etanol (FE), glicerol (FG), ácidos (Fac), massa celular (FC) e consumo de açúcar (FR), conforme as equações descritas a seguir. Nessas equações os valores obtidos para as linhagens são indicados com a letra *t* e os da linhagem controle são indicados com a letra *c*.

$$F = \frac{Y_t - Y_c}{Y_c}$$

$$FR = \frac{GLI_c - GLI_t}{GLI_c} \times 100$$

Cada um dos fatores recebe um peso na constituição do índice geral, o potencial fermentativo (PF), de acordo com sua importância:

$$PF = 10 \times FE + 5 \times FR + 2 \times FC + 1 \times FG + 0,25 \times Fac$$

A variação permitida, entre as repetições, para cada um dos fatores é função do grau de precisão das técnicas de análise envolvidas. Os valores de tolerância para $Y_{P/S}$, R_t , $Y_{X/S}$, $Y_{G/S}$ e $Y_{Ac/S}$ são 5%, 5%, 5%, 10% e 15%, respectivamente.

Resultados próximos de zero indicam que a cepa tem características adequadas para os processos de fermentação. Resultados positivo e negativo indicam que o desempenho da cepa testada é superior e inferior, respectivamente, que o da cepa referência.

Uma faixa de variação +100 a -100 no valor do potencial fermentativo indica que a cepa testada tem capacidade fermentativa semelhante à da cepa referência. A amplitude da faixa de variação aceita é determinada pelos pesos dos fatores utilizados na elaboração do potencial fermentativo.

3.4 Classificação pelo Teste da Capacidade Fermentativa

Os índices de desempenho apurados a partir das fermentações realizadas para determinação do Potencial Fermentativo e valores de $\mu_{\max}$ são utilizados na classificação dos isolados pelo sistema da Capacidade Fermentativa (Andrietta et al., 1999).

Cada um dos seis valores de desempenho obtidos recebe uma pontuação (1, 2 ou 3), de acordo com os níveis pré-estabelecidos nesse sistema (Tabela 6). Ao final, obtém-se um código de classificação composto de seis dígitos que identifica o isolado de acordo com seu grupo de desempenho.

Tabela 6 – Pontuação e limites das faixas de variação dos parâmetros utilizados na classificação das leveduras (Andrietta et al., 1999).

Dígito	Parâmetro	1 (Alto)	2 (Médio)	3 (Baixo)
Primeiro	$Y_{x/s}$ (gMS/gSubst)	> 0,044	0,041 a 0,044	< 0,041
Segundo	VCS (gSubst/Lxh)	> 5,7	5,2 a 5,7	< 5,2
Terceiro	NCO (%)	> 98,5	90 a 98,5	< 90
Quarto	$\mu_{\max}$ (1/h)	> 0,55	0,45 a 0,55	< 0,45
Quinto	PROD (gEt/Lxh)	> 2,4	2,2 a 2,4	< 2,2
Sexto	$Y_{p/s}$ (gEt/gSubst)	> 0,45	0,45 a 0,42	< 0,42

Uma cepa controle é avaliada em conjunto com cada grupo de leveduras testado. Os parâmetros de desempenho obtidos em cada fermentação para a cepa controle e para as cepas testadas são corrigidos para uma mesma base de

cálculo, por comparação com valores definidos para a cepa controle, obtidos empiricamente (Tabela 7). Deste modo pode-se corrigir variações não controladas que possam ocorrer nos ensaios.

Tabela 7 – Valores de referência da base de cálculo dos parâmetros utilizados na classificação das leveduras por desempenho.

Parâmetro	Valor de Referência
Rendimento em células ($Y_{x/s}$ - gMS/gSubst)	0,04
Velocidade de consumo de substrato (VCS - gSubst/Lxh)	5,8
Nível de conversão de substrato (NCO - %)	99,5
Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} - 1/h)	0,5
Produtividade (PROD - gEt/Lxh)	2,5
Rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ - gEt/gSubst)	0,46

Os parâmetros velocidade de consumo de substrato, nível de conversão de substrato e produtividade são calculados segundo as equações:

$$VCS = \frac{GLI}{m_M \times t_F}$$

onde:

VCS = velocidade de consumo de substrato (g substrato/gxh)

GLI = massa de glicose (g)

m_M = massa de meio (g)

t_F = tempo de fermentação (h)

$$NCO = \frac{GLI_i - GLI_f}{GLI_i}$$

onde:

NCO = nível de conversão de substrato (%)

GLI_i = massa inicial de glicose (g)

GLI_f = massa final de glicose (g)

$$PROD = \frac{ETOH}{V_M \times t_F}$$

onde:

PROD = produtividade (g etanol/Lxh)

ETOH = massa de etanol (g)

V_M = volume do meio (L)

T_F = tempo de fermentação (h)

Obtenção da Velocidade Específica Máxima de Crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

A cinética de crescimento de microrganismos foi acompanhada pela determinação da massa celular produzida, avaliada por medição da D.O. a 600nm, durante a fermentação de meio de cultivo sintético: glicose 4%; fosfato de potássio 0,5%; cloreto de amônio 0,5%; sulfato de magnésio 0,1%; cloreto de potássio 0,1%; extrato de levedura 0,6%; água destilada (qsp) 1000ml; pH 6,0.

As fermentações foram conduzidas, em duplicata, em Erlenmeyers de 250ml de capacidade contendo 100ml do meio de fermentação. O inóculo (10% do volume do meio) para essa determinação foi obtido pela suspensão em água estéril de células crescidas por 24 horas em agar inclinado de PDA. Os frascos inoculados foram incubados a 32°C e 150rpm e as amostras retiradas a cada meia hora.

O valor de $\mu_{\text{máx}}$ é correspondente ao coeficiente angular da curva tempo versus $\ln \frac{X}{X_0}$, na fase exponencial de crescimento.

3.5 Taxonomia Numérica

Os isolados foram identificados segundo a taxonomia numérica proposta por Griffiths (1981).

Procedimentos para realização dos testes:

Inóculo – 0,05ml da suspensão de leveduras incubada por 24 horas a 32°C em YEPD (extrato de levedura 1%; peptona 2%; dextrose 2%).

Testes de assimilação e fermentação de açúcares – os açúcares foram dissolvidos em uma solução basal (sulfato de amônio 0,5%; fosfato de potássio monobásico 0,1%; sulfato de magnésio 0,05%) na concentração de 2%, exceto para rafinose cuja concentração no teste é de 4%. Para cada levedura foi inoculado um tubo contendo solução basal sem açúcar para eliminar a possibilidade de resultado falso-positivo devido a presença de resíduo do inóculo. As leituras foram realizadas com 24, 48 e 72 horas de incubação a 32°C.

Teste de assimilação de nitrato – a levedura foi inoculada em solução basal para nitrato (sulfato de amônio 0,5%; fosfato de potássio monobásico 0,1%; sulfato de magnésio 0,05%; nitrato de potássio 0,1%; agar 1,7%) e incubada por 48 horas a 32°C. Ao final do período de incubação foram adicionadas 3 gotas da solução A (N,N dimetil-naptil-amino 0,6%; ácido acético 5M) e 3 gotas da solução B (ácido sulfanílico 0,8%; ácido acético 5M). O desenvolvimento de cor rósea indica utilização do nitrato. Em caso negativo, pó de zinco é adicionado e o aparecimento de coloração rósea indica a redução do nitrato não utilizado pela levedura.

Teste de crescimento em alta concentração osmótica – a levedura foi inoculada em solução de NaCl 10% (extrato de levedura 1%; peptona 2%; dextrose 2%; cloreto de sódio 10%) e em solução de glicose 50% (sulfato de amônio 0,5%; fosfato de potássio monobásico 0,1%; sulfato de magnésio 0,05%; glicose 50%).

Teste de hidrólise de amido – a levedura foi inoculada e repicada em meio de amido (amido 2%; extrato de levedura 1%; peptona 1%; agar 15%). O período de incubação é de 24-48 horas a 32°C. O aparecimento de halo transparente ao redor da colônia, após a adição de Lugol, na placa de repique indica a hidrólise do amido.

Teste de crescimento a 37°C – a levedura foi inoculada em YEPD e incubada por 24-48 horas a 37°C.

Teste de forma celular – a levedura foi inoculada em meio de extrato de malte (extrato de malte 0,6%; maltose 0,6%; dextrose 0,6%; extrato de levedura 0,12%) e incubada por 24 horas a 32°C.

Todos os testes foram realizados em duplicata. Todas as soluções de açúcar foram esterilizadas em tempo reduzido (3 minutos a 121°C).

Tabela 8 – Caracteres usados na obtenção dos códigos numéricos das espécies de levedura.

	Teste	Valor	Dígito
Assimilação e crescimento	Maltose	4	Primeiro
	Galactose	2	
	Lactose	1	
	Nitrato	4	Segundo
	Eritritol	2	
	Amido	1	
	Ribitol	4	Terceiro
	37°C	2	
	Glicose 50%/NaCl 10%	1	
Fermentação	Sacarose	4	Quarto
	Galactose	2	
	Glicose	1	
Assimilação e crescimento	Sacarose	4	Quinto
	Inositol	2	
	Celobiose	1	
	Rafinose	4	Sexto
	Manitol	2	
	Melibiose	1	
Fermentação	Lactose	4	Sétimo
Assimilação	Xilose	2	
----	Células alongadas	1	

3.6 Cariotipagem

O material celular foi obtido de colônias de levedura crescidas em placas de YEPD por 5 dias a 32°C. Essas placas foram inoculadas com culturas puras de leveduras preservadas em PDA, cobertas com óleo mineral e mantidas sob refrigeração. As cepas de leveduras foram caracterizadas por análise cromossômica utilizando a técnica CHEF de eletroforese de pulso em gel de agarose, adaptada¹ do descrito por Blondin & Vezinhét (1988). O material celular foi suspenso em 40µl de

¹ Adaptação realizada pelo professor Dr. Luiz Carlos Basso do Departamento de Ciências Biológicas da Esalq/USP.

tampão CPES (ácido cítrico 0,84%; Na_2HPO_4 1,7%; EDTA.Na_2 0,745%; sorbitol 22,52%; dithiothreitol 0,08%) contendo 6,67 mg/ml de Lysing Enzyme (Sigma L-1412), para digestão enzimática da parede celular. A suspensão foi realizada nos moldes plásticos para plugs e imediatamente adicionada de solução de agarose LE (Sigma) 1,35% em tampão CPE (ácido cítrico 0,84%; Na_2HPO_4 1,7%; EDTA.Na_2 0,745%). As amostras solidificadas em agarose (plugs) foram retiradas dos moldes e incubadas a 28°C por 4 horas em 1ml de tampão CPE. O tampão CPE foi retirado e adicionou-se às amostras 400µl da solução 3 (EDTA.Na_2 16,75%; tris 0,12%; lauril sulfato de sódio 1,0%; pH 9,0) contendo 0,8 mg/ml de Proteinase K (Sigma P-6556) para digestão das proteínas e lipoproteínas. As amostras foram incubadas a 50°C por 16 horas. Para as amostras que seriam estocadas, a solução de desproteinização foi removida e substituída por 1ml de solução de EDTA (EDTA.Na_2 18,62%; pH 8,0). As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento do uso. As amostras que seriam submetidas à eletroforese foram lavadas, 3 vezes por 20 minutos a 50°C e 5 vezes por 15 minutos em temperatura ambiente, com 1ml de tampão TE (tris 0,12%; EDTA ácido 0,029%; pH 8,0). O gel foi preparado com agarose LE (Sigma) 1,35% em tampão TAFE 1:20 (tris 2,42%; EDTA 0,29%; ácido acético glacial 0,5%). A eletroforese foi conduzida em aparelho CHEF III® da Bio-Rad. As condições de eletroforese foram: ângulo 120°; gradiente de voltagem 6V/cm; 14,0°C; tampão TAFE 1:20; tempo de pulso de 5 segundos por 1 hora (os cromossomos migram juntos dos plugs para o gel), seguido de 60 segundos por 8 horas (migram somente os cromossomos menores) e, finalmente, 100 segundos por 12 horas (migram somente os cromossomos maiores). O gel foi revelado por imersão em solução de brometo de etídio 0,5µg/ml de tampão TAFE durante 40 minutos e lavado em água por cerca de meia hora. O gel corado foi observado e fotografado sob luz ultra-violeta e examinado quanto o número, posição e espessura das bandas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O plaqueamento mensal de amostras de vinho levedurado na superfície de WLN resultou no isolamento de um total de 122 leveduras, em concentração superior a 10^6 UFC/ml, nas 5 safras acompanhadas (Tabela 9).

As 122 leveduras isoladas foram submetidas à avaliação do desempenho, segundo a metodologia do "Potencial Fermentativo" (Andrietta et al., 1995), e foram classificadas pelo sistema "Capacidade Fermentativa" (Andrietta et al., 1999), que também baseia-se em parâmetros de desempenho.

Do total dos isolados de cada coleta, da destilaria Clealco, Unialco e Diana safra 95/96, foram selecionados aqueles que apresentaram participação populacional acima de 10% para identificação taxonômica (Griffiths, 1981) e para realização de cariotipagem eletroforética (Blondin & Vézinhét, 1988). Dessa maneira, o objetivo foi identificar e acompanhar a dinâmica populacional das leveduras dominantes ao longo da safra.

Para a destilaria Diana, safra 99/00, foram isoladas 3 colônias de cada tipo morfológico distinto nas coletas 2 a 6, para avaliar a eficiência do meio WLN na diferenciação de cepas de levedura. Todos os isolados foram submetidos à avaliação do desempenho fermentativo. A identificação taxonômica e a cariotipagem foram realizadas no inóculo e em todas as leveduras isoladas nas coletas 2, 4 e 6. Neste caso, o objetivo foi acompanhar a dinâmica de populações dominantes e também avaliar o grau de diferenciação de cepas proporcionado pelo meio de cultivo diferencial WLN, por comparação com as características de desempenho, perfil de consumo de fontes de carbono e cariotipagem.

Tabela 9 – Total de leveduras isoladas em cada coleta para cada safra estudada.

Indústria/Safra	Coleta	Número de Isolados
Clealco 95/96	Inóculo	1
	1	3
	2	1
	3	1
	4	2
	5	3
	6	3
	7	1
Clealco 96/97	Inóculo	1
	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
	5	1
	6	2
	7	2
Unialco 97/98	8	2
	1	1
	2	3
	3	1
	4	3
	5	3
	6	3
Diana 95/96	7	2
	1	2
	2	4
	3	7
	4	5
	5	3
Diana 99/00 ⁽¹⁾	6	5
	Inóculo	1
	1	3
	2	9 ¹
	3	9 ¹
	4	9 ¹
	5	9 ¹
	6	9 ¹
Total	---	122

¹ Três isolados para cada tipo morfológico de colônia.

4.1. DESTILARIA CLEALCO

4.1.1. SAFRA 95/96

4.1.1.1 Leveduras Isoladas

Foi isolado um total de 15 leveduras na safra 95/96 da destilaria Clealco (Tabela 10). A destilaria utilizou como inóculo, na partida da safra, uma cepa isolada do próprio processo no final da safra anterior.

Tabela 10 – Participação populacional (%) das leveduras isoladas na safra 95/96 da destilaria Clealco.

Coleta	Isolado	Concentração (UFC/ml)	Participação Populacional (%)
Inóculo	01	---	100,0
1	02	$2,0 \times 10^8$	97,56
	03	$3,0 \times 10^6$	1,46
	04	$2,0 \times 10^6$	0,98
2	05	$1,2 \times 10^8$	100,0
3	06	$7,5 \times 10^8$	100,0
4	07	$1,6 \times 10^9$	98,76
	08	$2,0 \times 10^7$	1,24
5	09	$1,0 \times 10^9$	95,24
	10	$1,0 \times 10^7$	0,95
	11	$4,0 \times 10^7$	3,81
6	12	$1,1 \times 10^9$	64,71
	13	$5,0 \times 10^8$	29,41
	14	$1,0 \times 10^8$	5,88
7	15	$1,3 \times 10^9$	100,0

Com exceção da 6ª coleta, todas as amostragens revelaram a presença de um único isolado dominante de participação populacional superior a 95,2% (Tabela 10). Na 6ª coleta, os isolados 12 e 13 apresentaram participação populacional alta, de 64,7 e 29,4%, respectivamente. Essa coleta ocorreu durante o período da safra em que é processada grande quantidade de cana-de-açúcar proveniente de “áreas de sacrifício”. Estas áreas recebem irrigação de vinhaça acima do recomendado. A cana-de-açúcar dessas áreas caracteriza-se pelo aumento do teor de sólidos solúveis e diminuição da pol (Silva et al., 1976).

Na 7ª e última coleta foi isolada somente uma levedura demonstrando a retomada do equilíbrio microbiológico pelo processo.

4.1.1.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance

A avaliação do potencial fermentativo demonstrou que 12 dos 15 isolados apresentaram bom desempenho fermentativo e todas as leveduras dominantes de cada coleta pertencem a essa categoria (Tabela 11).

Apesar de ter apresentado um rendimento em etanol alto (0,4537g etanol/g substrato consumido), o isolado 03 mostrou potencial fermentativo baixo (-69991,6), já que não foi capaz de consumir toda a glicose e também revelou um rendimento em glicerol acima da média. O isolado 10 também teve rendimento em etanol alto (0,4658g etanol/g substrato consumido) e potencial fermentativo baixo (-2292,9), neste caso causado pelo baixo consumo de glicose e altas produções de glicerol e de ácidos (Tabela 11).

Das 3 leveduras (3, 10 e 13) que apresentaram potencial fermentativo desfavorável (de -352,7 a -6.991,6), somente o isolado 13 foi capaz de ameaçar o processo, já que atingiu uma concentração de 29,41% do total de isolados da amostra (Tabela 10) e mostrou um rendimento em etanol baixo (0,3823g etanol/g substrato consumido). Os resultados indicam que a moagem de cana-de-açúcar de “área de sacrifício” pode desequilibrar o processo fermentativo e, assim,

favorecer o desenvolvimento de cepas de levedura de baixo desempenho fermentativo.

Tabela 11 – Valores de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido), rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), rendimento em ácidos ($Y_{ac/s}$ – g ácido/g substrato consumido), rendimento em glicerol ($Y_{g/s}$ – g glicerol/g substrato consumido), relação ART residual/ART consumido (R_r – g açúcar residual/g açúcar consumido) e Potencial Fermentativo (PF) dos isolados de levedura da destilaria Clealco (safra 95/96) e cepa padrão.

Isolado	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{g/s}$	R_r	PF
Padrão	0,4600	0,0400	0,0080	0,0450	0,0100	0
01 ⁱⁿ	0,4562	0,0377	0,0084	0,0437	0,0422	-11,55
02	0,4636	0,0368	0,0088	0,0461	0,0723	-12,39
03	0,4537	0,0355	0,0085	0,0555	13,961	-6991,60
04	0,4710	0,0368	0,0080	0,0446	0,1204	-14,54
05	0,4755	0,0386	0,0068	0,0435	0,0036	50,88
06	0,4577	0,0373	0,0079	0,0385	0,0027	26,79
07	0,4755	0,0394	0,0079	0,0385	0,0053	53,67
08	0,4643	0,0393	0,0088	0,0380	0,0059	27,93
09	0,4542	0,0396	0,0080	0,0446	0,0020	-5,94
10	0,4658	0,0401	0,0116	0,0572	4,5430	-2292,93
11	0,4698	0,0392	0,0090	0,0421	0,0123	27,58
12	0,4546	0,0387	0,0073	0,0381	0,0030	15,81
13	0,3823	0,0285	0,0103	0,0450	0,4785	-352,73
14	0,4667	0,0403	0,0080	0,0453	0,0026	15,92
15	0,4676	0,0382	0,0077	0,0448	0,0056	28,90

ⁱⁿ inóculo

Os 15 isolados de levedura da safra 95/96 foram classificados pela capacidade fermentativa (Andrietta et al., 1999) em apenas 4 grupos (Tabela 12). As leveduras dominantes de todas as coletas e todas as demais que apresentaram boa

performance fermentativa (Tabelas 11 e 12) foram classificadas no mesmo grupo, 311.211. Migliari (2001), utilizando a mesma técnica, isolou leveduras desse grupo entre os dois grupos que mais dominaram a fermentação de unidade industrial. Este grupo é caracterizado por alto rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e elevados velocidade de consumo de substrato (VCS), nível de conversão de substrato (NCO) e produtividade (PROD). Este é um dos grupos mais comuns nas destilarias de álcool brasileiras (Andrietta et. al., 1999).

Os isolados que apresentaram baixo potencial fermentativo (03, 10 e 13) foram classificados em grupos distintos. As leveduras de características fermentativas desfavoráveis são oportunistas que estão presentes no processo em concentrações baixas, como observado para os isolados 03 e 10. Problemas operacionais podem favorecer o desenvolvimento dessas leveduras oportunistas, como observado para o isolado 13, e determinar a queda de rendimento/produtividade da fermentação. A presença de leveduras de performance fermentativa fraca com participação populacional acima de 10% pode ser um indicativo de problemas no processo.

Todas as leveduras isoladas possuem rendimento em células baixo (0,0285 a 0,0403g massa seca/g substrato consumido). Estes valores são adequados a processos nos quais a perda de células é baixa, como na destilaria Clealco. Leveduras de alto rendimento em células provocam o aumento de volume de creme de levedura, que implica no aumento de volume de vinho bruto. Consequentemente, há necessidade de maior número de separadoras centrífugas em operação e aumenta o consumo de ácido sulfúrico no tratamento ácido. O excesso de células no processo pode ser evitado pelo descarte direto na vinhaça ou pelo envio para destilação, com prejuízos nos dois casos: perda de etanol e aumento de ocorrência de incrustações nos aparelhos de destilação, respectivamente. O excesso de massa celular só deixa de significar prejuízos com a implantação de unidades de secagem de levedura para produção de ração.

Tabela 12 – Valores de rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), velocidade de consumo de substrato (VCS – g substrato/l/h), nível de conversão de substrato (NCO - %), velocidade específica máxima de crescimento (μ_m – l/h), produtividade (PROD – g etanol/l/h) e rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido) das leveduras isoladas na safra 95/96 da destilaria Clealco.

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_m	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
01 ⁱⁿ	0,0377	5,80	99,47	0,55	2,48	0,4562	311.211
02	0,0368	5,80	99,45	0,49	2,52	0,4636	311.211
03	0,0355	5,18	88,85	0,46	2,18	0,4537	323.221
04	0,0368	5,79	99,41	0,50	2,56	0,4710	311.211
05	0,0386	5,84	100,0	0,52	2,60	0,4755	311.211
06	0,0373	5,84	100,0	0,48	2,51	0,4577	311.211
07	0,0394	5,83	100,0	0,50	2,60	0,4755	311.211
08	0,0393	5,83	99,96	0,52	2,54	0,4643	311.211
09	0,0396	5,80	99,54	0,53	2,47	0,4542	311.211
10	0,0401	4,65	79,83	0,55	2,00	0,4658	333.221
11	0,0392	5,80	99,49	0,54	2,55	0,4698	311.211
12	0,0387	5,80	99,54	0,55	2,47	0,4546	311.211
13	0,0285	5,66	97,03	0,53	1,99	0,3823	322.233
14	0,0403	5,80	99,52	0,49	2,54	0,4667	311.211
15	0,0382	5,80	99,51	0,48	2,54	0,4676	311.211

ⁱⁿ inóculo

4.1.1.3 Identificação Taxonômica

Nove dos quinze isolados de levedura da safra 95/96 da destilaria Clealco apresentaram participação populacional acima de 10% (Tabela 10) e foram selecionados para identificação taxonômica (Griffiths, 1981).

O inóculo da safra e os isolados dominantes de todas as coletas foram classificados como *Saccharomyces coreanus* (Tabela 14 e Figura 2). Somente o isolado 13 obteve uma classificação diferente, *S. cerevisiae*. Os dois grupos de isolados apresentaram perfis de consumo de açúcares semelhantes, variando

apenas na assimilação de maltose por *S. cerevisae* e não assimilação por *S. coreanus* (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados dos testes para identificação taxonômica dos isolados de leveduras da destilaria Clealco, safra 95/96.

Isolado	Maltose ^A	Galactose ^A	Lactose ^A	Nitrato ^A	Eritritol ^A	Amido ^H	Ribitol ^A	37°C	Glic/NaCl	Sacarose ^F	Galactose ^F	Glicose ^F	Sacarose ^A	Inositol ^A	Celobiose ^A	Rafinose ^A	Manitol ^A	Melibiose ^A	Lactose ^F	Xilose ^A	Cél. Along.
01	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
02	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
05	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
06	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
07	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
09	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
12	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
13	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
15	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

^A Assimilação; ^F Fermentação; ^H Hidrólise.

Tabela 14 – Identificação taxonômica dos isolados dominantes da destilaria Clealco, safra 95/96.

Isolado	Código Numérico de Identificação	Espécie
01	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
02	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
05	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
06	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
07	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
09	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
12	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
13	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
15	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>

Pela classificação atual de leveduras (Kreger-van Rij, 1984 e Barnett et al., 1990) a espécie *S. coreanus* foi incluída em *S. cerevisiae*, que apresenta consumo variável para maltose. Kuhle & Jespersen (1998) isolaram de cervejaria linhagens de *S. cerevisiae* não consumidoras de maltose.

A literatura relata o gênero *Saccharomyces* como um dos mais comumente encontrados na fermentação alcoólica para produção de etanol (Castro, 1995). Em Cabrini & Gallo (1999a e 1999b) representantes do gênero *Saccharomyces* constituíram 85,7 e 88,3%, respectivamente, do total de leveduras isoladas de fermentações alcoólicas. Porém, apenas 5,9% das leveduras presentes no leite de levedura foram identificadas como *S. coreanus*, enquanto 41,2% foram identificadas como *S. cerevisiae*.

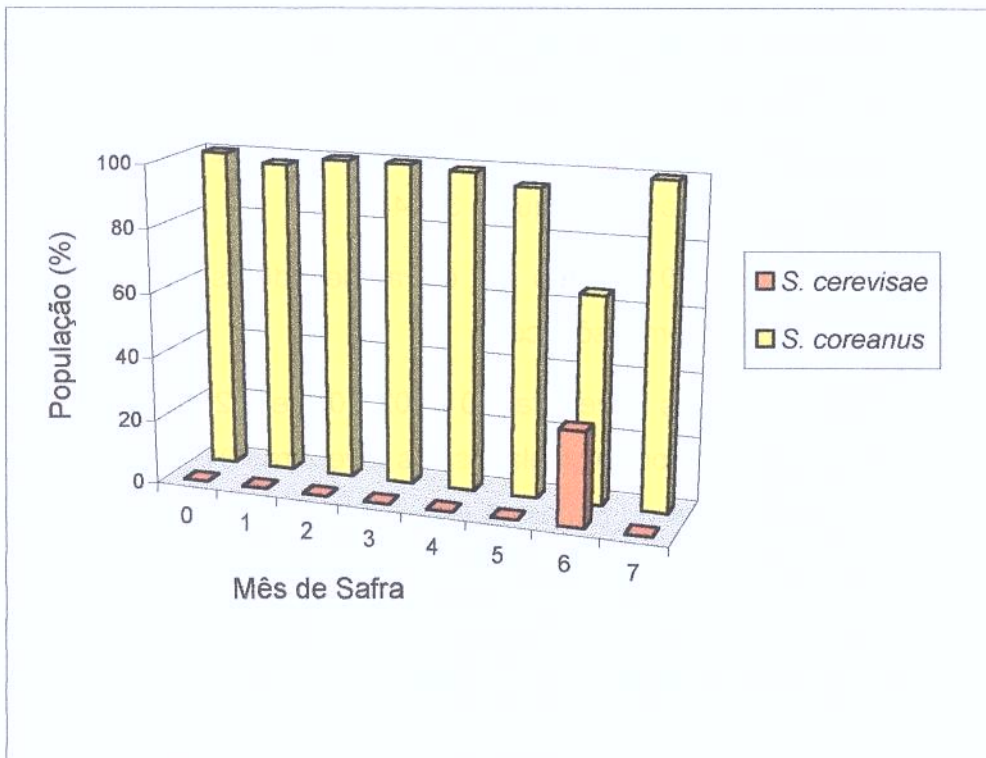


Figura 2 – Participação populacional (%) das espécies de levedura com concentração acima de 10% no vinho levedurado da destilaria Clealco, safra 95/96.

4.1.1.4 Cariotipagem

Os dez isolados que apresentaram participação populacional acima de 10% (Tabela 10) foram submetidos à cariotipagem eletroforética, segundo Blondin & Vézinhet (1988) modificado. Os perfis eletroforéticos das leveduras 01, 02, 05, 06, 07, 09, 12 e 15 são mostrados na Figura 3 e das leveduras 01 e 13, na Figura 4. Foram consideradas cepas de levedura diferentes aquelas que apresentaram padrões de bandas cromossômicas diferentes.

O padrão de bandas obtido para as leveduras analisadas (Figuras 3 e 4) inclui as amostras no grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus*) que se caracteriza por apresentar 12 a 17 bandas na cariotipagem eletroforética (Vaughan-Martini et al., 1993), já que nenhum outro grupo de leveduras possui tantos cromossomos (De Jonge et al., 1986; Johnston & Mortimer, 1986; Casey et al., 1990; Sheehan et al., 1997). Algumas pesquisas têm demonstrado que a espécie *S. cerevisiae* apresenta um perfil eletroforético de 12 a 14 bandas (Cardinali & Martini, 1994; Guillamón et al., 1994). Esses trabalhos confirmam a classificação dos isolados de levedura da safra 95 da destilaria Clealco como representantes da espécie *S. cerevisiae* (Barnett, et al. 1990), pelos resultados obtidos na cariotipagem (Figuras 3 e 4).

Tanto o inóculo (levedura 01) como as outras leveduras da safra analisada mostraram o mesmo perfil cromossômico.

Os padrões de bandas das leveduras 01, 02, 09 e 12 mostram pequenas variações em relação aos dos outros isolados. As leveduras 01 e 02 apresentam as bandas 6 e 7 muito próximas ou juntas. A levedura 09 apresentou as bandas 9 e 10 mais afastadas. Nessa levedura, a banda 9 aparece em posições levemente diferentes indicando, possivelmente, a ocorrência de rearranjo cromossômico. A levedura 12 apresentou uma banda a mais, posicionada entre as bandas 3 e 4.

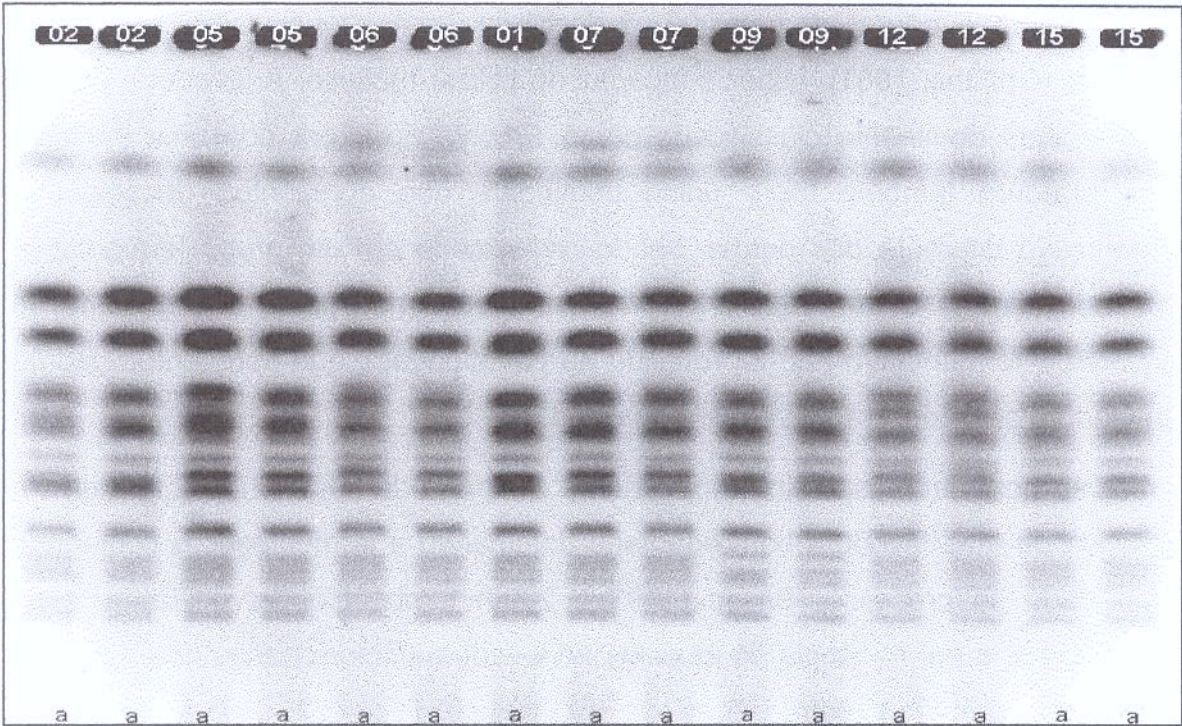


Figura 3 – Perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 95/96 da destilaria Clealco. Letras iguais indicam o mesmo perfil cromossômico.

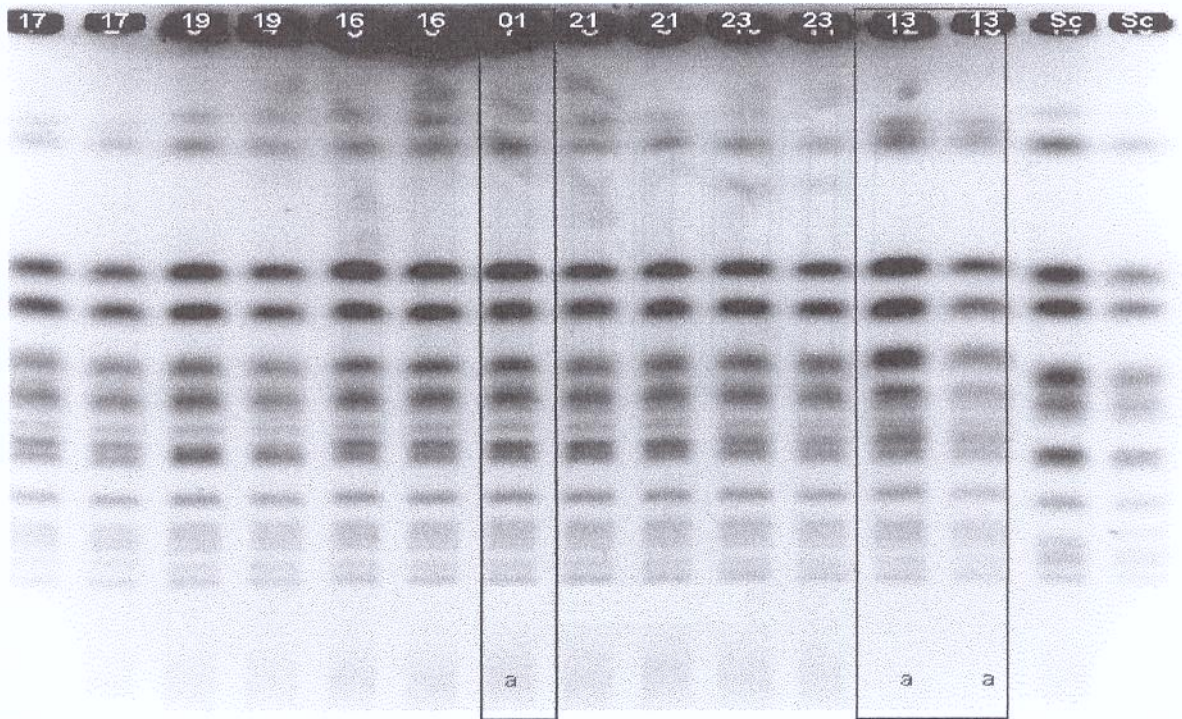


Figura 4 – As molduras mostram os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 95/96 da destilaria Clealco. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

A maioria das leveduras da safra 95 da destilaria Clealco foi classificada como *S. coreanus* (Griffiths, 1981), espécie incapaz de utilizar maltose. A levedura 13 foi o único isolado dominante classificado como *S. cerevisiae*, por consumir maltose. Essa levedura também foi a única dominante que apresentou desempenho fermentativo diferente das outras, sendo classificada em um grupo fermentativo distinto (Andrietta et al., 1999). Porém, a diferença nos perfis de consumo de açúcares e fermentativo não foi refletida na cariotipagem, que apresentou padrão semelhante para todas as leveduras analisadas.

O mesmo perfil cromossômico repetindo-se ao longo da safra (Figura 5) indica a presença de uma levedura bem adaptada dominando a fermentação e conferindo estabilidade ao processo. Basso (1993 e 2000) também observou, através da cariotipagem, a permanência de inóculos de leveduras selecionadas de processos industriais durante toda safra.

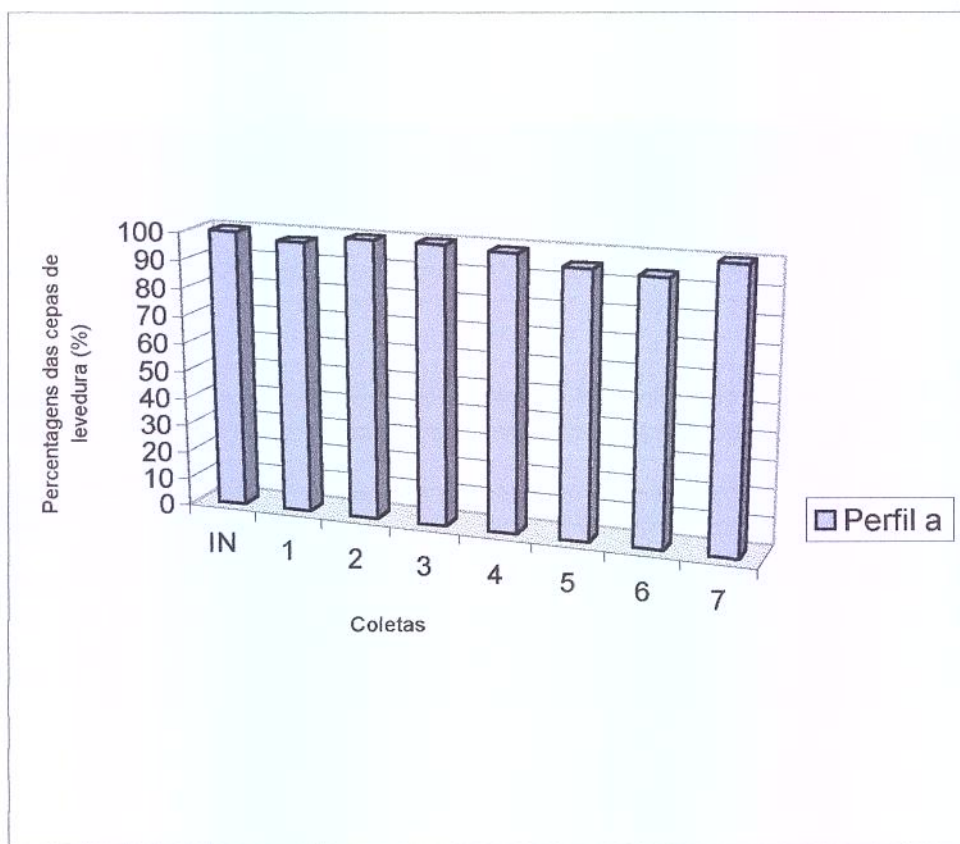


Figura 5 – Percentagens das cepas de levedura da destilaria Clealco ao longo da safra 95/96, segundo o perfil cromossômico.

4.1.2. SAFRA 96/97

4.1.2.1 Leveduras Isoladas

Foram 15 os isolados nas 8 coletas mensais realizadas na safra 96/97 da destilaria Clealco (Tabela 15). A unidade iniciou a fermentação com a levedura 15, isolada na safra anterior.

Tabela 15 – Leveduras isoladas na safra 96/97 da destilaria Clealco.

Coleta	Isolado	Concentração (UFC/ml)	Participação Populacional (%)
Inóculo	16	---	100,0
1	17	$1,3 \times 10^8$	99,2
	18	$1,0 \times 10^6$	0,8
2	19	$6,0 \times 10^8$	99,5
	20	$3,0 \times 10^6$	0,5
3	21	$3,0 \times 10^9$	99,8
	22	$5,0 \times 10^6$	0,2
4	23	$2,7 \times 10^8$	93,1
	24	$2,0 \times 10^7$	6,9
5	25	$4,0 \times 10^8$	100,0
6	26	$3,5 \times 10^8$	94,6
	27	$2,0 \times 10^7$	5,4
7	28	$1,6 \times 10^8$	80,0
	29	$4,0 \times 10^7$	20,0
8	30	$3,3 \times 10^8$	94,3
	31	$2,0 \times 10^7$	5,7

Como na safra anterior, somente um isolado de levedura dominou a fermentação em cada coleta, apresentando participação populacional alta (superior a 93,1%) em relação ao segundo isolado mais populoso, com exceção da 7ª coleta. Essa coleta também coincidiu com a época da safra de moagem de grande quantidade de matéria-prima cultivada em “área de sacrifício”, ou seja, que recebe irrigação de vinhaça acima do indicado. Na 7ª coleta, observou-se o mesmo perfil da safra 95/96 de queda da participação populacional do isolado dominante em relação a um segundo isolado, porém de maneira mais branda com 80,0 e 20, 0%, respectivamente.

Na 8ª coleta, também como na safra anterior, o equilíbrio microbiológico foi restabelecido e o isolado dominante voltou a apresentar uma participação populacional superior a 90% (94,3%).

4.1.2.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance

Doze dos 16 isolados apresentaram bom desempenho fermentativo com potenciais fermentativos adequados à utilização industrial (Tabela 16). As leveduras dominantes de todas as coletas pertencem a essa categoria.

Todos os isolados obtiveram rendimento em etanol alto (maior que 0,45g etanol/g substrato consumido), mesmo as leveduras 22, 24, 29 e 31 que apresentaram potenciais fermentativos baixos (-1374,6; -13797,9; -425,3; -10865,9; respectivamente). Para os isolados 22 e 24, o potencial fermentativo desfavorável está associado ao baixo consumo de glicose e altos rendimentos em glicerol e ácidos. O isolado 31 também não consumiu todo o substrato e produziu ácido acima da média, derrubando o potencial fermentativo (Tabela 16).

A levedura 29 foi o único isolado de baixo potencial fermentativo amostrado da fermentação numa concentração maior que 10% (20,0%). Este isolado obteve um potencial fermentativo de -425,2, causado pela presença de pouca glicose ao final da fermentação (Tabela 16). A presença dessa levedura em concentração elevada é indício de problemas na fermentação. Como na safra anterior, trata-se de uma

levedura oportunista favorecida pela moagem de cana-de-açúcar de "área de sacrifício".

Tabela 16 – Valores de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido), rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), rendimento em ácidos ($Y_{ac/s}$ – g ácido/g substrato consumido), rendimento em glicerol ($Y_{g/s}$ – g glicerol/g substrato consumido), relação ART residual/ART consumido (R_r – g açúcar residual/g açúcar consumido) e Potencial Fermentativo (PF) dos isolados de levedura da destilaria Clealco (safra 96/97) e cepa padrão.

Isolado	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{g/s}$	R_r	PF
Padrão	0,4600	0,0400	0,0080	0,0450	0,0100	0
16 ⁱⁿ	0,4637	0,0379	0,0081	0,0447	0,4563	1,15
17	0,4701	0,0372	0,0078	0,0440	0,0263	30,68
18	0,4634	0,0378	0,0082	0,0455	0,0034	20,03
19	0,4586	0,0382	0,0083	0,0457	0,0092	4,01
20	0,4625	0,0383	0,0078	0,0465	0,2060	-86,70
21	0,4561	0,0402	0,0079	0,0439	0,0025	-3,18
22	0,4787	0,0393	0,0115	0,0584	2,7658	-1374,60
23	0,4532	0,0392	0,0089	0,0454	0,0176	-18,46
24	0,4716	0,0394	0,0122	0,0553	27,590	-13797,90
25	0,4605	0,0409	0,0084	0,0446	0,0698	-33,68
26	0,4646	0,0406	0,0084	0,0461	0,0127	1,53
27	0,4622	0,0421	0,0081	0,0444	0,0169	-8,23
28	0,4600	0,0400	0,0089	0,0464	0,0208	-11,58
29	0,4634	0,0389	0,0093	0,0484	0,8635	-425,18
30	0,4626	0,0406	0,0088	0,0392	0,0217	7,11
31	0,4569	0,0384	0,0120	0,0485	21,704	-10865,9

ⁱⁿ inóculo

Os 16 isolados da destilaria Clealco foram classificados em 5 grupos distintos (Tabela 17), segundo a metodologia da capacidade fermentativa (Andrietta et al.,

1999). Os isolados dominantes em todas as 8 coletas mensais realizadas pertenceram ao grupo 311.211, que é um dos mais comuns nas destilarias de álcool brasileiras (Andrietta et. al., 1999; Migliari, 2001).

Tabela 17 – Valores de rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), velocidade de consumo de substrato (VCS – g substrato/l/h), nível de conversão de substrato (NCO - %), velocidade específica máxima de crescimento (μ_m – l/h), produtividade (PROD – g etanol/l/h) e rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido) das leveduras isoladas na safra 96/97 da destilaria Clealco.

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_m	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
16 ⁱⁿ	0,0379	5,80	99,43	0,46	2,51	0,4637	311.211
17	0,0372	5,80	99,47	0,46	2,55	0,4701	311.211
18	0,0378	5,80	99,51	0,47	2,52	0,4634	311.211
19	0,0382	5,80	99,51	0,51	2,49	0,4586	311.211
20	0,0383	5,70	97,76	0,46	2,46	0,4625	322.211
21	0,0402	5,80	99,57	0,48	2,48	0,4561	311.211
22	0,0393	4,63	79,40	0,47	2,04	0,4787	333.221
23	0,0392	5,80	99,43	0,50	2,46	0,4532	311.211
24	0,0394	4,76	81,72	0,52	2,08	0,4716	333.221
25	0,0409	5,80	99,45	0,48	2,50	0,4605	311.211
26	0,0406	5,80	99,50	0,52	2,52	0,4646	311.211
27	0,0421	5,80	99,49	0,50	2,51	0,4622	211.211
28	0,0400	5,80	99,49	0,52	2,50	0,4600	311.211
29	0,0389	5,56	95,35	0,52	2,40	0,4634	322.221
30	0,0406	5,80	99,49	0,50	2,51	0,4626	311.211
31	0,0379	4,95	84,94	0,51	2,09	0,4637	333.221

ⁱⁿ inóculo

Alguns isolados foram classificados em grupos distintos. Na maioria dos casos, são leveduras oportunistas que podem causar problemas sob condições

operacionais desfavoráveis. Os grupos de três destes isolados, 20, 27 e 29, apareceram somente uma vez durante a safra. Entre eles, somente o isolado 29 foi capaz de por em risco a dominância do processo pelas leveduras do grupo 311.211, pois seu aparecimento ocorreu na época em que foi processada maior quantidade de cana de área de sacrifício. Pela Tabela 17 observa-se que este isolado, apesar de possuir uma velocidade de fermentação inferior àquelas das leveduras do grupo 311.211, apresenta valores de rendimento em etanol elevado. Portanto, a cepa 29 não representa grande risco ao processo, já que existe na planta volume excedente de reator suficiente para absorver uma variação na velocidade de fermentação dessa magnitude. A presença da levedura 29 não foi detectada na coleta posterior.

Os três isolados restantes (22, 24 e 31) foram classificados no mesmo grupo (333.221) e apresentam desempenho fermentativo fraco. Estes isolados, apesar de mostrarem participação populacional baixa, merecem atenção por apresentarem características fermentativas desfavoráveis. Sob condições operacionais inadequadas, estas leveduras podem dominar o processo, provocando perdas significativas de rendimento e produtividade.

4.1.2.3 Identificação Taxonômica

Dez dos dezesseis isolados de levedura da safra 96/97 da destilaria Clealco apresentaram participação populacional acima de 10% (Tabela 15) e foram selecionados para identificação taxonômica (Griffiths, 1981).

Na safra 96/97 da destilaria Clealco, a dinâmica populacional de leveduras seguiu o mesmo perfil da safra anterior (Figura 6). *S. coreanus* dominou o processo de fermentação mantendo-se numa concentração superior a 93,1%, exceto no sétimo mês de safra, quando a concentração foi de 80,0% e a levedura 29, identificada como *S. cerevisae*, foi isolada numa concentração de 20,0%, exatamente no período de maior moagem de cana de área de sacrifício.

Tabela 18 – Resultados dos testes para identificação taxonômica dos isolados de leveduras da destilaria Clealco, safra 96/97.

Isolado	Maltose ^A	Galactose ^A	Lactose ^A	Nitrato ^A	Eritritol ^A	Amido ^H	Ribitol ^A	37°C	Glic/NaCl	Sacarose ^F	Galactose ^F	Glicose ^F	Sacarose ^A	Inositol ^A	Celobiose ^A	Rafinose ^A	Manitol ^A	Melibiose ^A	Lactose ^F	Xilose ^A	Cél. Along.
16	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
17	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
19	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
21	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
23	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
25	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
26	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
28	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
29	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
30	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

^A Assimilação; ^F Fermentação; ^H Hidrólise.

Tabela 19 – Identificação taxonômica dos isolados dominantes da destilaria Clealco, safra 96/97.

Isolado	Código Numérico de Identificação	Espécie
16	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
17	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
19	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
21	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
23	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
25	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
26	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
28	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
29	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>

As duas espécies isoladas apresentaram perfis de consumo de açúcares semelhantes, variando apenas na assimilação de maltose por *S. cerevisiae* e não assimilação por *S. coreanus* (Tabelas 18 e 19). Pela classificação atual de leveduras (Kreger-van Rij 1984 e Barnett et al., 1990) a espécie *S. coreanus* foi incluída em *S. cerevisiae*, que apresenta consumo variável para maltose.

O gênero *Saccharomyces* tem sido isolado como o gênero de leveduras mais comum na fermentação alcoólica (Cabrini & Gallo, 1999a e 1999b). Porém, a presença de *S. coreanus* foi detectada numa concentração de apenas 5,9% no fermento centrifugado de unidade industrial, enquanto que *S. cerevisiae* obteve uma concentração de 41,2% (Cabrini & Gallo, 1999b).

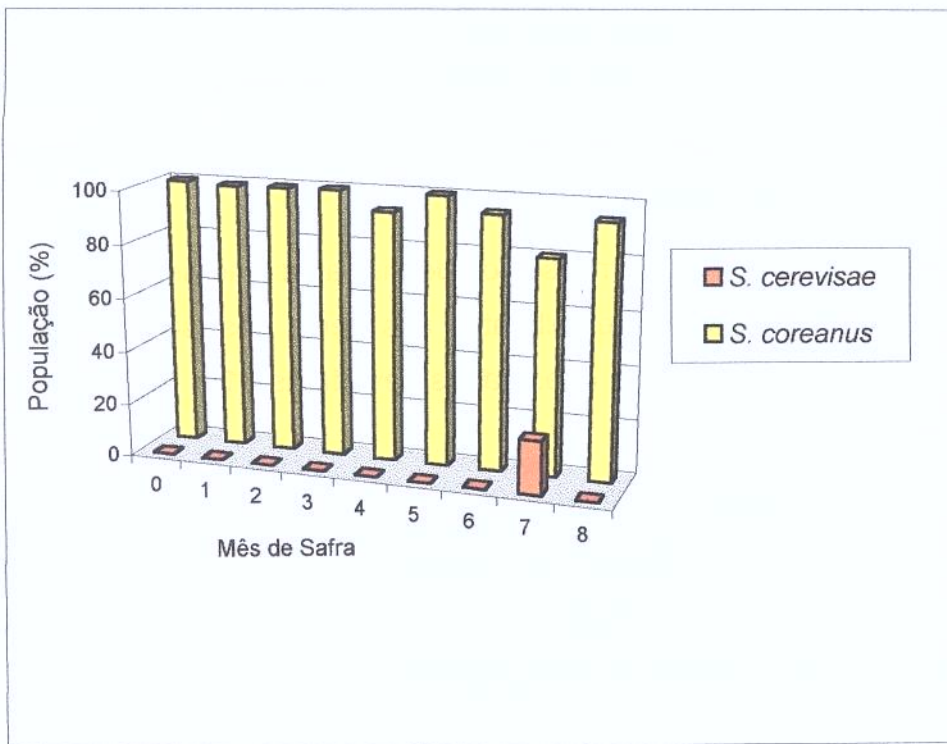


Figura 6 – Participação populacional (%) das espécies de levedura com concentração acima de 10% no vinho levedurado da destilaria Clealco, safra 96/97.

4.1.2.4 Cariotipagem

Dez isolados apresentaram participação populacional acima de 10% na safra 96/97 da destilaria Clealco (Tabela 15) e foram submetidos à cariotipagem eletroforética, segundo Blondin & Vézinhel (1988) modificado. Os perfis eletroforéticos das leveduras 16, 17, 19, 21, e 23 são mostrados na Figura 7 e das leveduras 25, 26, 28, 29 e 30, na Figura 8. Foram consideradas cepas de levedura diferentes aquelas que apresentaram padrões de bandas cromossômicos diferentes.

As leveduras analisadas (Figuras 7 e 8) podem ser incluídas no grupo *Saccharomyces sensu stricto* que se caracteriza por apresentar 12 a 17 bandas na cariotipagem eletroforética (Vaughan-Martini et al., 1993), pois nenhum outro grupo de leveduras possui tantos cromossomos (De Jonge et al., 1986; Johnston & Mortimer, 1986; Casey et al., 1990; Sheehan et al., 1997). O padrão de bandas dos isolados da safra 96 da destilaria Clealco (Figuras 7 e 8) coincide com o perfil eletroforético de 12 a 14 bandas da espécie *S. cerevisiae* (Cardinali & Martini, 1994; Guillamón et al., 1994) e confirma a identificação desses isolados segundo taxonomia tradicional (Barnett et al., 1990).

Os perfis eletroforéticos dos cromossomos dos isolados são semelhantes entre si (Figuras 7, 8 e 9) e também semelhantes aos perfis dos isolados da safra 95 (Figuras 3 e 4). Os inóculos das duas safras, leveduras 01 e 16, apresentaram o mesmo padrão cromossômico.

Para efeito de comparação, a Figura 7 inclui o perfil cromossômico de uma cepa padrão *S. cerevisiae* (ATCC 7752), a levedura Sc, que difere das outras leveduras analisadas e apresenta variação na posição das bandas na duplicata, provavelmente devido a rearranjo cromossômico.

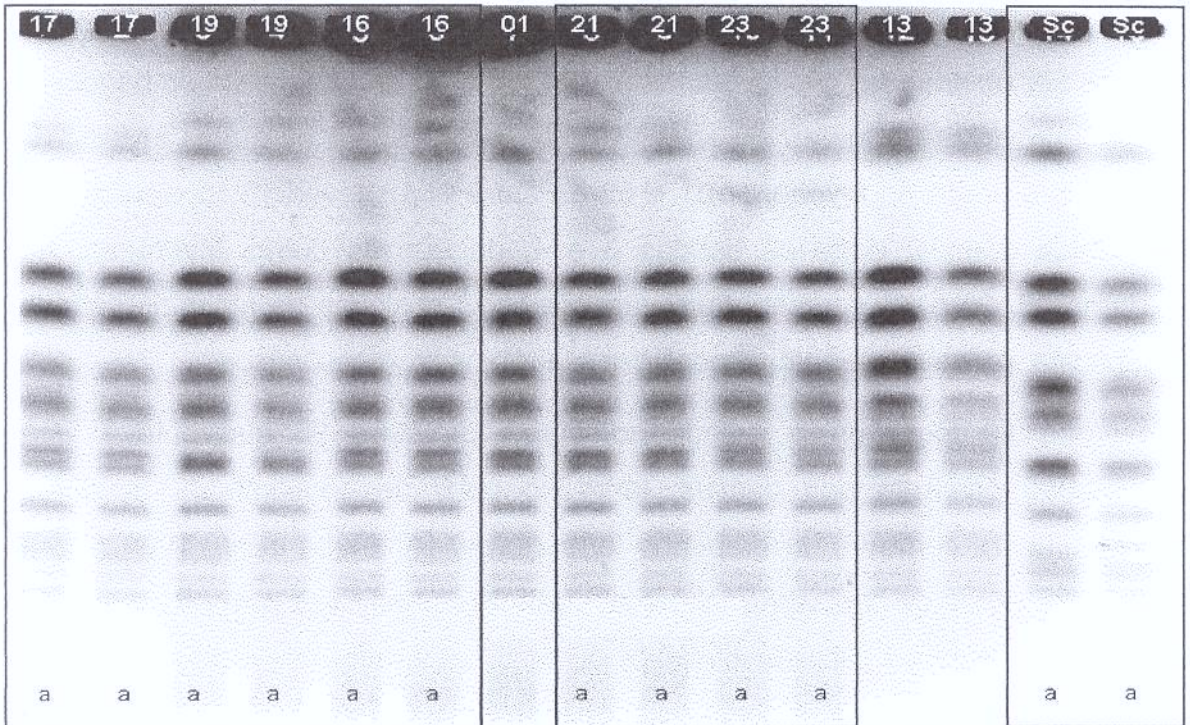


Figura 7 - As molduras mostram os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 96/97 da destilaria Clealco. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

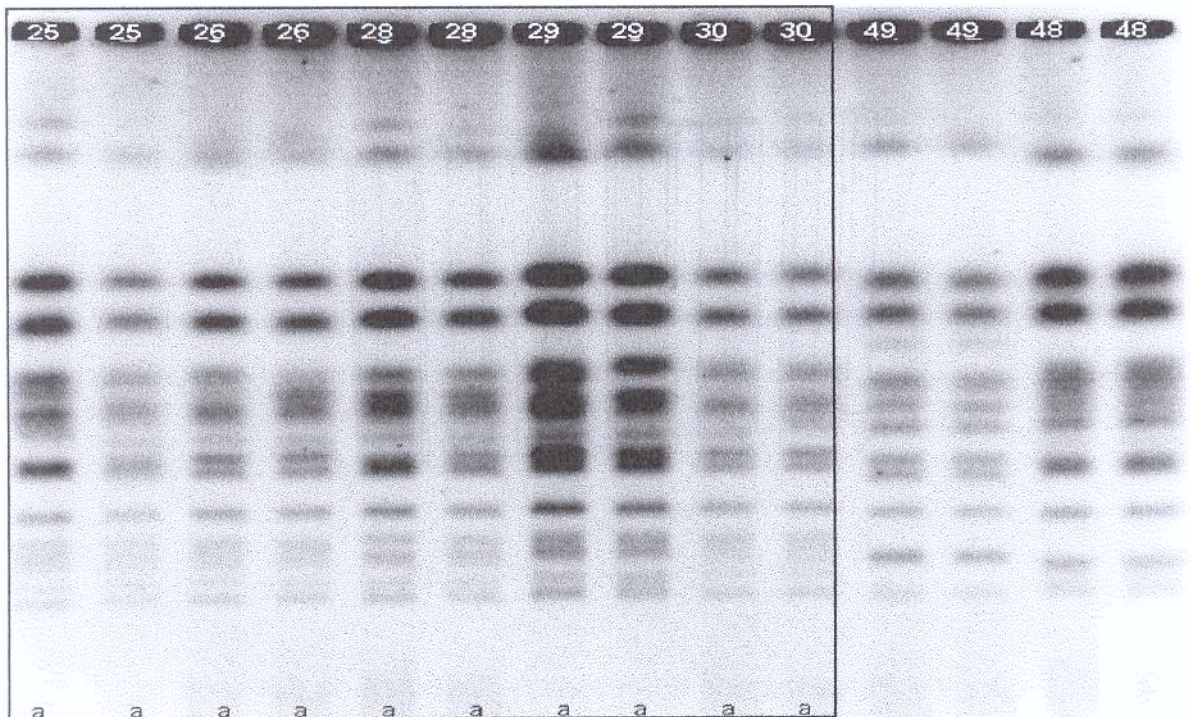


Figura 8 - A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 96/97 da destilaria Clealco. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

Algumas variações no perfil cromossômico comum aos isolados da safra 96 puderam ser observadas. As leveduras 19, 21, 25 e 28 apresentaram as bandas 6 e 7 mais próximas ou juntas em relação ao observado para as outras leveduras, como ocorreu para as leveduras 01 e 02 da safra 95. A levedura 28 apresentou uma banda a mais, entre as bandas 3 e 4, do que as outras leveduras. As leveduras 25, 26 e 30 apresentaram variações nas posições de algumas bandas na duplicata, provavelmente causadas por rearranjos cromossômicos.

A levedura 29 foi o único isolado dominante da safra 96 que obteve uma classificação diferente dos demais, tanto no perfil de consumo de açúcares (Griffiths, 1981), como no desempenho fermentativo (Andrietta et al., 1999). Essa levedura foi capaz de consumir maltose e, portanto, identificada como *S. cerevisiae* enquanto as demais foram identificadas como *S. coreanus* pela incapacidade de utilizar esse açúcar. No entanto, o perfil cromossômico da levedura 29 foi semelhante ao dos outros isolados, repetindo o observado para a levedura 13 da safra 95.

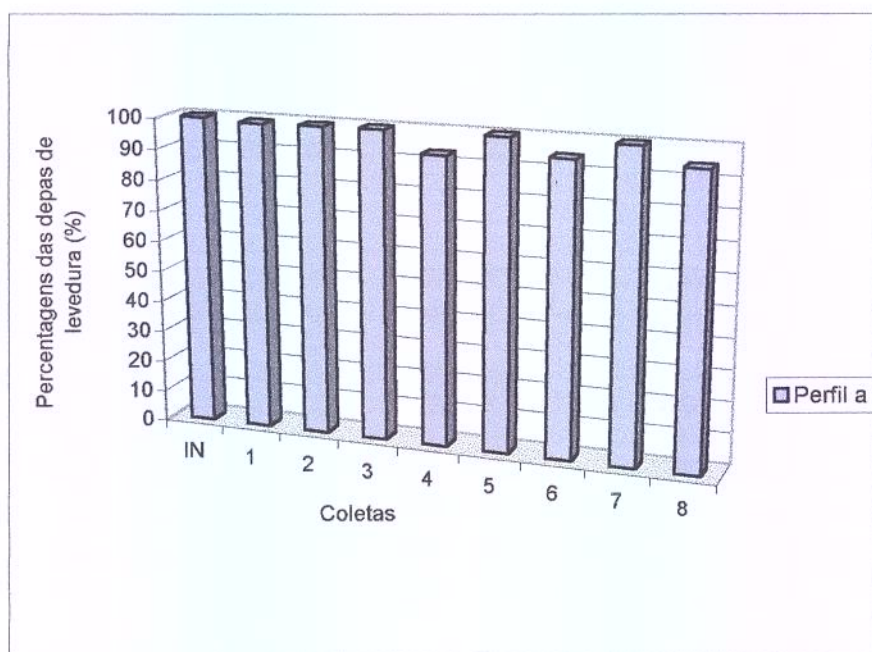


Figura 9 – Percentagens das cepas de levedura da destilaria Clealco ao longo da safra 96/97, segundo o perfil cromossômico.

A observação do mesmo perfil cromossômico ao longo de duas safras consecutivas confirma a manutenção do inóculo como levedura dominante no processo. A utilização de leveduras nativas isoladas dos processos industriais de produção de etanol como inóculo e sua manutenção nos processos têm sido documentadas por alguns pesquisadores (Basso et al., 1993 e 2000; Stroppa et al., 2000).

4.2 DESTILARIA UNIALCO SAFRA 97/98

4.2.1 Leveduras Isoladas

Foram 16 os isolados (Tabela 20) nas 7 coletas mensais realizadas ao longo da safra 97/98. A destilaria iniciou a fermentação com fermento de panificação. Não foi recolhida uma amostra do inóculo, porém a primeira coleta foi realizada no 5º dia após o início da fermentação e foi tomada como representativa do inóculo.

Doze dos 16 isolados foram caracterizados como leveduras floculantes (Tabela 20).

Tabela 20 – Leveduras isoladas na safra 97/98 da destilaria Unialco.

Coleta	Isolado	Concentração (UFC/ml)	Participação Populacional (%)
Inóculo	32	$5,8 \times 10^7$	100,0
1	33 ^F	$1,5 \times 10^8$	68,2
	34	$3,0 \times 10^7$	13,6
	35	$4,0 \times 10^7$	18,2
2	36 ^F	$1,3 \times 10^8$	100,0
3	37 ^F	$8,5 \times 10^7$	94,5
	38 ^F	$3,0 \times 10^6$	3,3
	39 ^F	$2,0 \times 10^6$	2,2
4	40 ^F	$1,4 \times 10^8$	94,3
	41 ^F	$7,0 \times 10^6$	4,7
	42	$1,5 \times 10^6$	1,0
5	43 ^F	$2,6 \times 10^8$	93,4
	44 ^F	$1,5 \times 10^7$	5,4
	45 ^F	$3,5 \times 10^6$	1,2
6	46 ^F	$1,5 \times 10^8$	85,7
	47 ^F	$2,5 \times 10^7$	14,3

^F levedura floculante.

Em todas as coletas observou-se uma levedura dominante presente em alta concentração. Nas coletas 2, 3, 4 e 5, a levedura dominante apresentou participação superior a 93,4%. Somente no 1ª e na 6ª coletas as outras leveduras isoladas apresentaram participação populacional acima de 10%. Nestas duas amostragens a participação populacional da levedura dominante foi de 68,2 e 85,7%, respectivamente (Tabela 20).

4.2.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance

A maioria das leveduras isoladas da destilaria Unialco apresentou potencial fermentativo abaixo do obtido pela cepa padrão (Tabela 21). Enquanto que na destilaria Clealco, safras 95/96 e 96/97, cerca de 20% dos isolados obtiveram potencial fermentativo mais baixo que -100, na destilaria Unialco 62% dos 16 isolados estão nessa categoria.

As leveduras da destilaria Unialco que apresentaram potencial fermentativo baixo são: 32, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 44, 45 e 46 (Tabela 21). Entre essas leveduras, os isolados 32, 33, 36, 43 e 46 representam o inóculo e as leveduras dominantes das coletas 1, 2, 5 e 6, respectivamente, apresentando participações populacionais entre 68,2 e 100%. Somente na 3ª e 4ª coletas a fermentação foi dominada por leveduras (37 e 40) que obtiveram potenciais fermentativos equivalentes ao da cepa padrão.

Para todas as 10 leveduras que apresentaram desempenho fraco, a queda no potencial fermentativo está associada à incapacidade de consumir todo o açúcar do meio (Tabela 21). Seis delas apresentaram produção de glicerol acima da média e duas delas (39 e 45) também apresentaram produção alta de ácidos. A levedura 45 também apresentou rendimento em etanol baixo. As leveduras 39 e 45 obtiveram os piores índices para potencial fermentativo (-14803,4 e -68273,3), porém não representaram perigo para a fermentação já que foram isoladas em concentrações baixas, de 2,2 e 1,2%, respectivamente.

De modo geral, os isolados apresentaram baixa produção de células, com rendimentos em células inferiores a 0,040g de massa seca/g de substrato

consumido (Tabela 21). Esse perfil é adequado a sistemas em que a perda de células é baixa, como na destilaria Unialco, e não exige a montagem de fábrica de ração de leveduras associada à fermentação. O isolado 40 foi o único que apresentou rendimento em células pouco acima da média (0,0430g massa seca/g substrato).

Tabela 21 – Valores de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido), rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), rendimento em ácidos ($Y_{ac/s}$ – g ácido/g substrato consumido), rendimento em glicerol ($Y_{g/s}$ – g glicerol/g substrato consumido), relação ART residual/ART consumido (R_r – g açúcar residual/g açúcar consumido) e Potencial Fermentativo (PF) dos isolados de levedura da destilaria Unialco (safra 97/98) e cepa padrão.

Isolado	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{g/s}$	R_r	PF
Padrão	0,4600	0,0400	0,0080	0,0450	0,0100	0
32 ⁱⁿ	0,4697	0,0383	0,0075	0,0495	0,3277	-137,72
33	0,4573	0,0362	0,0062	0,0481	1,0362	-501,17
34	0,4769	0,0377	0,0090	0,0496	0,0665	6,75
35	0,4645	0,0392	0,0083	0,0498	0,1500	-68,12
36	0,4692	0,0376	0,0062	0,0500	0,8893	-412,94
37	0,4541	0,0384	0,0067	0,0458	0,1004	-47,79
38	0,4744	0,0367	0,0057	0,0428	0,5208	-195,40
39	0,4517	0,0339	0,0132	0,0922	29,399	-14803,40
40	0,4612	0,0430	0,0069	0,0443	0,0046	-4,61
41	0,4746	0,0371	0,0071	0,0430	0,0068	55,39
42	0,4522	0,0301	0,0061	0,0452	2,1330	-1023,34
43	0,4657	0,0386	0,0062	0,0460	0,3397	-142,06
44	0,4855	0,0360	0,0057	0,0476	4,3504	-2093,80
45	0,3775	0,0383	0,0118	0,1235	135,84	-68273,30
46	0,4702	0,0354	0,0064	0,0413	0,6084	-240,95
47	0,4729	0,0385	0,0069	0,0412	0,0508	26,89

ⁱⁿ inoculo

Entre as leveduras que apresentaram bom potencial fermentativo destacam-se os isolados 41 e 47, que apresentaram alto rendimento em etanol (0,4746 e 0,4729) e baixas produções de células, ácidos e glicerol (Tabela 21). Esses dois isolados podem representar boas opções como inóculo da fermentação da destilaria Unialco.

Os 16 isolados da destilaria Unialco foram classificados em 11 grupos diferentes (Tabela 22), segundo a metodologia da capacidade fermentativa (Andrietta et al., 1999).

Neste processo, o grande número de isolados pertencentes a grupos distintos mostra a grande instabilidade microbiológica, baseada no desempenho fermentativo. Esta instabilidade pode estar vinculada à utilização de uma levedura não específica na partida da planta (fermento de panificação), associada ou não a problemas de oscilação das condições operacionais.

Observa-se uma grande variedade de grupos de levedura dominantes durante a safra (Tabela 22). Este fato torna mais difícil a elaboração de uma estratégia de controle operacional para a planta em questão. A grande variação de desempenho dos isolados dominantes determina a realização de um número maior de análises laboratoriais para acompanhamento do processo, o que acarreta no aumento do custo de produção. Migliari (2001) utilizou a mesma técnica na classificação de leveduras isoladas da destilaria Alvorada. Neste trabalho, os 26 isolados foram classificados em 11 grupos diferentes e leveduras de diversos grupos dominaram a fermentação ao longo da safra.

Pela Tabela 22, observa-se que, apesar das desvantagens acarretadas pela oscilação de desempenho dos isolados dominantes, todos eles apresentaram rendimento em etanol satisfatório.

Tabela 22 – Valores de rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), velocidade de consumo de substrato (VCS – g substrato/l/h), nível de conversão de substrato (NCO - %), velocidade específica máxima de crescimento (μ_m – l/h), produtividade (PROD – g etanol/l/h) e rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido) das leveduras isoladas na safra 97/98 da destilaria Unialco.

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_m	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
32 ⁱⁿ	0,0383	5,71	97,91	0,51	2,50	0,4697	312.211
33	0,0362	5,51	94,55	0,45	2,35	0,4573	322.221 ^F
34	0,0377	5,78	99,21	0,52	2,58	0,4769	311.211
35	0,0392	5,76	98,80	0,46	2,50	0,4645	311.211
36	0,0376	5,55	95,24	0,43	2,43	0,4692	322.221 ^F
37	0,0384	5,77	99,05	0,43	2,45	0,4541	311.311 ^F
38	0,0367	5,65	96,99	0,41	2,50	0,4744	322.311 ^F
39	0,0339	2,32	39,85	0,27	0,94	0,4517	333.331 ^F
40	0,0430	5,80	99,51	0,46	2,50	0,4612	211.211 ^F
41	0,0371	5,80	99,50	0,47	2,57	0,4746	311.211 ^F
42	0,0301	5,64	96,83	0,42	2,38	0,4522	322.321
43	0,0386	5,78	99,08	0,37	2,51	0,4657	311.311 ^F
44	0,0360	5,49	94,20	0,46	2,48	0,4855	322.211 ^F
45	0,0383	2,10	36,06	0,43	0,71	0,3775	333.333 ^F
46	0,0354	5,76	98,73	0,46	2,52	0,4702	311.211 ^F
47	0,0385	5,80	99,45	0,54	2,56	0,4729	311.211 ^F

ⁱⁿ inóculo, ^F levedura floculante.

Os isolados 33 e 36 dominaram o processo na 1^a e 2^a coletas e apresentaram velocidade de consumo de substrato inferior à desejada (5,51 e 5,55g substrato/l/h). Estas leveduras dominantes também apresentaram resultados médios para nível de conversão de substrato e produtividade. Estas características não representam grandes problemas, do ponto de vista operacional, para processos batelada como o da destilaria Unialco já que é possível aumentar o tempo de fermentação até que todo o substrato seja

consumido. Esta conduta impede a queda do rendimento. Estes resultados de desempenho podem estar vinculados à característica floculante destes isolados, que diminui a superfície de contato do microrganismo com o substrato e, como consequência, diminui a velocidade de fermentação (Viegas, 1999).

4.2.3 Identificação Taxonômica

Dez dos dezesseis isolados da destilaria Unialco na safra 97/98 obtiveram participação populacional superior a 10% (Tabela 20) e foram submetidos à identificação taxonômica segundo Griffiths (1981).

Na safra 97/98 foi utilizado fermento de panificação prensado (*S. cerevisiae*) para partida do processo. Foram isoladas três espécies de levedura ao longo da safra: *S. cerevisiae*, *S. coreanus* e *S. chevalieri* (Figura 10). As duas primeiras espécies alternaram-se na dominância do processo nos 7 meses de safra, sempre em concentração superior a 85,7%, exceto no segundo mês. Neste mês, foi isolada uma terceira cepa, com concentração de 13,6%, identificada como *S. chevalieri* (isolado 34). *S. coreanus* e *S. cerevisiae* estavam presentes em concentrações de 68,2 e 18,2%, respectivamente.

As espécies *S. cerevisiae* e *S. coreanus* isoladas apresentaram perfis de consumo de açúcares semelhantes, variando apenas na assimilação de maltose por *S. cerevisiae* e não assimilação por *S. coreanus*. A espécie *S. chevalieri* apresenta perfil metabólico idêntico ao de *S. cerevisiae*. O único aspecto diverso entre essas duas espécies é a presença de células alongadas nos isolados de *S. cerevisiae* e a ausência para *S. chevalieri* (Tabelas 23 e 24). Segundo a classificação atual de leveduras (Kreger-Van Rij, 1984; Barnett et al., 1990), *S. coreanus* e algumas variedades de *S. chevalieri* estão incluídas na espécie *S. cerevisiae*.

Tabela 23 – Resultados dos testes para identificação taxonômica dos isolados de leveduras da destilaria Unialco, safra 97/98.

Isolado	Maltose ^A	Galactose ^A	Lactose ^A	Nitrato ^A	Eritritol ^A	Amido ^H	Ribitol ^A	37°C	Glic/NaCl	Sacarose ^F	Galactose ^F	Glicose ^F	Sacarose ^A	Inositol ^A	Celobiose ^A	Rafinose ^A	Manitol ^A	Melibiose ^A	Lactose ^F	Xilose ^A	Cél. Along.
32	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
33	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
34	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
35	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
36	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
37	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
40	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
43	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
46	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
47	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

^A Assimilação; ^F Fermentação; ^H Hidrólise.

Tabela 24 – Identificação taxonômica dos isolados dominantes da destilaria Clealco, safra 97/98.

Isolado	Código Numérico de Identificação	Espécie
32	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
33	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
34	6037-44-0	<i>Saccharomyces chevalieri</i>
35	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
36	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
37	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
40	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
43	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>
46	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
47	2037	<i>Saccharomyces coreanus</i>

Cabrini e Gallo (1999a e 1999b) também utilizaram o sistema de identificação proposto por Griffiths (1981) e isolaram *S. cerevisiae* como a espécie mais comum (50,0 e 41,2%, respectivamente) em amostras de fermento centrifugado de dois processos de fermentação. *S. chevalieri* foi isolada numa concentração de 3,6% em um dos processos (1999a) e *S. coreanus* na concentração de 5,9%, no outro processo (1999b).

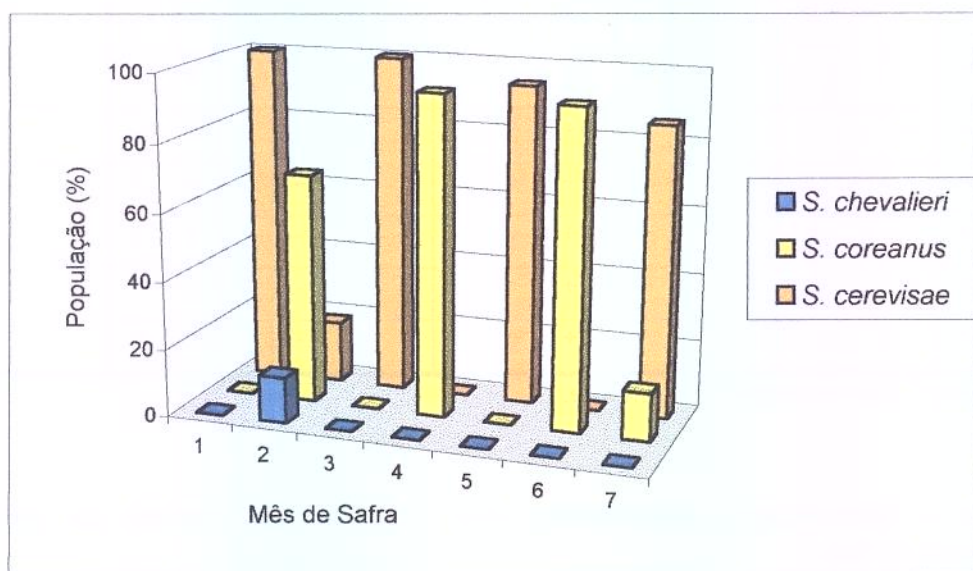


Figura 10 – Participação populacional (%) das espécies de levedura com concentração acima de 10% no vinho levedurado da destilaria Unialco, safra 97/98.

4.2.4 Cariotipagem

Dez isolados apresentaram participação populacional acima de 10% na safra 97/98 da destilaria Unialco (Tabela 20) e foram submetidos à cariotipagem eletroforética, segundo Blondin & Vézinhét (1988) modificado. Os perfis eletroforéticos das leveduras 32, 33, e 34 são mostrados na Figura 11 e das leveduras 35, 36, 37, 40, 43, 46 e 47 na Figura 12. Foram consideradas cepas de levedura diferentes aquelas que apresentaram padrões de bandas cromossômicos diferentes.

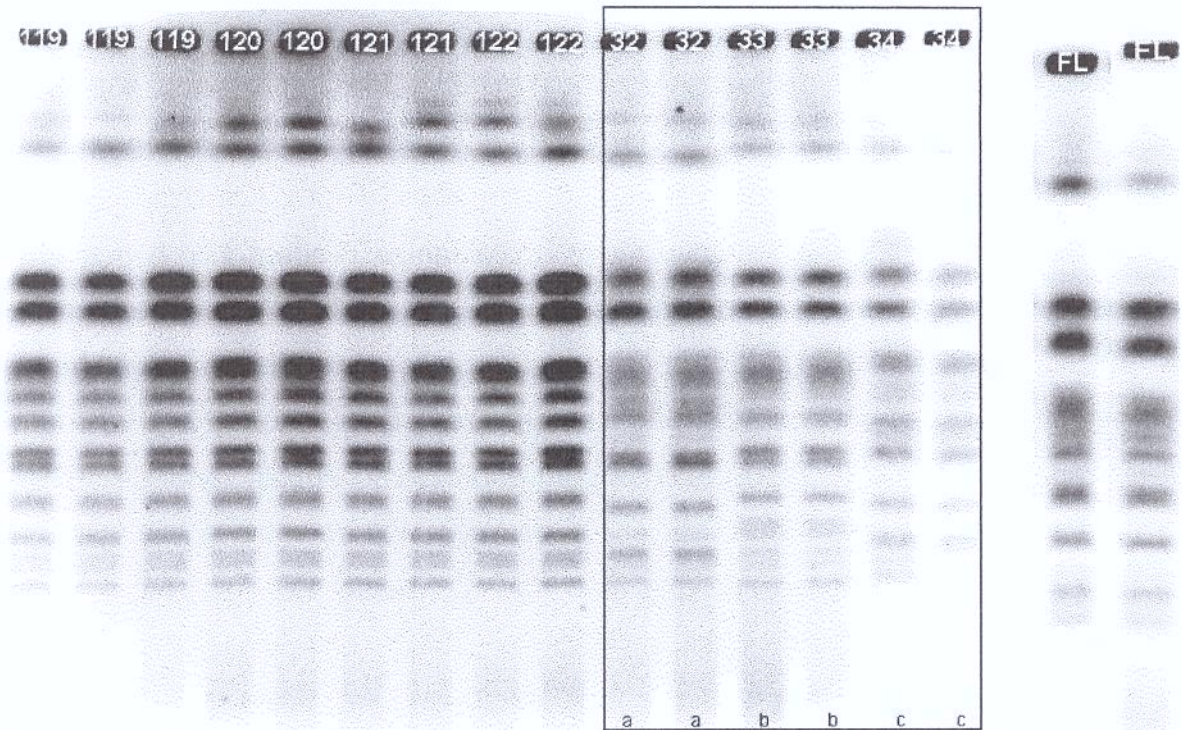


Figura 11 - A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 97/98 da destilaria Unialco. Letras iguais indicam o mesmo perfil. FL mostra o perfil do fermento Fleischmann.

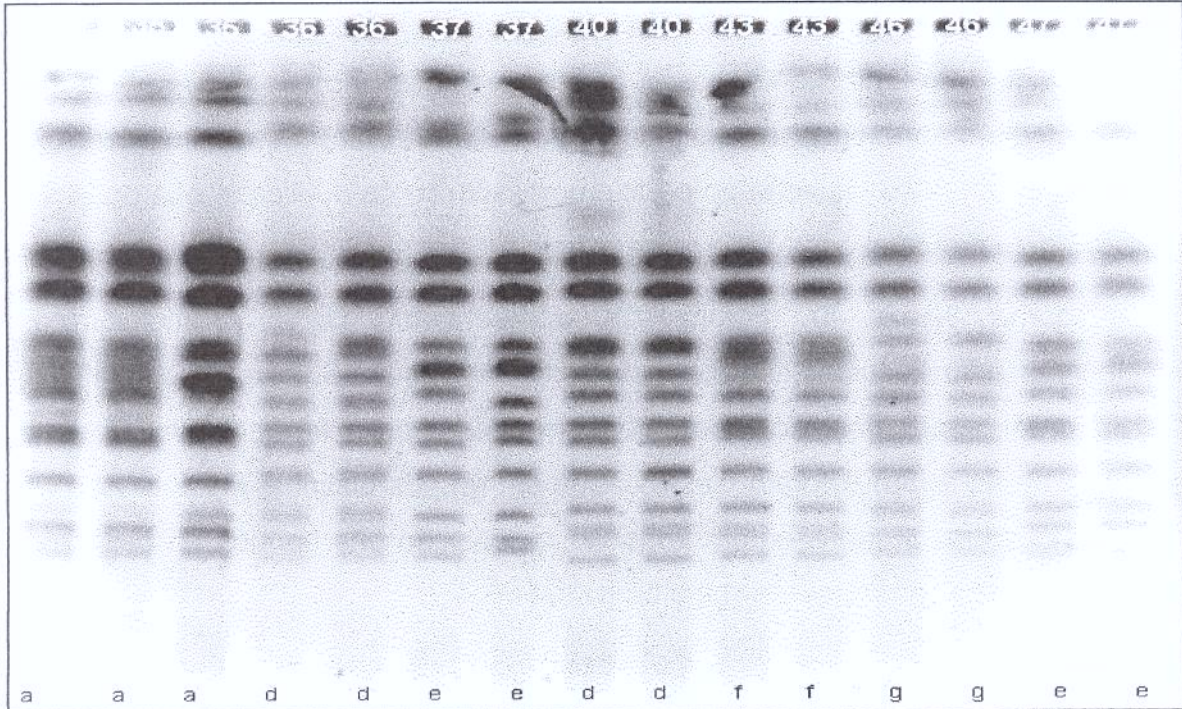


Figura 12 - A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 97/98 da destilaria Unialco. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

O perfil do inóculo (levedura 32), uma levedura de panificação, é semelhante ao da levedura 35. O padrão de bandas dos isolados 32 e 35 é o mesmo apresentado pelo fermento Fleischmann (Figura 11). Esses dois isolados obtiveram a mesma identificação taxonômica (Griffiths, 1981), *S. cerevisiae*, e foram classificados em grupos de desempenho fermentativo muito semelhantes (Tabela 22). A pequena variação nos índices de nível de conversão de substrato (NCO) observada entre as leveduras 32 e 35 pode ser consequência de desvios experimentais. Provavelmente esses dois isolados são a mesma cepa de levedura. Essa levedura foi utilizada como inóculo sendo isolada com participação populacional de 100%, com 5 dias de safra, de 18,2% (Tabela 20), com um mês de safra, e não voltou a ser detectada no processo, já que não foi observado nenhum outro perfil cromossômico semelhante. Basso (1993 e 2000) observou, através da comparação de perfis eletroforéticos, que leveduras de panificação utilizadas como inóculo na fermentação alcoólica são incapazes de sobreviver às condições do processo e são varridas do sistema, ainda no início da safra.

As leveduras 33, 34, 43 e 46 (Figuras 11 e 12) apresentaram perfis cromossômicos únicos em relação às demais leveduras, mesmo tendo sido obtidas identificação taxonômica e classificação por desempenho repetidas em outros isolados. Provavelmente, essas quatro leveduras são cepas diferentes das outras e tiveram presença pontual durante a safra. Entre essas leveduras, o isolado 46 apresentou variação no perfil cromossômico da duplicata, que pode ser explicada pela provável ocorrência de rearranjo cromossômico.

As leveduras 36 e 40 (Figura 12) apresentaram perfis cromossômicos semelhantes, são floculantes e foram identificadas como *S. cerevisiae* (Griffiths, 1981). Porém, esses dois isolados revelaram desempenho fermentativo diferente (Andrietta et al., 1999) e foram classificados em grupos distintos (Tabela 22). Os perfis da levedura 36 apresentam variação na posição das bandas na duplicata, provavelmente causada por rearranjo cromossômico.

Os isolados 37 e 47 (Figura 12) apresentaram perfis cromossômicos semelhantes, são floculantes e foram identificados como *S. coreanus* (Griffiths, 1981). Essas leveduras mostraram desempenho fermentativo semelhante (Andrietta et al.,

1999) e sua classificação variou apenas quanto ao $\mu_{\max}$ (Tabela 22), caráter especialmente sujeito à falhas de avaliação nas cepas floculantes, como as duas em questão. A levedura 37 apresentou variações no perfil cromossômico da duplicata, que pode ter sido provocada por rearranjos cromossômicos simultâneos.

A ocorrência de diversos padrões cromossômicos (7 em 10 isolados) (Figuras 11, 12 e 13) e a obtenção de diversos grupos de desempenho fermentativo (5 em 10 isolados) entre os isolados dominantes da safra 97/98 da destilaria Unialco indicam um processo microbiologicamente instável, em que diferentes cepas se sucedem e dominam a fermentação somente por algum tempo.

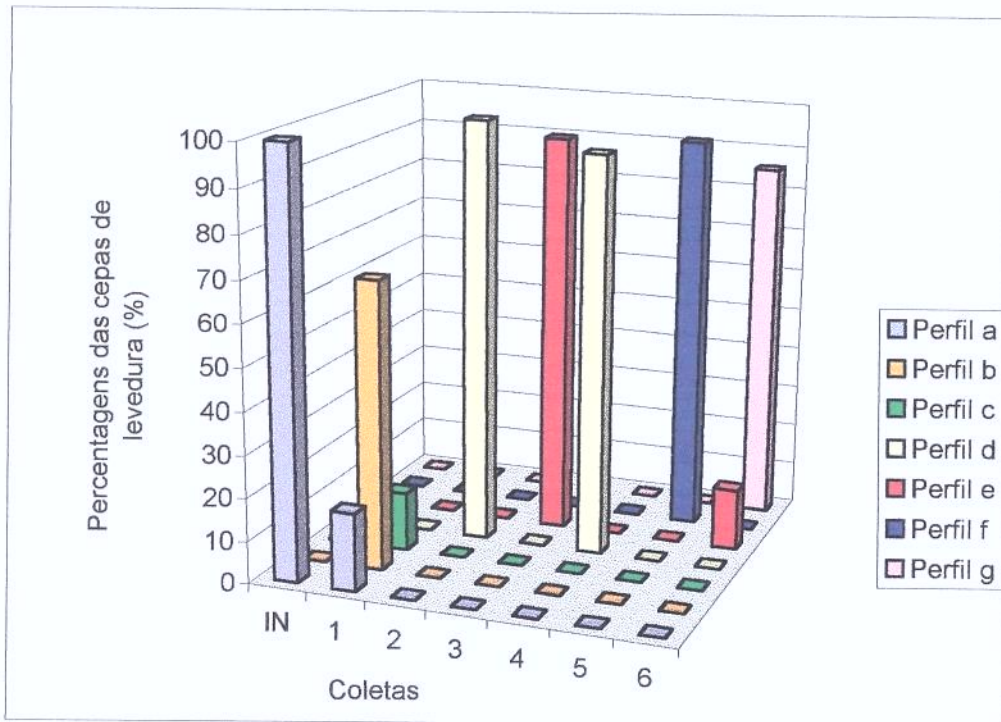


Figura 13 - Percentagens das cepas de levedura da destilaria Unialco ao longo da safra 97/98, segundo o perfil cromossômico.

4.3 DESTILARIA DIANA

4.3.1. SAFRA 95/96

4.3.1.1 Leveduras Isoladas

Foram isoladas 26 leveduras na safra 95/96 da destilaria Diana (Tabela 25). Fermento de panificação foi utilizado como inóculo nessa safra.

Vinte e dois dos 26 isolados foram caracterizados como leveduras floculantes (Tabela 25).

Em nenhuma das 6 coletas observou-se a presença de um único isolado dominante com participação populacional acima de 90% (Tabela 25). Porém, nas coletas 1 e 5, foram isoladas leveduras dominantes em concentrações elevadas, de 85,0 e 86,1%, respectivamente. Nas demais coletas a dominância da fermentação foi compartilhada por 2 a 4 isolados com concentrações variando entre 11,1 e 66,7%. Em estudo da dinâmica de leveduras da destilaria Alvorada, Migliari (2001) observou a presença de mais de duas leveduras dividindo a dominância da fermentação em 6 das 11 coletas realizadas ao longo da safra. O autor sugere que a utilização de fermento de panificação como inóculo seria uma das causas do desequilíbrio microbiológico observado.

As 26 leveduras da destilaria Diana na safra 95/96 foram isoladas em apenas 6 coletas. Já nas safras 95/96 e 96/97 da destilaria Clealco e na safra 97/98 da destilaria Unialco, previamente analisadas, foram isoladas 15 ou 16 leveduras em 7 ou 8 coletas. A grande variabilidade de isolados de levedura da destilaria Diana e a situação comumente observada de várias leveduras dividindo a dominância da fermentação demonstram a instabilidade e o desequilíbrio microbiológicos desse processo. Estas características desfavoráveis podem estar associadas à utilização de um inóculo inadequado, fermento de panificação, e também ao design especial dos fermentadores que privilegia leveduras floculantes e, portanto, inclui um caráter mais restritivo ambiente da fermentação alcoólica.

Tabela 25 – Leveduras isoladas na safra 95/96 da destilaria Diana.

Coleta	Isolado	Concentração (UFC/ml)	Participação Populacional (%)
1	48	$3,4 \times 10^8$	85,0
	49	$6,0 \times 10^7$	15,0
2	50 ^F	$1,4 \times 10^8$	32,6
	51 ^F	$1,2 \times 10^8$	27,9
	52	$1,2 \times 10^8$	27,9
	53 ^F	$5,0 \times 10^7$	11,6
	54	$6,0 \times 10^8$	66,7
3	55 ^F	$1,0 \times 10^8$	11,1
	56 ^F	$1,0 \times 10^8$	11,1
	57 ^F	$4,0 \times 10^7$	4,4
	58 ^F	$3,0 \times 10^7$	3,3
	59 ^F	$2,0 \times 10^7$	2,2
	60 ^F	$1,0 \times 10^7$	1,1
4	61 ^F	$3,0 \times 10^8$	61,22
	62 ^F	$1,0 \times 10^8$	20,4
	63 ^F	$7,0 \times 10^7$	14,3
	64 ^F	$1,0 \times 10^7$	2,0
	65 ^F	$1,0 \times 10^7$	2,0
5	66 ^F	$1,3 \times 10^9$	86,1
	67 ^F	$2,0 \times 10^8$	13,2
	68 ^F	$1,0 \times 10^7$	0,7
6	69 ^F	$1,9 \times 10^8$	67,6
	70 ^F	$7,0 \times 10^7$	24,9
	71 ^F	$1,9 \times 10^7$	6,8
	72 ^F	$1,0 \times 10^6$	0,4
	73 ^F	$1,0 \times 10^6$	0,4

^F levedura floculante.

4.3.1.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance

A avaliação das leveduras isoladas pela técnica do potencial fermentativo demonstrou o predomínio de leveduras de desempenho fermentativo fraco na primeira metade da safra (Tabela 26). Entre essas leveduras, os isolados 48, 49, 50, 51, 52 e 54 apresentaram participação populacional acima de 10%.

Nove das 13 leveduras isoladas nas coletas 1, 2 e 3 obtiveram valores de potencial fermentativo variando de -377,3 a -2297,9. Essas leveduras não consumiram todo o substrato e, com exceção dos isolados 54 e 59, tiveram produção de glicerol acima da média (maior que 0,045g glicerol/g substrato consumido). As leveduras 48 e 52 também obtiveram produção de ácidos acima da média (maior que 0,008g ácidos/g substrato consumido). A levedura 59 também apresentou rendimento em etanol baixo (0,3914g etanol/g substrato consumido), porém foi isolada com participação populacional baixa (2,2%) e não representou risco ao processo. Com exceção da levedura 59, todos os isolados das 3 primeiras coletas obtiveram rendimentos em etanol altos.

Na segunda metade da safra, representada pelas coletas 4, 5 e 6, todos os isolados de levedura apresentaram potencial fermentativo adequado (entre -41,2 e 16,5) e obtiveram consumo total do substrato, rendimentos em etanol acima de 0,4437g etanol/g substrato consumido, e baixos rendimentos em glicerol e ácidos, com exceção da levedura 64. A levedura 64 não consumiu todo substrato e apresentou rendimentos em células, glicerol e ácidos altos. Contudo, a levedura 64 apresentou rendimento em etanol alto (0,4822g etanol/g substrato consumido) e foi isolada numa participação populacional de apenas 2,0%, não representando risco ao processo.

Tabela 26 – Valores de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido), rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), rendimento em ácidos ($Y_{ac/s}$ – g ácido/g substrato consumido), rendimento em glicerol ($Y_{g/s}$ – g glicerol/g substrato consumido), relação ART residual/ART consumido (R_r – g açúcar residual/g açúcar consumido) e Potencial Fermentativo (PF) dos isolados de levedura da destilaria Diana (safra 95/96) e cepa padrão.

Isolado	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{g/s}$	R_r	PF
Padrão	0,4600	0,0400	0,0080	0,0450	0,0100	0
48	0,4523	0,0378	0,0090	0,0588	3,9045	-1986,78
49	0,4544	0,0403	0,0083	0,0523	1,0165	-534,38
50	0,4513	0,0358	0,0072	0,0508	0,7480	-377,32
51	0,4532	0,0399	0,0082	0,0614	3,6344	-1863,63
52	0,4584	0,0416	0,0092	0,0525	1,1730	-613,53
53	0,4632	0,0433	0,0062	0,0443	0	2,89
54	0,4532	0,0419	0,0066	0,0454	1,4799	-755,67
55	0,4631	0,0419	0,0066	0,0384	0,0148	13,84
56	0,4632	0,0470	0,0059	0,0450	0,0100	-21,54
57	0,4618	0,0377	0,0073	0,0526	4,1966	-2092,76
58	0,4515	0,0419	0,0079	0,0503	4,5271	-2297,89
59	0,3914	0,0512	0,0058	0,0451	2,9422	-1664,53
60	0,4727	0,0439	0,0073	0,0438	0,1500	-57,39
61	0,4561	0,0432	0,0059	0,0382	0,0100	-2,75
62	0,4676	0,0472	0,0059	0,0414	0,0100	-5,10
63	0,4672	0,0465	0,0071	0,0407	0,0100	-4,34
64	0,4822	0,0517	0,0058	0,0500	34,291	-17155,10
65	0,4736	0,0467	0,0048	0,0402	0,0100	16,46
66	0,4494	0,0435	0,0065	0,0408	0,0101	-26,56
67	0,4535	0,0405	0,0072	0,0420	0,0101	-7,57
68	0,4495	0,0402	0,0061	0,0426	0,0101	-12,56
69	0,4437	0,0430	0,0074	0,0416	0,0101	-41,25
70	0,4458	0,0382	0,0064	0,0408	0,0101	-7,41
71	0,4589	0,0414	0,0071	0,0413	0,0101	1,55
72	0,4561	0,0454	0,0060	0,0413	0,0101	-20,89
73	0,4585	0,0405	0,0070	0,0403	0,0606	-17,58

Apesar de apresentarem desempenho fermentativo adequado, a maioria dos isolados da segunda metade da safra obteve valores negativos para potencial fermentativo. Estes valores baixos em relação aos da cepa padrão são devidos à presença de substrato não convertido no final da fermentação. Estes resultados podem estar associados às características floculantes destes isolados, já que estas leveduras têm uma menor superfície de contato com o substrato, causando a redução da velocidade de fermentação (Viegas, 1999).

A substituição das leveduras de potencial fermentativo baixo do início da safra por outras de potencial fermentativo superior indica uma tendência do processo em selecionar leveduras melhor adaptadas ao processo.

O processo de fermentação da destilaria Diana é conduzido em fermentadores tipo torre projetados para operar com levedura floculante. A eficiência do desenho dos fermentadores para isolar cepas floculantes de levedura fica claramente demonstrada pela análise da dinâmica das populações (Tabela 27). As leveduras não floculantes presentes no início da safra foram sendo eliminadas do sistema e totalmente substituídas, a partir do meio da safra, somente por cepas floculantes.

Os 26 isolados foram classificados em 12 grupos distintos (Tabela 27), segundo a metodologia da capacidade fermentativa (Andrietta et al., 1999). Os únicos dois isolados que apresentaram participação populacional superior a 80% foram classificados em grupos diferentes, 322.221 e 221.222, para as leveduras 48 e 66 da primeira e quinta coletas, respectivamente.

Tabela 27 – Valores de rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido); velocidade de consumo de substrato (VCS – g substrato/l/h); nível de conversão de substrato (NCS - %); velocidade específica máxima de crescimento (μ_m – 1/h); produtividade (PROD – g etanol/l/h) e rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido) das leveduras isoladas da destilaria Diana na safra 95/96.

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_m	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
48	0,0378	5,25	90,04	0,53	2,21	0,4523	322.221
49	0,0403	5,65	96,87	0,47	2,40	0,4544	322.221
50	0,0358	5,69	97,57	0,47	2,40	0,4513	322.221 ^F
51	0,0399	5,28	90,64	0,49	2,23	0,4532	322.221 ^F
52	0,0416	5,62	96,47	0,63	2,41	0,4584	222.121
53	0,0433	5,80	99,53	0,46	2,52	0,4632	211.211 ^F
54	0,0419	5,58	95,74	0,47	2,36	0,4532	222.221
55	0,0419	5,80	99,49	0,47	2,52	0,4631	211.211 ^F
56	0,0470	5,80	99,50	0,42	2,52	0,4632	111.311 ^F
57	0,0377	5,63	96,60	0,52	2,43	0,4618	322.221 ^F
58	0,0419	5,17	88,73	0,42	2,17	0,4515	223.321 ^F
59	0,0512	5,68	97,46	0,44	2,08	0,3914	122.323 ^F
60	0,0439	5,79	99,40	0,52	2,56	0,4727	211.211 ^F
61	0,0432	5,80	99,50	0,46	2,48	0,4561	211.211 ^F
62	0,0472	5,80	99,50	0,46	2,54	0,4676	111.211 ^F
63	0,0465	5,80	99,50	0,43	2,54	0,4672	111.311 ^F
64	0,0517	4,65	79,84	0,47	2,07	0,4822	133.221 ^F
65	0,0467	5,80	99,50	0,44	2,57	0,4736	111.311 ^F
66	0,0435	5,80	99,50	0,51	2,44	0,4494	211.222 ^F
67	0,0405	5,80	99,50	0,52	2,46	0,4535	311.211 ^F
68	0,0402	5,80	99,50	0,51	2,44	0,4495	311.222 ^F
69	0,0430	5,80	99,50	0,48	2,41	0,4437	211.222 ^F
70	0,0382	5,80	99,50	0,47	2,42	0,4458	311.222 ^F
71	0,0414	5,80	99,50	0,50	2,49	0,4589	211.211 ^F
72	0,0454	5,80	99,50	0,49	2,47	0,4561	111.211 ^F
73	0,0405	5,80	99,46	0,52	2,49	0,4585	311.211 ^F

^F levedura floculante.

Com exceção dos isolados do grupo 211.211, que apareceram na segunda, terceira, quarta e sexta coletas, as leveduras classificadas em outros grupos apareceram no máximo duas vezes ao longo da safra. Dos 12 grupos de levedura isolados, 5 apareceram somente uma vez na safra em concentrações que variam de 2,0 a 66,7%. A diversidade dos perfis fermentativos dos isolados, associada ao fato de que a dominância da fermentação foi quase sempre dividida entre várias cepas, indica um processo microbiologicamente instável. Migliari (2001) classificou em 12 grupos diferentes as 26 leveduras isoladas da destilaria Alvorada, pela utilização da técnica da capacidade fermentativa, e sugeriu que a instabilidade microbiológica observada está relacionada à utilização de fermento de panificação como inóculo.

Com exceção da levedura 59, todos os isolados apresentaram rendimento em etanol nos níveis alto (21 isolados) e médio (4 isolados).

A maioria das leveduras isoladas nas 3 primeiras coletas apresentou níveis médios para velocidade de consumo de substrato (VCS), nível de conversão de substrato (NCO) e produtividade (PROD). Já a maioria das leveduras isoladas na segunda metade da safra, nas coletas 4, 5 e 6, apresentou níveis altos para VCS, NCO e PROD confirmando as indicações do potencial fermentativo de que o processo selecionou, ao longo da safra, leveduras melhor adaptadas ao ambiente industrial.

Os isolados 56, 62 e 63 apresentaram rendimento em células alto (acima de 0,044g massa seca/g substrato consumido) e tiveram participação populacional de 11,1; 20,4 e 14,3%, respectivamente. Apesar da alta produção de células, essas leveduras mostraram baixa capacidade de se acumular no reator e, portanto, apresentaram pequena participação populacional.

O acompanhamento microbiológico do processo realizado na safra 95/96 permitiu a avaliação e conseqüente melhoria do setor de fermentação, bem como o isolamento das cepas de levedura nativas mais adaptadas e de melhor performance fermentativa.

4.3.1.3 Identificação Taxonômica

Na safra 95/96 da destilaria Diana, foram isolados três tipos de levedura em concentração superior a 10%: *S. cerevisae*, *S. chevalieri* e três isolados de perfil idêntico que, porém, não puderam ser identificados por suas características não coincidirem com nenhum dos perfis descritos por Griffiths (Tabelas 28 e 29). Este último tipo difere do perfil descrito para *S. cerevisae* apenas por assimilar melibiose (Tabela 28). Contudo, Barnett (1992) considera o caráter consumo de melibiose variável para *S. cerevisae*. A espécie *S. chevalieri* apresenta perfil metabólico idêntico ao de *S. cerevisae*. O único aspecto diverso entre essas duas espécies é a presença de células alongadas nos isolados de *S. cerevisae* e a ausência para *S. chevalieri* (Tabelas 28 e 29). A classificação atual de leveduras inclui algumas variedades de *S. chevalieri* na espécie *S. cerevisae* (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 1990).

S. cerevisae dominou a fermentação em 5 dos 6 meses de safra e apenas o quinto mês foi dominado pela levedura não identificada (Tabela 29 e Figura 14). Esta última também esteve presente no início da safra, numa concentração de 15,0%. *S. chevalieri* apareceu somente no segundo mês, numa concentração de 32,6%. Cabrini & Gallo (1999a e 1999b) isolaram *S. cerevisae* como a espécie mais comum na fermentação alcoólica de duas unidades produtoras de etanol. *S. chevalieri* foi isolada na concentração de 3,6%, enquanto *S. cerevisae* foi isolada na concentração de 50,0%, em amostras de fermento centrifugado (Cabrini & Gallo, 1999a).

Tabela 28 – Resultados dos testes para identificação taxonômica dos isolados de leveduras da destilaria Diana, safra 95/96.

Isolado	Maltose ^A	Galactose ^A	Lactose ^A	Nitrato ^A	Eritritol ^A	Amido ^H	Ribitol ^A	37°C	Glic/NaCl	Sacarose ^F	Galactose ^F	Glicose ^F	Sacarose ^A	Inositol ^A	Celobiose ^A	Rafinose ^A	Manitol ^A	Melibiose ^A	Lactose ^F	Xilose ^A	Cél. Along.
48	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
49	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
50	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
51	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
52	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
53	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
54	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
55	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
56	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
61	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
62	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
63	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
66	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
67	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
69	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
70	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

^A Assimilação; ^F Fermentação; ^H Hidrólise.

Tabela 29 – Identificação taxonômica dos isolados dominantes da destilaria Diana, safra 95/96.

Isolado	Código Numérico de Identificação	Espécie
48	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
49	6037-45-1	Não identificada
50	6037-44-0	<i>Saccharomyces chevalieri</i>
51	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
52	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
53	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
54	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
55	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
56	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
61	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
62	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
63	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
66	6037-45-1	Não identificada
67	6037-45-1	Não identificada
69	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
70	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

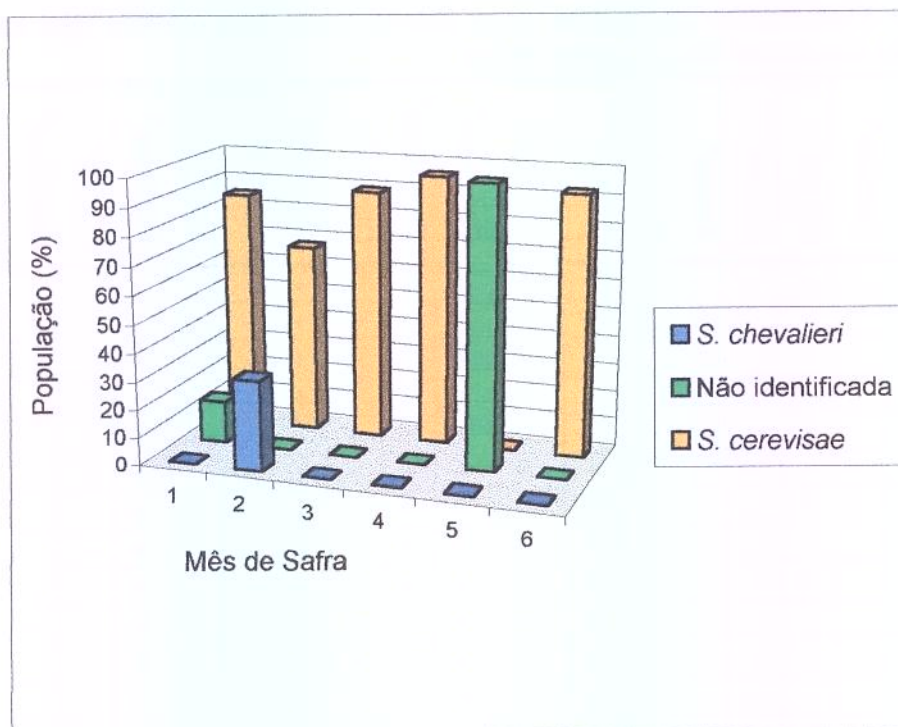


Figura 14 – Participação populacional (%) das espécies de levedura com concentração acima de 10% no vinho levedurado da destilaria Diana, safra 95/96.

4.3.1.4 Cariotipagem

Dezesseis isolados apresentaram participação populacional acima de 10% na safra 95/96 da destilaria Diana (Tabela 25) e foram submetidos a cariotipagem eletroforética, segundo Blondin & Vézinhet (1988) modificado. Os perfis eletroforéticos das leveduras 48 e 49 são mostrados na Figura 15; das leveduras 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56 na Figura 16; das leveduras 61, 63, 66, 67, 69 e 70 na Figura 17. Foram consideradas cepas de levedura diferentes aquelas que apresentaram padrões de bandas cromossômicos diferentes.

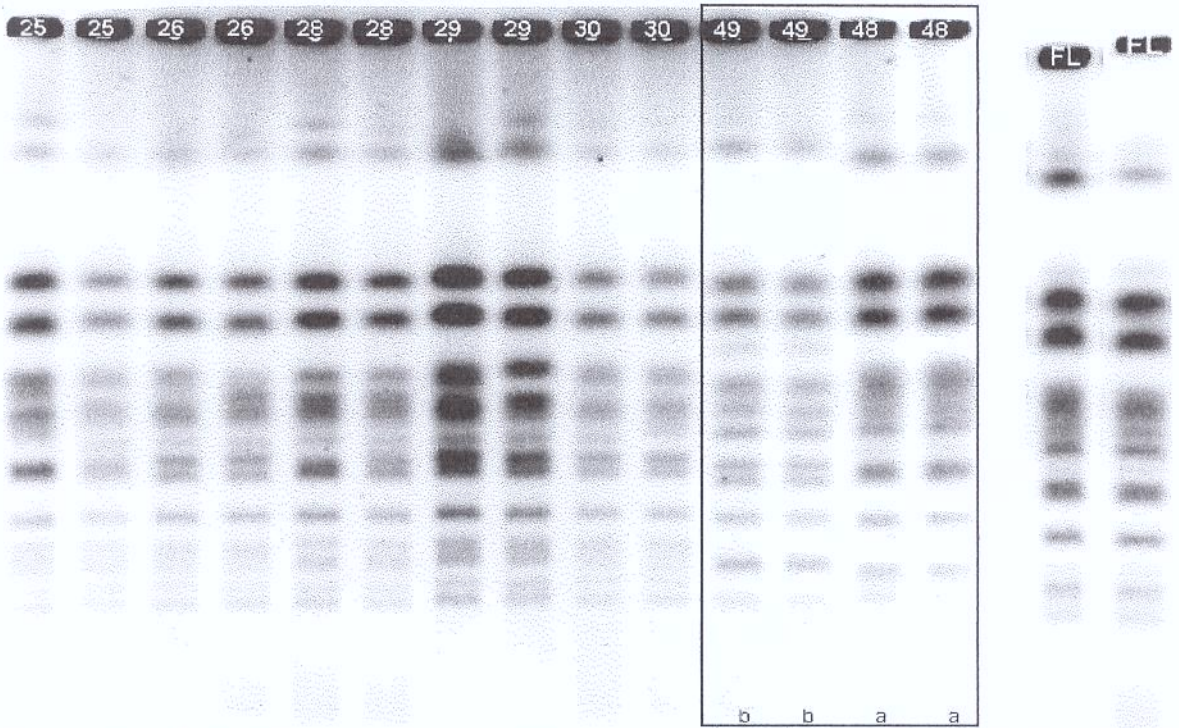


Figura 15 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 95/96 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil. FL mostra o perfil do fermento Fleischmann.

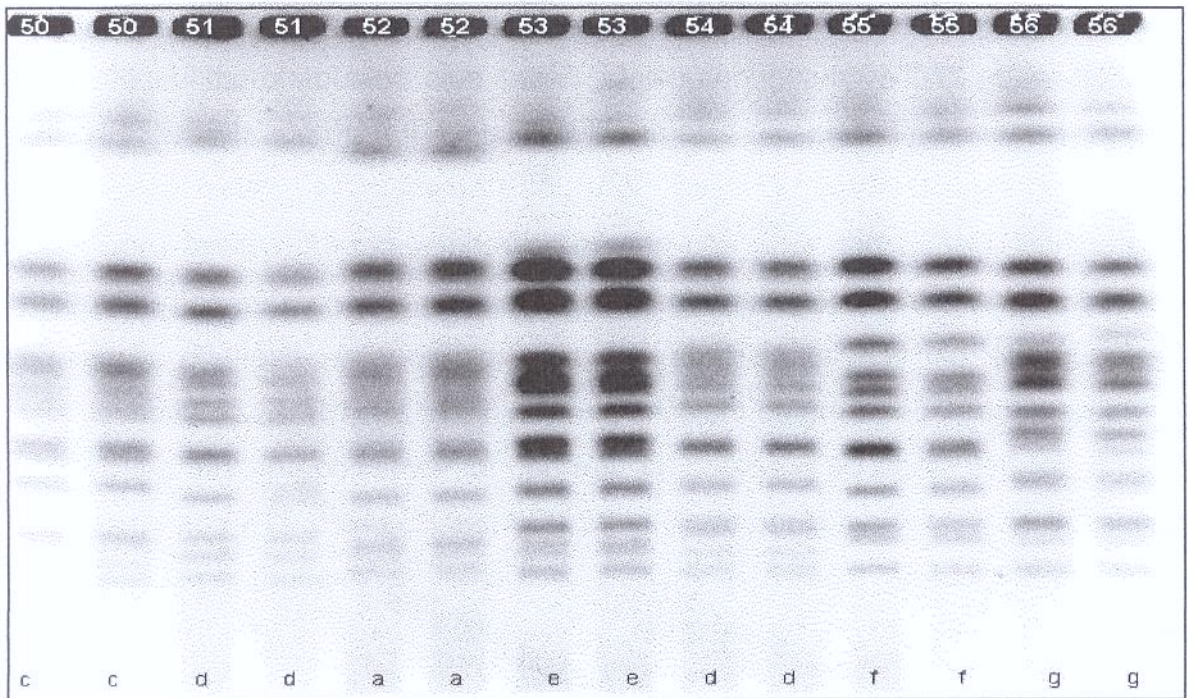


Figura 16 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 95/96 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

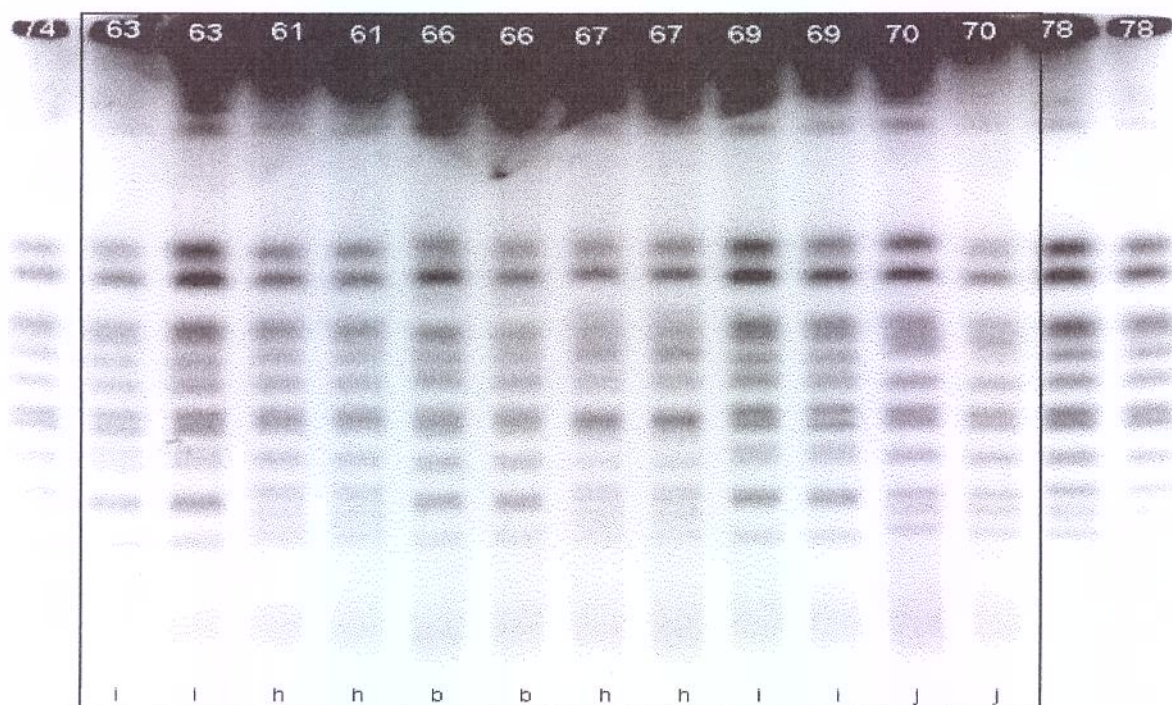


Figura 17 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 95/96 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil

A levedura 48, com participação populacional de 85,0% na primeira coleta, tem perfil cromossômico semelhante ao da levedura 52, que obteve uma participação populacional de 27,9% na segunda coleta. Esses dois isolados foram identificados como *S. cerevisiae* (Tabela 29) e foram classificados em grupos de desempenho fermentativo semelhantes (Tabela 27). A diferença na classificação por desempenho ocorreu por variações quanto ao rendimento em células e ao $\mu_{\max}$. As leveduras 48 e 52 podem ser consideradas a mesma cepa, que correspondem à levedura de panificação utilizada como inóculo, pois apresentam o mesmo padrão de bandas do fermento Fleischmann (Figuras 15 e 16). Essa levedura não voltou a ser detectada no processo, já que não foi verificado nenhum outro perfil cromossômico semelhante durante a safra (Figuras 15, 16 e 17), confirmando o observado em outras pesquisas sobre a utilização de levedura de panificação como inóculo (Basso et al., 1993 e 2000).

As leveduras 49 e 66 apresentaram perfis cromossômicos iguais (Figuras 15 e 16) e também obtiveram o mesmo perfil de consumo de açúcares. Ambas destacaram-se por utilizar melibiose (Tabela 28). Porém, o isolado 66 é floculante

e o 49 não. Esses isolados também apresentaram desempenho fermentativo diverso e foram classificados em grupos diferentes (Tabela 27).

As leveduras 51 e 54 têm perfil cromossômico semelhante (Figura 16), foram identificadas como *S. cerevisiae* (Tabela 29) e classificadas em grupos de desempenho fermentativo semelhantes (Tabela 27). A única variação na classificação pelo desempenho ocorreu por uma pequena diferença no rendimento em células. Porém, o isolado 51 é floculante enquanto que o 54 não é.

As leveduras 63 e 69 apresentaram o mesmo perfil cromossômico (Figura 17), foram identificadas como *S. cerevisiae* (Tabela 29) e são floculantes. No entanto, essas leveduras foram classificadas em grupos de desempenho fermentativo diferentes (Tabela 27).

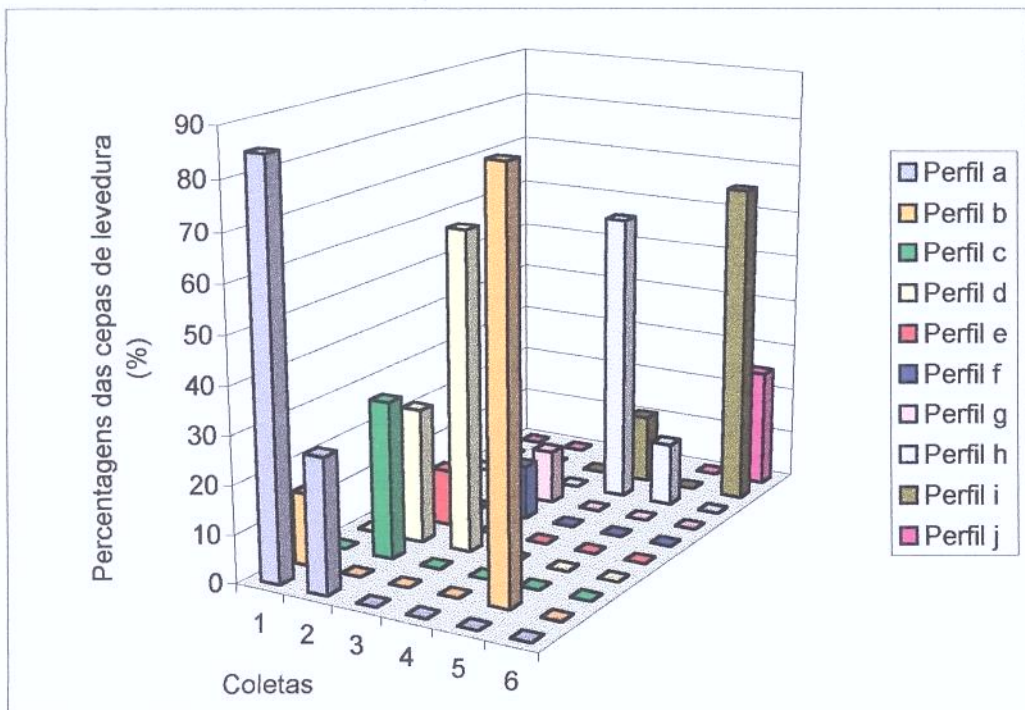


Figura 18 – Percentagens das cepas de levedura da destilaria Diana ao longo da safra 95/96, segundo o perfil cromossômico.

As leveduras 61 e 67 também têm perfis cromossômicos semelhantes (Figura 17), são floculantes e foram classificadas em grupos de desempenho fermentativo muito próximos (Tabela 27), diferindo apenas no rendimento em células. Contudo,

o isolado 61 não consome melibiose enquanto que o isolado 67 é capaz de utilizar esse açúcar (Tabela 29).

As leveduras 50, 53, 55, 56 e 70 apresentaram perfis cromossômicos únicos em relação às outras leveduras dominantes da safra. Ocorreram pelo menos 10 padrões cromossômicos diferentes (Figuras 15, 16, 17 e 18) e 9 grupos de desempenho diferentes nas 26 leveduras dominantes isoladas (Tabela 27). Essa variedade de padrões reflete a instabilidade microbiológica do processo em que diferentes cepas de levedura se sucedem e dividem a dominância da fermentação.

4.3.2. SAFRA 99/00

4.3.2.1 Leveduras Isoladas

Na safra 99/00 da destilaria Diana, o inóculo utilizado foi uma levedura isolada da safra anterior.

Nesta safra, foram isoladas 49 leveduras (Tabela 30). Em todas as coletas verificou-se a presença de 3 colônias de morfologias diferentes crescendo em WLN. A partir da segunda coleta, foram selecionadas 3 colônias de cada um dos 3 tipos morfológicos verificados. Desta maneira, pôde-se avaliar a capacidade de diferenciação de cepas de leveduras proporcionada pelo meio diferencial WLN, bem como a reprodutibilidade dos métodos de diferenciação de leveduras por desempenho e da cariotipagem utilizados neste trabalho.

Na primeira coleta, realizada aos 30 dias de safra, observou-se que uma única levedura dominou a fermentação obtendo uma participação populacional de 86,4% (Tabela 30). Provavelmente este isolado seja a levedura utilizada como inóculo. A partir da segunda coleta, as 3 leveduras isoladas dividiram a dominância da fermentação apresentando valores de participação populacional que variaram de 10,2 a 77,3%, na terceira coleta, e de 13,0 a 55,2%, nas coletas subseqüentes.

Um dos tipos morfológicos de colônias de levedura encontrados nas coletas 2 a 6 apresentou variação de coloração da colônia em relação aos outros dois isolados. Estes isolados variantes aparecem identificados com asteriscos na Tabela 30.

Apesar de não haver uma única levedura dominante em todas as coletas, o padrão de 3 isolados dividindo a dominância foi mantido por toda a safra e revelou um processo com maior estabilidade microbiológica. Situação diversa foi observada na safra 95/96 da mesma unidade, quando o número de isolados por coleta variou de 2 a 7, com participações populacionais de 0,4 a 85,0% (Tabela 25).

Tabela 30 – Leveduras isoladas na safra 99/00 da destilaria Diana.

Coleta	Isolado	Concentração (UFC/ml)	Participação Populacional (%)
IN	74	---	100,0
1	75	$1,9 \times 10^9$	86,4
	76	$2,0 \times 10^8$	9,1
	77	$1,0 \times 10^8$	4,5
	78; 79; 80	$6,8 \times 10^8$	77,3
2	81; 82; 83	$1,1 \times 10^8$	12,5
	84; 85; 86*	$9,0 \times 10^7$	10,2
	87; 88; 89*	$1,5 \times 10^8$	55,5
3	90; 91; 92	$8,5 \times 10^7$	31,5
	93; 94; 95	$3,5 \times 10^7$	13,0
	96; 97; 98	$6,4 \times 10^8$	55,2
4	99; 100; 101*	$3,4 \times 10^8$	29,3
	102; 103; 104	$1,8 \times 10^8$	15,5
	105; 106; 107*	$4,4 \times 10^8$	47,3
5	108; 109; 110	$2,6 \times 10^8$	28,0
	111; 112; 113	$2,3 \times 10^8$	24,7
	114; 115; 116*	$2,6 \times 10^8$	43,3
6	117; 118; 119	$1,9 \times 10^8$	31,7
	120; 121; 122	$1,5 \times 10^8$	25,0

* Variação de um padrão morfológico de colônia.

4.3.2.2 Avaliação das Leveduras pelo Potencial Fermentativo e Classificação por Performance

Dos 3 tipos de levedura amostrados em cada coleta, um apresentou potencial fermentativo inferior ao da levedura padrão (Tabelas 31 e 32). Os isolados desse grupo (76; 84-86; 87-89; 99-101; 105-107; 114-116) não consumiram todo o substrato e alguns apresentaram rendimento em glicerol ($Y_{P/S}$) acima da média.

Porém, as leveduras desse grupo obtiveram valores altos para rendimento em etanol. Os isolados que apresentaram variação na morfologia de colônia pertencem a esse grupo. Pode-se notar que essas leveduras variantes apresentaram potencial fermentativo maior que os outros dois isolados do mesmo grupo. As leveduras variantes consumiram quase todo o substrato e obtiveram valores de rendimento em glicerol ($Y_{P/S}$) abaixo de 0,0445g glicerol/g substrato consumido. O padrão de potencial fermentativo apresentado pelas leveduras desse grupo repetiu-se por toda a safra demonstrando que as leveduras isoladas como variantes morfológicas pertenciam a uma cepa diferente dos outros dois isolados do grupo.

Os outros dois grupos de levedura isolados ao longo da safra obtiveram potencial fermentativo equivalente ao da cepa padrão (Tabelas 31 e 32). Essas leveduras consumiram todo o substrato, apresentaram valores superiores a 0,4481g etanol/g substrato consumido para rendimento em etanol e valores baixos para rendimentos em glicerol, ácidos e células.

Os 49 isolados de leveduras da safra 99/00 da destilaria Diana foram classificados pela capacidade fermentativa (Andrietta et al., 1999) em apenas 2 grupos (Tabelas 33 e 34). Do total dos isolados, 38 leveduras foram classificadas no grupo 211.211 e 11 leveduras no grupo 233.231. Todas as leveduras que apresentaram potencial fermentativo adequado (Tabelas 31 e 32) foram incluídas no grupo 211.211, inclusive as leveduras "variantes" do grupo que apresentou potencial fermentativo desfavorável. As representantes desse último grupo foram incluídas no grupo 233.231 e são as 11 leveduras (76, 84, 85, 87, 88, 99, 100, 105, 106, 114 e 115) que obtiveram potencial fermentativo inferior ao da cepa padrão.

Tabela 31 – Valores de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido), rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), rendimento em ácidos ($Y_{ac/s}$ – g ácido/g substrato consumido), rendimento em glicerol ($Y_{g/s}$ – g glicerol/g substrato consumido), relação ART residual/ART consumido (R_r – g açúcar residual/g açúcar consumido) e Potencial Fermentativo (PF) dos isolados de levedura da destilaria Diana (safra 99/00) e cepa padrão.

Isolado	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{g/s}$	R_r	PF
Padrão	0,4600	0,0400	0,0080	0,0450	0,0100	0
74	0,4774	0,0412	0,0049	0,0448	0,0032	45,76
75	0,4711	0,0411	0,0046	0,0430	0,0128	32,45
76	0,4569	0,0425	0,0084	0,0650	2,0914	-1105,60
77	0,4713	0,0416	0,0047	0,0426	0,0095	32,21
78	0,4579	0,0412	0,0049	0,0429	0,0041	6,62
79	0,4618	0,0412	0,0058	0,0409	0,0028	17,36
80	0,4672	0,0440	0,0063	0,0419	0,0111	7,26
81	0,4540	0,0410	0,0060	0,0413	0,0028	-0,14
82	0,4650	0,0424	0,0060	0,0423	0,0028	14,48
83	0,4715	0,0432	0,0061	0,0420	0,0028	25,23
84	0,4878	0,0422	0,0093	0,0577	116,91	-58431,40
85	0,5199	0,0443	0,0096	0,0644	184,38	-92123,20
86*	0,4688	0,0434	0,0062	0,0436	0,0480	-8,32
87	0,5113	0,0440	0,0099	0,0608	159,39	-79641,60
88	0,4705	0,0439	0,0089	0,0514	546,13	-273074,0
89*	0,4604	0,0417	0,0058	0,0426	0,5405	-260,48
90	0,4686	0,0416	0,0060	0,0436	0,0100	19,72
91	0,4630	0,0419	0,0058	0,0420	0,0100	10,61
92	0,4700	0,0431	0,0060	0,0431	0,0100	16,72
93	0,4702	0,0435	0,0065	0,0428	0,0100	14,37
94	0,4665	0,0434	0,0063	0,0428	0,0100	7,35
95	0,4615	0,0439	0,0056	0,0412	0,0100	-0,30

* Variação de um padrão morfológico de colônia.

Tabela 32 – Valores de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido), rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido), rendimento em ácidos ($Y_{ac/s}$ – g ácido/g substrato consumido), rendimento em glicerol ($Y_{g/s}$ – g glicerol/g substrato consumido), relação ART residual/ART consumido (R_r – g açúcar residual/g açúcar consumido) e Potencial Fermentativo (PF) dos isolados de levedura da destilaria Diana (safra 99/00) e cepa padrão.

Isolado	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{g/s}$	R_r	PF
Padrão	0,4600	0,0400	0,0080	0,0450	0,0100	0
96	0,4528	0,0423	0,0056	0,0399	0,0100	-8,64
97	0,4555	0,0419	0,0062	0,0436	0,0100	-10,36
98	0,4511	0,0436	0,0061	0,0436	0,0100	-28,39
99	0,4574	0,0430	0,0081	0,0536	297,73	-148898,0
100	0,4513	0,0433	0,0078	0,0539	292,15	-146123,0
101*	0,4502	0,0433	0,0066	0,0433	0,8620	-455,48
102	0,4517	0,0419	0,0066	0,0431	0,0100	-19,11
103	0,4539	0,0435	0,0063	0,0436	0,0100	-22,31
104	0,4527	0,0434	0,0064	0,0430	0,0100	-23,41
105	0,4638	0,0414	0,0083	0,0520	321,37	-160695,0
106	0,4548	0,0441	0,0085	0,0564	428,34	-214221,0
107*	0,4755	0,0435	0,0063	0,0421	0,2555	-94,94
108	0,4766	0,0441	0,0061	0,0427	0,0100	26,85
109	0,4655	0,0432	0,0064	0,0426	0,0100	6,41
110	0,4747	0,0432	0,0068	0,0433	0,0100	23,26
111	0,4741	0,0424	0,0065	0,0421	0,0100	29,77
112	0,4700	0,0427	0,0068	0,0419	0,0100	18,70
113	0,4559	0,0436	0,0070	0,0405	0,0100	-13,69
114	0,5207	0,0440	0,0111	0,0649	986,22	-493049,0
115	0,4598	0,0440	0,0103	0,0647	78,21	-39172,4
116*	0,4645	0,0417	0,0064	0,0445	0,01353	-35,77
117	0,4521	0,0420	0,0066	0,0435	0,0056	-17,57
118	0,4702	0,0411	0,0066	0,0426	0,0001	31,66
119	0,4657	0,0416	0,0065	0,0438	0,0003	16,35
120	0,4633	0,0410	0,0063	0,0436	0,0023	14,31
121	0,4577	0,0420	0,0063	0,0446	0,0001	-3,68
122	0,4600	0,0415	0,0063	0,0440	0,0001	4,79

* Variação de um padrão morfológico de colônia.

Os 49 isolados obtiveram valores médios para rendimento em células (de 0,0410 a 0,0443g massa seca/g substrato consumido). Esses valores superam, com poucas exceções, aqueles obtidos pelas leveduras isoladas das destilarias Clealco e Unialco. A característica da destilaria Diana de operar com leveduras que apresentam produção de células acima da observada pela maioria das leveduras isoladas de outras indústrias certamente tem origem na necessidade de manter alta a concentração de células nos reatores. Na destilaria Diana, os reatores de fermentação operam com uma concentração média de células de 45%, enquanto que nas outras indústrias a concentração média é de 16%.

Os 38 isolados incluídos no grupo 211.211 (Tabelas 33 e 34) apresentaram rendimento em etanol, produtividade, velocidade de consumo de substrato e nível de conversão de substrato altos e representam leveduras adequadas ao uso industrial.

Os 11 isolados incluídos no grupo 233.231 (Tabelas 33 e 34) apresentaram produtividade, velocidade de consumo de substrato e nível de conversão de substrato baixos e produtividade em etanol alta. As leveduras do grupo 233.231 foram os isolados de maior participação populacional nas coletas 3, 5 e 6 com concentrações de 55,5; 47,3; e 43,3%, respectivamente. Estes isolados são as 11 leveduras que não consumiram todo o substrato durante o período de realização dos ensaios de fermentação. Contudo, essas leveduras apresentaram rendimentos em etanol altos e, apesar de mostrarem consumo de açúcar lento, são eficientes na conversão de açúcar em etanol. Esta característica não representa problemas ao processo da destilaria Diana, já que o atraso observado na conversão açúcar-etanol é compensado pela alta concentração de células no reator, que impede a queda de produtividade da unidade de fermentação.

Os isolados "variantes morfológicos" foram classificados no grupo 233.231 e as avaliações de desempenho fermentativo revelaram serem outra cepa de levedura. Os outros tipos morfológicos de colônias em WLN foram incluídos no grupo 211.211. Todas as colônias de mesmo padrão morfológico em WLN foram incluídas no mesmo grupo fermentativo e apresentaram potencial fermentativo similar. Estes ensaios indicam que o WLN e a técnica de classificação de cepas

pelo desempenho fermentativo proposta por Andrietta et al. (1999) tem capacidade de diferenciação de cepas de levedura e reprodutibilidade adequadas para avaliação de cepas industriais de levedura.

Tabela 33 – Valores de rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido); velocidade de consumo de substrato (VCS – g substrato/l/h); nível de conversão de substrato (NCS - %); velocidade específica máxima de crescimento (μ_m – 1/h); produtividade (PROD – g etanol/l/h) e rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido) das leveduras isoladas e inóculo da destilaria Diana na safra 99/00.

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_m	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
74	0,0412	5,81	99,65	0,50	2,60	0,4774	211.211 ^F
75	0,0411	5,80	99,44	0,48	2,56	0,4711	211.211 ^F
76	0,0425	4,01	68,81	0,55	1,68	0,4569	233.231 ^F
77	0,0416	5,80	99,51	0,47	2,56	0,4713	211.211 ^F
78	0,0412	5,81	99,62	0,51	2,49	0,4579	211.211 ^F
79	0,0412	5,80	99,50	0,47	2,51	0,4618	211.211 ^F
80	0,0440	5,80	99,50	0,49	2,54	0,4672	211.211 ^F
81	0,0410	5,80	99,50	0,48	2,47	0,4540	211.211 ^F
82	0,0424	5,80	99,50	0,49	2,53	0,4650	211.211 ^F
83	0,0432	5,80	99,50	0,46	2,57	0,4715	211.211 ^F
84	0,0422	4,45	76,36	0,46	2,00	0,4878	233.231 ^F
85	0,0443	3,92	67,27	0,45	1,86	0,5199	233.231 ^F
86*	0,0434	5,80	99,49	0,46	2,55	0,4688	211.211 ^F
87	0,0440	4,10	70,35	0,48	1,92	0,5113	233.231 ^F
88	0,0439	4,14	71,14	0,49	1,79	0,4705	233.231 ^F
89*	0,0417	5,80	99,46	0,52	2,50	0,4604	211.211 ^F
90	0,0416	5,80	99,50	0,50	2,55	0,4686	211.211 ^F
91	0,0419	5,80	99,50	0,50	2,52	0,4630	211.211 ^F
92	0,0431	5,80	99,50	0,50	2,55	0,4700	211.211 ^F
93	0,0435	5,80	99,50	0,50	2,56	0,4702	211.211 ^F
94	0,0434	5,80	99,50	0,49	2,54	0,4665	211.211 ^F
95	0,0439	5,80	99,50	0,49	2,51	0,4615	211.211 ^F

^F cepa floculante; * variação de um padrão morfológico de colônia.

Tabela 34 – Valores de rendimento em células ($Y_{x/s}$ – g massa seca/g substrato consumido); velocidade de consumo de substrato (VCS – g substrato/l/h); nível de conversão de substrato (NCS - %); velocidade específica máxima de crescimento (μ_m – 1/h); produtividade (PROD – g etanol/l/h) e rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ – g etanol/g substrato consumido) das leveduras isoladas e inóculo da destilaria Diana na safra 99/00.

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_m	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
96	0,0423	5,80	99,50	0,51	2,46	0,4528	211.211 ^F
97	0,0419	5,80	99,50	0,48	2,48	0,4555	211.211 ^F
98	0,0436	5,80	99,50	0,48	2,45	0,4511	211.211 ^F
99	0,0430	4,78	81,94	0,53	2,02	0,4574	233.231 ^F
100	0,0433	4,79	82,21	0,55	2,00	0,4513	233.231 ^F
101*	0,0433	5,80	99,44	0,47	2,44	0,4502	211.211 ^F
102	0,0419	5,80	99,50	0,50	2,45	0,4517	211.211 ^F
103	0,0435	5,80	99,50	0,49	2,46	0,4539	211.211 ^F
104	0,0434	5,80	99,50	0,50	2,46	0,4527	211.211 ^F
105	0,0414	4,71	80,81	0,53	2,01	0,4638	233.231 ^F
106	0,0441	4,19	75,80	0,54	1,85	0,4548	233.231 ^F
107*	0,0435	5,80	99,48	0,47	2,58	0,4755	211.211 ^F
108	0,0441	5,80	99,50	0,46	2,59	0,4766	211.211 ^F
109	0,0432	5,80	99,50	0,49	2,53	0,4655	211.211 ^F
110	0,0432	5,80	99,50	0,48	2,58	0,4747	211.211 ^F
111	0,0424	5,80	99,50	0,49	2,58	0,4741	211.211 ^F
112	0,0427	5,80	99,50	0,49	2,55	0,4700	211.211 ^F
113	0,0436	5,80	99,50	0,49	2,48	0,4559	211.211 ^F
114	0,0440	3,37	57,85	0,48	1,59	0,5207	233.231 ^F
115	0,0440	3,77	64,63	0,50	1,58	0,4598	233.231 ^F
116*	0,0417	5,79	99,41	0,47	2,52	0,4645	211.211 ^F
117	0,0420	5,80	99,50	0,47	2,46	0,4521	211.211 ^F
118	0,0411	5,80	99,51	0,48	2,56	0,4702	211.211 ^F
119	0,0416	5,80	99,51	0,46	2,53	0,4657	211.211 ^F
120	0,0410	5,80	99,50	0,47	2,52	0,4633	211.211 ^F
121	0,0420	5,80	99,51	0,46	2,49	0,4577	211.211 ^F
122	0,0415	5,80	99,50	0,45	2,50	0,4600	211.211 ^F

^F cepa floculante; * variação de um padrão morfológico de colônia.

4.3.2.3 Identificação Taxonômica

Das 49 leveduras isoladas na safra 99/00 da destilaria Diana, 28 foram selecionadas para identificação taxonômica segundo Griffiths (1981). Entre essas leveduras estão o inóculo e os isolados das coletas 2, 4 e 6 (Tabela 30).

Na safra 99/00, todas as leveduras testadas pertencem à espécie *S. cerevisiae* (Tabela 36 e Figura 19). Já na safra 95/96, foram identificadas como leveduras dominantes da fermentação da destilaria Diana as espécies *S. cerevisiae* e *S. chevalieri* e também uma levedura com perfil semelhante ao de *S. cerevisiae*, mas que consome melibiose.

S. cerevisiae foi isolada como a espécie mais comum de dois processos de fermentação diferentes (Cabrini & Gallo, 1999a e 1999b) com concentrações de 50,0 e 41,2%, respectivamente.

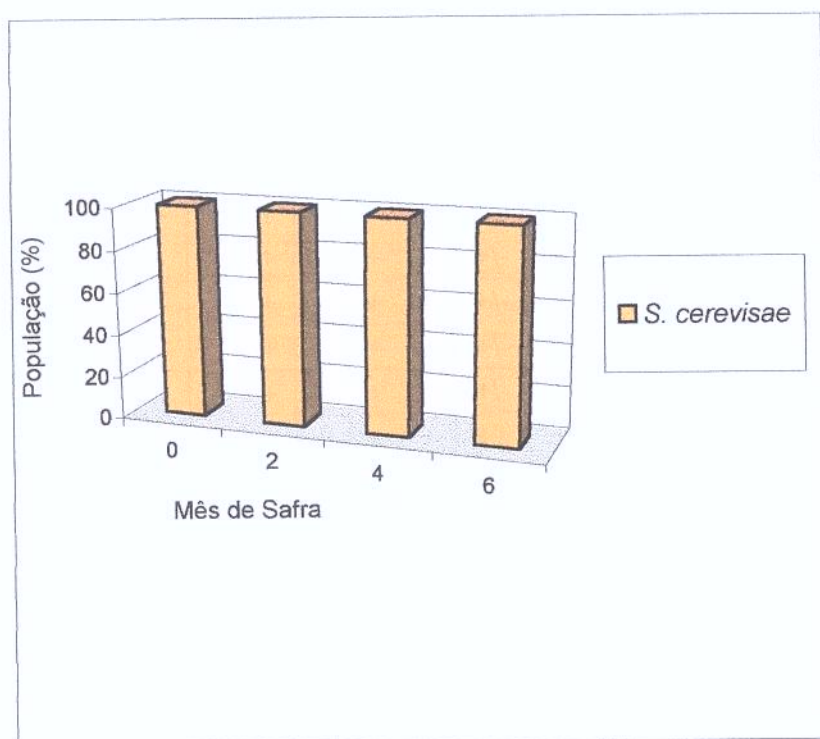


Figura 19 – Participação populacional (%) das espécies de levedura com concentração acima de 10% no vinho levedurado da destilaria Diana, safra 99/00.

Tabela 35 – Resultados dos testes para identificação taxonômica dos isolados de leveduras da destilaria Diana, safra 99/00.

Isolado	Maltose ^A	Galactose ^A	Lactose ^A	Nitrato ^A	Eritritol ^A	Amido ^H	Ribitol ^A	37°C	Glic/NaCl	Sacarose ^F	Galactose ^F	Glicose ^F	Sacarose ^A	Inositol ^A	Celobiose ^A	Rafinose ^A	Manitol ^A	Melibiose ^A	Lactose ^F	Xilose ^A	Cél. Along.
74	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
78	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
79	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
80	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
81	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
82	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
83	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
84	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
85	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
86	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
96	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
97	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
98	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
99	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
100	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
101	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
102	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
103	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
104	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
114	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
115	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
116	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
117	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
118	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
119	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
120	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
121	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
122	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

^A Assimilação; ^F Fermentação; ^H Hidrólise.

Tabela 36 – Identificação taxonômica dos isolados dominantes da destilaria Diana, safra 99/00.

Isolado	Código Numérico de Identificação	Espécie
74	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
78	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
79	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
80	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
81	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
82	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
83	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
84	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
85	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
86	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
96	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
97	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
98	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
99	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
100	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
101	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
102	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
103	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
104	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
114	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
115	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
116	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
117	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
118	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
119	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
120	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
121	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
122	6037-44-1	<i>Saccharomyces cerevisae</i>

4.3.2.4 Cariotipagem

Vinte e oito isolados da safra 99/00 da destilaria Diana (Tabela 30) foram submetidos à cariotipagem eletroforética, segundo Blondin & Vézinhet (1988) modificado. Entre essas leveduras estão o inóculo e os isolados das coletas 2, 4 e 6. Os perfis eletroforéticos das leveduras 74 e 78 são mostrados na Figura 20; das leveduras 79, 80, 81, 82, 83, 84 e 85 na Figura 21; das leveduras 86, 96, 97, 98, 99, 100, 101 e 102 na Figura 22; das leveduras 103, 104, 114, 115, 116, 117 e 118 na Figura 23; das leveduras 119, 120, 121 e 122 na Figura 24. Foram consideradas cepas de levedura diferentes aquelas que apresentaram padrões de bandas cromossômicas diferentes.

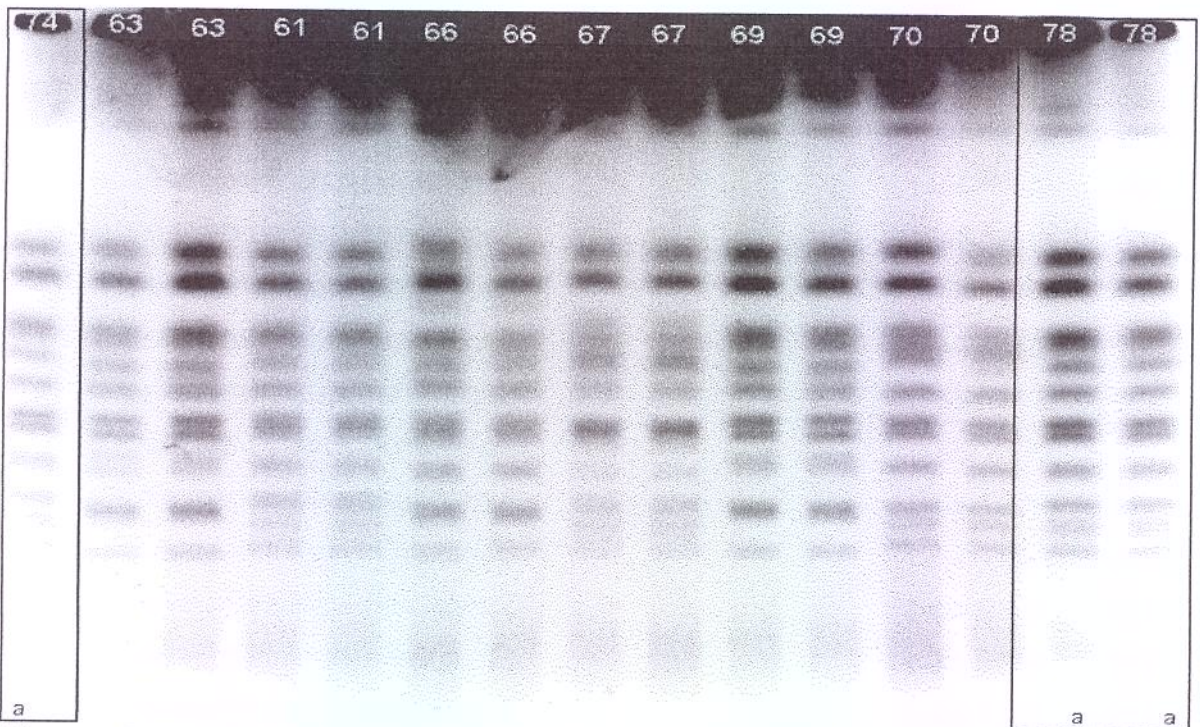


Figura 20 – As molduras mostram os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 99/00 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

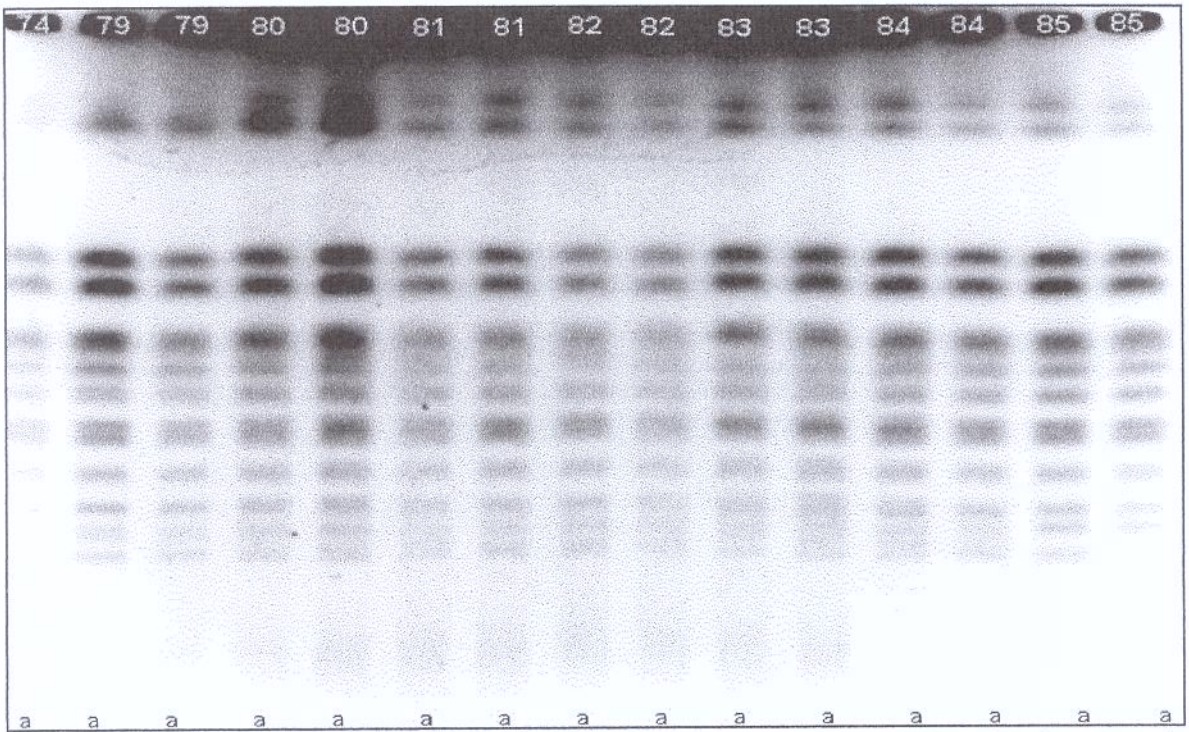


Figura 21 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 99/00 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

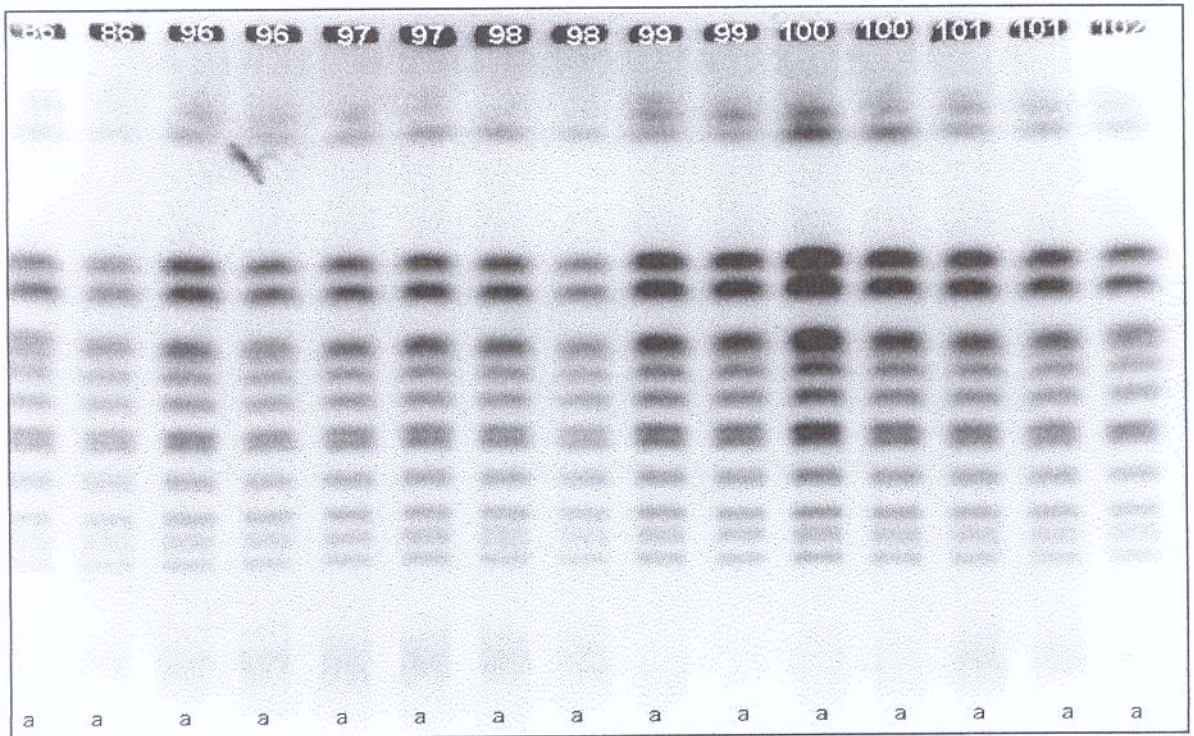


Figura 22 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 99/00 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

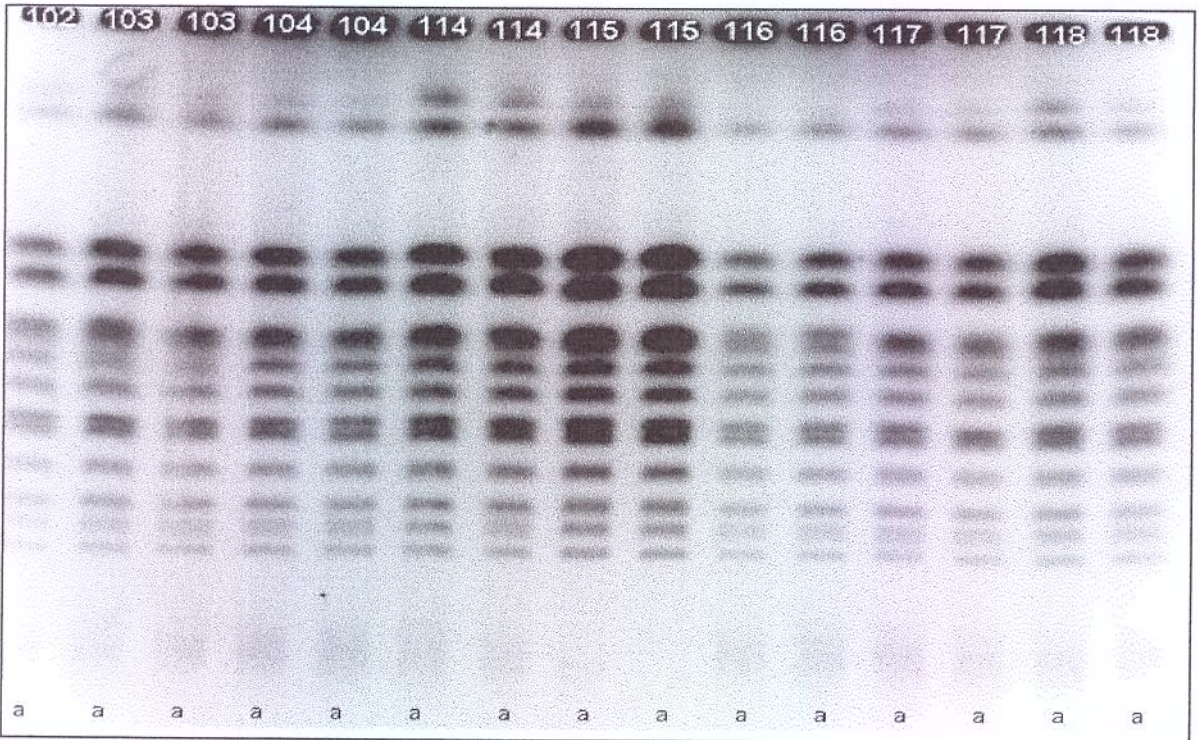


Figura 23 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 99/00 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

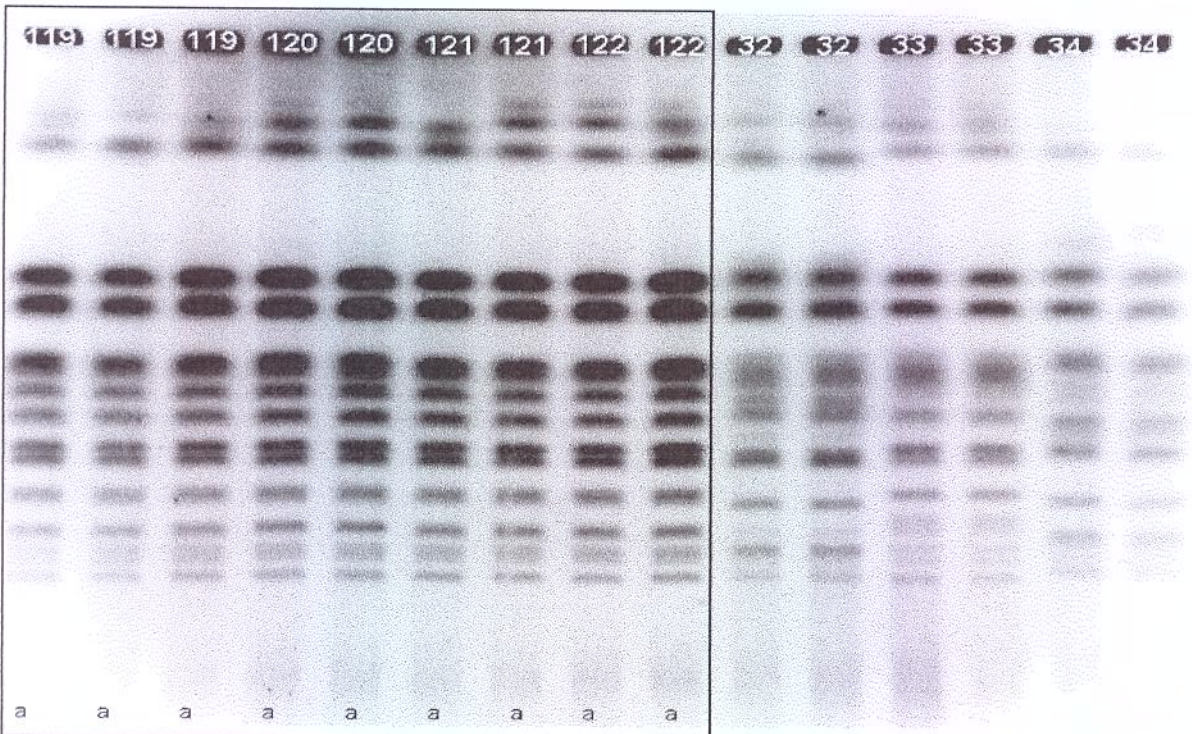


Figura 24 – A moldura mostra os perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 99/00 da destilaria Diana. Letras iguais indicam o mesmo perfil.

Todas as leveduras analisadas da safra 99 da destilaria Diana apresentaram o mesmo perfil cromossômico (Figuras 20, 21, 22, 23, 24 e 25). Os perfis bioquímicos também foram iguais para todos os isolados analisados, que foram identificados como *S. cerevisiae* (Tabela 35). No entanto, os isolados 84, 85, 87, 88, 99, 100, 105, 106, 114 e 115 apresentaram desempenho fermentativo diferente das outras leveduras e foram classificados em um grupo distinto (Tabelas 33 e 34).

A permanência do perfil cromossômico do inóculo durante toda a safra (Figura 25) reflete a adequação dessa levedura à planta de fermentação e a estabilidade microbiológica proporcionada pela escolha de um inóculo apropriado. Resultados inversos puderam ser verificados na safra 95, quando foi utilizado fermento de panificação como inóculo.

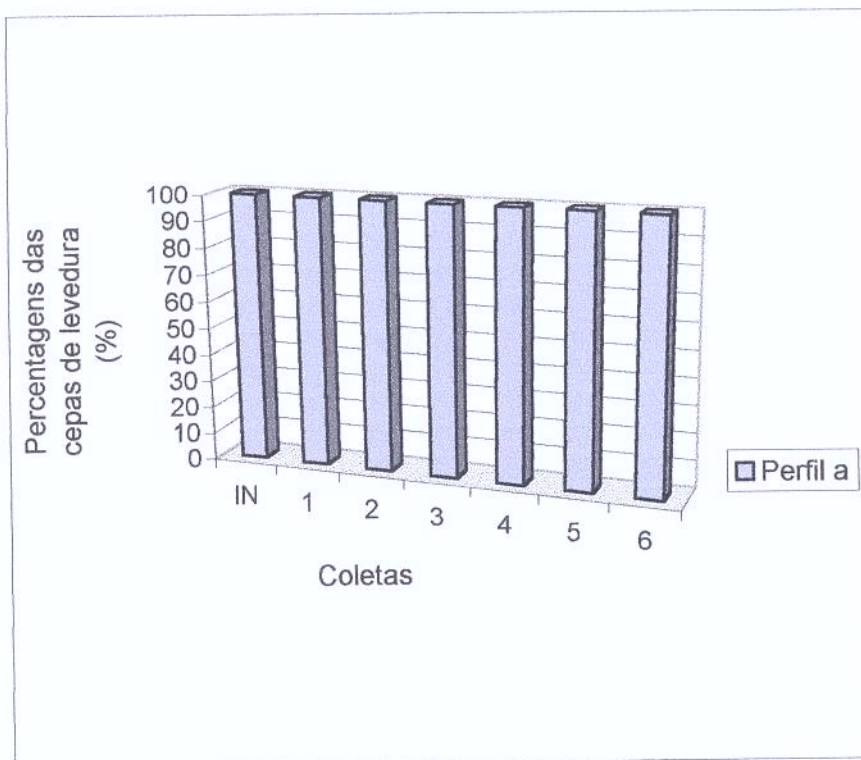


Figura 25 – Percentagens das cepas de levedura da destilaria Diana ao longo da safra 99/00, segundo o perfil cromossômico.

5. CONCLUSÕES

Todas as 73 leveduras isoladas das três unidades de fermentação estudadas numa concentração superior a 10% foram identificadas como representantes da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, segundo o sistema de classificação atualmente aceito (Kreger-Van Rij, 1984 e Barnett et al., 1990). O estudo revelou que as leveduras nativas ou artificialmente inoculadas, presentes na fermentação em concentrações capazes de interferir no processo, pertencem à espécie *S. cerevisiae*. Muitas dessas leveduras foram incapazes de consumir maltose, como todos os isolados dominantes da destilaria Clealco nas safras 95/96 e 96/97, e grande parte das leveduras dominantes da destilaria Unialco, safra 97/98. Na safra 95/96 da destilaria Diana, três isolados foram capazes de consumir melibiose, sendo que um deles dominou o processo em uma das coletas.

O meio de cultivo diferencial para leveduras WLN mostrou-se eficiente na distinção de cepas *S. cerevisiae* isoladas da fermentação alcoólica. Todas repetições das colônias de mesma morfologia obtiveram perfil cromossômico e de desempenho fermentativo iguais. O isolamento de todas as leveduras de uma amostra, numa diluição exeqüível (Schütz & Gafner, 1993), ou a utilização de um meio diferencial eficaz para leveduras, são métodos de isolamento estatisticamente mais exatos e que reproduzem melhor a distribuição das cepas nas amostras, do que apenas a seleção de colônias ao acaso.

Nos processos microbiologicamente estáveis estudados (Clealco 95/95 e 96/97; Diana 99/00) as cepas dominantes obtiveram desempenho fermentativo adequado e participação populacional elevada. Esta observação viabiliza a utilização de um meio diferencial eficiente, como o WLN, como técnica exclusiva de controle industrial das populações de levedura, quando sua performance já é conhecida.

A cariotipagem de leveduras pelo sistema CHEF mostrou-se capaz de diferenciar cepas de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação alcoólica. Através dos padrões cromossômicos das leveduras, puderam ser acompanhados o desaparecimento do inóculo e uma variedade de cepas de levedura se sucedendo na dominância do processo, nas safras que utilizaram fermento de panificação como "starter"

(Unialco 97/98; Diana 95/96). Nas safras em que foram utilizadas como inóculo leveduras isoladas do próprio processo (Clealco 95/96 e 96/97; Diana 99/00), a manutenção dessa cepa ao longo da safra pôde ser verificada através da cariotipagem.

Nas safras que apresentaram instabilidade microbiológica, com grande número de isolados diferentes (Unialco 97/98 e Diana 95/96), as leveduras mostraram maior diversidade de padrões cromossômicos do que de grupos de desempenho fermentativo. Nas safras em que o inóculo foi isolado do próprio processo e dominou a fermentação (Clealco 95/96 e 96/97; Diana 99/00) houve poucos isolados diferentes, porém o número de grupos de desempenho fermentativo foi maior do que o de padrões cromossômicos. A cariotipagem mostrou-se uma técnica eficiente para diferenciar e identificar cepas de *S. cerevisiae* da fermentação alcoólica. Contudo, o padrão cromossômico de uma levedura pode tornar-se um caráter “vazio”, para a análise de um processo industrial, se não estiver acompanhado da determinação da sua performance fermentativa. A necessidade da determinação do desempenho industrial de uma levedura também se justifica pela ocorrência de cepas que apresentaram diferenças significativas de desempenho fermentativo, mesmo apresentando padrões cromossômicos iguais, como ocorreu na destilaria Clealco (safras 95/96 e 96/97) e na safra 99/00 da destilaria Diana. Os dados obtidos indicam que a determinação do desempenho fermentativo, além de avaliar a performance industrial de uma cepa de levedura, pode proporcionar a diferenciação final entre cepas de mesmo cariótipo.

As técnicas do Potencial Fermentativo e da Capacidade Fermentativa revelaram-se de grande valia na avaliação das características industriais de leveduras. A primeira tem grande potencial de aplicação no controle da fermentação e seleção de cepas de leveduras pela indústria. A Capacidade Fermentativa associada à cariotipagem formam um conjunto de ferramentas de pesquisa eficaz e suficiente para a identificação de cepas de levedura na fermentação alcoólica.

As unidades de fermentação alcoólica no Brasil são processos abertos, onde é grande o aporte de leveduras nativas à fermentação. Nas safras estudadas, a estabilidade microbiológica esteve relacionada à utilização como inóculo de uma

levedura isolada do próprio processo. Os cariótipos obtidos nesta pesquisa sugeriram a ocorrência de cepas de levedura nativas específicas para cada unidade industrial, da mesma maneira que o encontrado para a produção de vinhos (Vezinhét et al., 1992; Verzavaud et al., 1995; Guillamón et al., 1996; Nadal, 1996; Pramateftaki, 2000). A seleção de inóculos a partir de leveduras isoladas das próprias unidades industriais representa a utilização de fermentos mais adaptados e, portanto, com maiores garantias de estabilidade microbiológica para os processos de fermentação alcoólica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.R. **Álcool e Destilaria**. Piracicaba: Nathanael dos Santos, mimeogr., 1940. v.5, p.55-85.
2. ALMEIDA, J.R. Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinott. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. **Anais**. p.254-262.
3. ANDERSON, P.J.; McNEIL, K.; WATSON, K. Isolation and identification of thermotolerant yeasts from Australian sugar cane mills. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.1691-1698, 1988.
4. ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial**. Campinas, 1994. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
5. ANDRIETTA, S.R. Conceitos de processos de fermentação alcoólica contínua. In: **Atualização Tecnológica na Indústria Sucroalcooleira**: Apostila do curso. Piracicaba, 1997. CPQBA-UNICAMP/STAB, 12 p.
6. ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.13, n.4, p.22-25, 1995.
7. ANDRIETTA, S.R.; SERRA, G.E. Leveduras não fermentativas – processo de instalação e forma de detecção e eliminação. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.15, n.6, p.32-35, 1997.
8. ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.17, n.5, p.54-59, 1999.

9. A.O.A.C. Fruits and fruits products. In: **Official Methods of Analysis**, 16 ed. Washington, DC: Association Official of Analytical Chemists, 1997. p. 10.
10. BALEIRAS-COUTO, M.M.; VOGELS, J.T.W.E.; HOFSTRA, H.; HIS IN'T VELD, J.H.J.; VAN DER VOSSEN, J.M.B.M. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.525-535, 1995.
11. BANCROFT, I.; WOLK, C.P. Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). **Nucleic Acid Research**, v.16, p.7405-7418, 1988.
12. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 811p.
13. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1002p.
14. BARNETT, J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. **Yeasts**, v.8, p.1-23, 1992.
15. BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro, 1993. **Anais**. p.45-250.
16. BASSO, L.C.; AMORIN, H.V.; ALVES, D.M.G. Seleção de leveduras para a fermentação alcoólica. In: SINAFERM, 13., Teresópolis, 2000. **Anais**. doc.35.
17. BENDO VÁ, O.; RICHTER, V.; JANDEROVÁ, B.; HAÜSLER, J. Identification of industrial yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.820-812, 1991.
18. BENÍTEZ, T.; CASTILLO, L.D.; AGUILERA, A.; CONDE, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence

- of ethanol and sucrose. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.5, p.1429-1436, 1983.
19. BERTOLINI, M.C.; ERNANDES, J.R.; LALUCE, C. New yeast strain for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. **Biotechnology Letters**, v.13, n.3, p.197-202, 1991.
20. BEVAN, D.; BOND, J. Micro-organisms in field and mill – A preliminary survey. In: QUEENSLAND SOC. SUGAR CANE TECH. CONFERENCE, 38., **Proceedings**. p.137-143.
21. BLONDIN, B.; VÉZINHET, F. Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus em électrophorèse en champ pulsé. **Révue Française d'Oenologie**, v.28, p.7-11, 1988.
22. BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. **Anais**. p.263-276.
23. BOUIX, M.; LEVEAU, J.Y. Electrophoretic study of the macromolecular compounds excreted by yeasts: application to differentiation between strains of the same species. **Biotechnology and Bioeng.**, v.25, p.133-142, 1983.
24. BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. **Principles and Practices of Winemaking**. New York: Chapman & Hall, 1996. p.102-126.
25. BRIONES, A.I.; UBEDA, J.; GRANDO, M.S. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.369-377, 1996.
26. BRUJIN, J. Deterioration of sugar cane after harvesting – Part I. Changes in juice composition. **International Sugar Journal**, v.68, p. 331-334.
27. CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, v.56, n.1, 1999a.

28. CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de cepas de levedura no processo de fermentação alcoólica da destilaria Mandú. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., Londrina, 1999b. **Anais.** p.227-231.
29. CAMPBELL, I. Systematics of Yeasts. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. **Brewing Microbiology.** 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999a. cap.1, p.1-11.
30. CAMPBELL, I. Wild Yeasts in Brewing and Distilling. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. **Brewing Microbiology.** 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999b. cap.7, p.193-208.
31. CARDINALI, G.; MARTINI, A. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.4, p.791-797, 1994.
32. CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, v.232, p.65-68, 1986.
33. CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. **Nucleic Acid Research**, v.12, p.5647-5664, 1984.
34. CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. **Mol. Cell Biology**, v.3, p.351-359, 1983.
35. CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeasts. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.13, n.3, p.219-280, 1986.
36. CASEY, G.P.; XIAO, W.; RANK, G.H. Application of pulsed field chromosome electrophoresis in the study of chromosome III and the electrophoretic karyotype of industrial strain of *Saccharomyces* yeasts. **Journal Institute of Brewing**, v.94, n.4, p.239-243, 1988.
37. CASEY, G.P.; PRINGLE, A.T.; ERDMANN, P.A. Evaluation of recent techniques used to identify individual strains of *Saccharomyces* yeasts. **American Society of Brewing Chemists**, v.48, n.3, p.100-106, 1990.

38. CASTRO, M.M.S. **Leveduras Contaminantes do Processo de Fermentação Alcoólica: Diversidade Taxonômica e Metabólica.** Campinas, 1995. 124p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
39. CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R.W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. **Science**, v.234, p.1582-1585, 1986.
40. CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1421-1444, 1978.
41. CONSTANTÍ, M.; REGUANT, C.; POBLET, M.; ZAMORA, F.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.169-175, 1998.
42. D'AMORE, T.; STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.9, n.6, p.322-330, 1987.
43. DEÁK, T. Foodborne yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, v.36, p.179-278, 1991.
44. DEÁK, T. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.287-292, 1995.
45. DEGRÉ, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, M.; MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.40, n.4, p.309-315, 1989.
46. DE JONGE, P.; DE JONGE, F.C.M.; MEIJERS, R.; STEENSMA, H.Y.; SCHEFFERS, W.A. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeast. **Yeast**, v.2, p.193-204, 1986.
47. DREWS, W.A. Fermentação de melaço de cana no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FERMENTAÇÃO, 1., São Paulo, 1964. **Anais**. p.213-222.

48. DUCAN, C.L.; COLMER, A.R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Applied Microbiology**, v.12, n.2, p.173-177, 1964.
49. EGAN, B.T. The infection process in sour storage rot. In: QUEENSLAND SOC. SUGAR CANE TECH. CONFERENCE, 32., 1965. **Proceedings**. p.21-24.
50. EGAN, B.T. Some effects of sugar storage rot on cane juice quality. In: QUEENSLAND SOC. SUGAR CANE TECH. CONFERENCE, 33., 1966. **Proceedings**. p.11-20.
51. EGAN, B.T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. In: INT. SOC. SUGAR CANE TECH. CONGRESS, 30., 1968. **Proceedings**. p.1729-1735.
52. EGLI, C.M.; EDINGER, W.D.; MITRAKUL, C.M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.779-789, 1998.
53. ERNANDES, J.R.; MATULIONIS, M.; CRUZ, S.H.; BERTOLINI, M.C.; LALUCE, C. Isolation of new ethanol-tolerant yeasts for fuel ethanol production from sucrose. **Biotechnology Letters**, v.12, n.6, p.463-468, 1990.
54. ESTEVE-ZARZOSO, B.; GOSTÍNCAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the "El Penedès" area (Spain). **Food Microbiology**, v.17, p.553-562, 2000.
55. FINGUERUT, J.; CÉSAR, A.R.P.; LEINER, K.H.; VAZ ROSSEL, C.E. Fermentação contínua em múltiplos estágios. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.10, n.3, p.41-42, 1992.
56. FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBEREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.1034-1038, 1984.

57. FREIZER, V.; DUBOURDIEU, D. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.43, n.4 p.375-380, 1992.
58. FUKAZAWA, Y.; NISHIKAWA, A.; SUZUKI, M.; SHINODA, T. Immunochemical basis of the serologic of the yeast: immunochemical determinants of several antigenic factors of yeasts. **Medical Mycology**, Zbl.Bakt.Suppl., v.8, p.127-136, 1980a.
59. FUKAZAWA, Y.; SHINODA, T.; NISHIKAWA, A.; NAKASE, T. Synonymy of *Saccharomyces uvarum* Beijerinck 1898: significance of cell wall antigens in yeast classification. **Internat. Journal of Syst. Bacteriol.**, v.30, p.196-205, 1980b.
60. GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.4/5, p.35-40, 1991.
61. GANOU-PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L.; GALZY, P.; PARFAIT, A. Les bacteries aerobies des milieux fermentaires a base de jus de canne a sucre. **Industries Alimentaires et Agricoles**, n.7/8, p.579-585, 1989.
62. GARCIA, E.C.; ALCINA, M.Y. Flora microbiologica predominante en el bagazo de cana de azucar. **Acta Cientifica Venezoelana**, v.32, p.177-183, 1981.
63. GHOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolisate II: product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1387-1400, 1979.
64. GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ARGUESO, J.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F.C.A. Methods for yeast characterization from industrial products. **Food Microbiology**, v.17, p.217-223, 2000.
65. GRIFFITHS, A.J. A numericlature of the yeasts. **Antonie-van Leeuwenhoek**, v.47, n.6, p.547-563, 1981.
66. GUERREIRO, M.A. **Desenvolvimento de um Sistema Especialista para o Projeto de Unidades de Produção de Álcool**. Campinas, 1995. Tese

(Mestre em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

67. GUILLAMÓN, J.M.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; QUEROL, A. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.4, p.708-714, 1994.
68. GUILLAMÓN, J.M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Characterisation of wine yeasts strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographical or ecological origin. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.122-132, 1996.
69. GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em leveduras de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da ESALQ**, v.47, p.597-608, 1990.
70. GUTTERIDGE, C.S.; PRIEST, F.G. Methods for the rapid identification of microorganisms. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. (eds) **Brewing Microbiology**. 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999. p.237-270.
71. HARPER, D.R. Microbial contamination of draught beer in public houses. **Process Biochemistry**, v.16, n.1, p.2-7, 1981.
72. HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. **Journal of Applied Bacteriology**, v.60, n.6, p.477-481, 1986.
73. HES, J.W. The deterioration of harvested cane under constant conditions. **International Sugar Journal**, v.4, p.102-104, 1952.
74. HOPE, C.F.A. Cinnamic acid as the basis of a medium for the detection of wild yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p.213-215, 1987.
75. IZQUIERDO-CAÑAS, P.M.; UBEDA IRANZO, J.F.; BRIONES PÉREZ, A.I. Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepeñas in two consecutive vintages. **Food Microbiology**, v.14, p.221-225, 1997.

76. JESPERSEN, L.; VAN DER AA KÜHLE, A.; PETERSEN, K. Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.43-53, 2000.
77. JOHNSTON, J.R.; MORTIMER, R.K. Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.569-572, 1986.
78. JOHNSTON, J.R.; CONTOPOULOU, C.R.; MORTIMER, R.K. Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. **Yeast**, v.4, n.3, p.191-198, 1988.
79. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeasts: a Taxonomy Study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. 1082p.
80. KURTZMAN, C.P.; PHAFF, H.J. Molecular taxonomy. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (eds) **The Yeasts: Biology of Yeasts**. London: Academic Press, 1987. v.1, p.63-94.
81. LALUCE, C.; ABUD, C.L.; GREENHALF, W.; PERES, M.F.S.
Thermotolerance behavior in sugar cane syrup fermentations of wild type yeast strains selected under pressures of temperature, high sugar and added ethanol. **Biotechnology Letters**, v.15, n.6, p.609-614, 1993.
82. LEWIS, M.J.; YOUNG, T.W. **Brewing**. Chapman & Hall, 1998. cap.13, p.191-210.
83. LIMA, U.A. Sistema de fermentação alcoólica. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. **Anais**. p.242-253.
84. LIMA, U.A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P.; SOUZA, L.G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de cana. **Brasil Açucareiro**, v.83, n.4, p.337-343, 1974.
85. LIN, Y. Detection of wild yeasts in the brewery efficiency of differential media. **Journal of the Institute of Brewing**, v.81, p.410-417, 1975.

86. LODDER, J. **The Yeasts: a Taxonomic Study**. Amsterdam: North-Holland, 1970. 1385p.
87. LONGLEY, R.P.; DENNIS, R.R.; HEYER, M.S.; WREN, J.J. Seletive *Saccharomyces media* containing ergosterol and tween 80. **Journal of the Institute of Brewing**, v.84, p.341-345, 1978.
88. LOPES, M.B.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANDGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeast strain using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4514-4520, 1996.
89. LUCREDI, H.A.; FINGUERUT, J.; LEIMER, K.H.; ROSSELL, C.E.V.; YOKOYA, F. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a fermentação. **Boletim Técnico Copersucar**, n.27, p.25-28, 1984.
90. MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, n.1, p.103-121, 1984.
91. MANI, K.; DLAUCHY, D.; DEÁK, T. A comparative study of karyotyping, RAPD-PCR and nDNA/nDNA homology methods for identification of yeasts isolated from Indian beverages. **Acta Alimentaria**, v.27, n.1, p.43-52, 1998.
92. MEADEN, P. DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives. **Journal of the Institute of Brewing**, v.96, p.195-200, 1990.
93. MIGLIARI, P.C. **Classificação das Cepas de Levedura Dominantes de Processos Fermentativos Utilizando Parâmetros Fermentativos e Taxonomia Numérica**. Campinas, 2001. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – FEQ, UNICAMP.
94. MILLER, M.W. Yeasts. In: REED, G. **Industrial Microbiology**, Westport: AVI, 1983. p.15-43.

95. MOREL DU BOIL, P.G. Losses associated with post-harvest and pre-delivery conditions. In: INT. SUGAR CANE TECH. CONGRESS, 24, Brisbane, 2001. **Proceedings**. p.382-383.
96. NADAL, D.; COLOMER, B.; PIÑA, B. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1944-1950, 1996.
97. NESS, F.; LAVALLÉE, F.; DUBOURDIEU, D.; AIGLE, M.; DULAU, L. Identification of yeast strain using the polymerase chain reaction. **J. Sci. Food Agric.**, v.62, p.89-94, 1993.
98. OAKLEY-GUTOWSKI, K.M.; HAWTHORNE, D.B.; KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. **American Society of Brewing Chemists**, v.50, n.2, p.48-52, 1992.
99. OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira na detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-alcooleiras. In: SINAIFERM, 8., São Lourenço, 1988. **Anais**. p.78-81.
100. OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o Controle Microbiológico na Produção de Álcool e Açúcar**. Piracicaba: FEALQ/Fermentec, 1996. 89p.
101. OOTHUIZEN, A.; KOCH, J.L.F.; VILJOEN, B.C.; MILLER, H.B.; LATEGAN, P.M. The value of long-chain fatty acid composition in the identification of some brewery yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v.93, p.174-176, 1987.
102. PANCHAL, C.J.; TAVARES, F.C.A. Yeast strain selection for fuel ethanol production. In: PANCHAL, C.J. **Yeast strain selection**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.225-243.
103. PARISH, M.E.; CARROL, D.E. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.36, n.2, p.165-169, 1985.

104. PEDERSEN, M.B. Practical use of electro-karyotypes for brewing yeast identification. In: EUR. BREWING CONV. CONGR., 1987. **Proceedings**. p.489-496.
105. PERES, M.F.S.; LALUCE, C. Ethanol tolerance of thermotolerant yeasts cultivated on mixtures of sucrose and ethanol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.4, p.388-397, 1998.
106. PRAMATEFTAKI, P.V.; LANARIDIS, P.; TYPAS, M.A. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.236-248, 2000.
107. PULZATTO, M.E. **Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca**. Campinas, 2000. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – FEA, UNICAMP.
108. QUAIN, D.E. Differentiation of brewing yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v.92, p.435-438, 1986.
109. QUAIN, D.E. Studies on yeast physiology-impact on fermentation performance and product quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v.95, p.315-323, 1988.
110. QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.439-446, 1992.
111. QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.315-323, 1994.
112. QUEROL, A.; RAMÓN, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.73-78, 1996.
113. QUESADA, M.P.; CENIS, J.L. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.46, n.2, p.204-208, 1995.

114. RODINI, M.A.T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol.** Piracicaba, 1985. Dissertação (Mestre em Ciências) – ESALQ, USP.
115. ROSE, A.H. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F.A.; PASSMORE, S.M.; DAVENPORT, R.R. (eds) **Biology and activities of yeasts.** London, Academic Press, 1980. p.103-121.
116. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **Biology of Yeasts.** London, Academic Press, 1987. p.1-4.
117. ROUSSELET, G.R. Fermentação do caldo de cana. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 3., Piracicaba, 1962. **Anais.** p.154-161.
118. RUSSELL, I.; JONES, R.; STEWART, G.G. Yeast – The primary industrial microorganism. In: STEWART, G.G.; RUSSELL, I.; KLEIN, R.D.; HIEBSCH, R.R. (eds) **Biological Research on Industrial Yeasts.** Boca Raton: CRC Press, 1987. p.2-4.
119. RUSSELL, I. Yeast. In: HARDWICK, W.A. (ed) **Handbook of Brewing.** New York: Marcel Dekker, 1995. cap.10, p.169-202.
120. RUSSELL, I.; DOWHANICK, T.M. Rapid detection of microbial spoilage In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. (eds) **Brewing Microbiology.** 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999. cap.8, p.209-235.
121. SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método electrofotométrico para a determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro, 1993. **Anais.** p.262-266, 1993.
122. SCHÜTZ, M; GAFNER, J. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.551-558, 1993.
123. SCHÜTZ, M; GAFNER, J. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel

- electrophoresis. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.253-257, 1994.
124. SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.
125. SEEHAUS, T.; RODICIO, R.; HEINISCH, J.; AGUILERA, H.D.; ZIMMERMANN, F.K. Specific gene probes as tools in yeast: a taxonomy. **Current Genetic**, v.10, p.103-110, 1985.
126. SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica – Floculação do fermento. **Brasil Açucareiro**, v.93, n.6, p.336-341, 1979.
127. SHEEHAN, C.A.; WEISS, A.S.; NEWSON, I.A.; FLINT, V.; O'DONNELL, D.C. Brewing yeast identification and chromosome analysis using high resolution CHEF gel electrophoresis. **Journal Institute of Brewing**, v.97, p.163-167, 1991.
128. SILVA, R.B.O. **Leveduras Contaminantes na Produção de Etanol Industrial por Processo Contínuo: Quantificação e Identificação**. Rio Claro, 1994. 145p. Dissertação (Mestre) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
129. SIMPSON, W.J.; FERNANDEZ, J.L.; HAMMOND, J.R.M. Differentiation of brewery yeasts using a disc-diffusion test. **Journal of the Institute of Brewing**, v.98, p.33-36, 1992.
130. SKOLE, R.D.; HOGRE, J.N.; RIZZUTO, A.B. Microbiology of sugar: A taxonomy study. In: TECH. SESSION CANE SUGAR REFINING. **Res.**, New Orleans, 1977.
131. SOUZA, L.G.; GOLDONI, J.S.; EIRA, A.F. Microrganismos em melaço armazenado. **Brasil Açucareiro**, v.89, n.4, p.204-206, 1977.
132. STECKELBERG, C. **Caracterização de Leveduras de Processos de Fermentação Alcoólica Utilizando Atributos de Composição Celular**

- e Características Cinéticas.** Campinas, 2001. Tese (Doutor em Engenharia Química) – FEQ, UNICAMP.
133. STEWART, G.G; RUSSELL, I. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. **Journal of the Institute of Brewing**, v.92, p.537-558, 1986.
134. STROPPIA, C.T.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; SERRA, G.E. Dinâmica populacional de leveduras em processos industriais de fermentação alcoólica. In: SINAFERM, 13., Teresópolis, 2000. **Anais.** Doc.4.
135. STUPIELLO, J.P. Qualidade da cana-de-açúcar para a fabricação de açúcar e álcool. **Açúcar e Álcool**, n.2, p.28-32, 1982.
136. SUBDEN, R.E.; CORNELL, R.; NOBLE, A.C. Evaluation of API20c clinical yeast identification system for must and wine yeast identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.31, p.364-366, 1980.
137. TANAKA, Y.; WATARI, J.; NISHIKAWA, N.; KAMADA, K. Electrophoretic banding patterns of chromosomal DNA from yeasts. **Journal of the American Society of Brewing Chemistry**. v. 47, p.109-113, 1989.
138. TAVARES, F.C.A.; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L.H.; SOUBIHE, M. Identificação molecular de leveduras da fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.10, n.4, p.34-39, 1992.
139. TAYLOR, G.T.; MARSH, A.S. MYGP + copper, a medium that detects both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast in the presence of culture yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v.90, n.3, p.134-145, 1984.
140. TILBURY, R.H. Biodeterioration of harvested sugar cane. In: WALTERS, A.H.; ELPHICK, J.J. (eds) **Biodeterioration of Materials**. Amsterdam: Elsevier, 1968. p.717-730.
141. TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CARR, J.G. (ed) **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**. London: Academic Press, 1975. p.177-191.

142. TORNAL-LEHOCZKI, J.; DLAUCHY, D. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.37-45, 2000.
143. TREDoux, H.G.; KOCK, J.L.; LATEGAN, P.M.; MULLER, H.B. A rapid identification technique to differentiate between *Saccharomyces cerevisiae* strains and other yeast species in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.161-164, 1987.
144. TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAWARITA, S. Significance of serological studies on yeasts. **Mycologia Applicata**, v.26, p.1-5, 1965.
145. VAN DER AA KÜHLE, A.; JESPERSEN, L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.205-213, 1998.
146. VAN DER WALT, J.P. Genus 16. *Saccharomyces* Meyen emend. Reess. In: LODDER, J. **The Yeasts: a Taxonomic Study**. Amsterdam: North-Holland, 1970. p.555-718.
147. VAN DER WALT, J.P. The typological yeast species and its delimitation. In: Rose, A.H.; HARRISON, J.S. (eds) **The Yeasts**, vol.1. London: Academic Press, 1987. p.95-121.
148. VAN UDEN, N. Temperature profiles of yeasts. **Advances in Microbial Physiology**, v.25, p.195-201, 1984.
149. VAN VUUREN, H.J.J.; VAN DER MEER, L.J. Characterization of brewing yeast strain by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. **Journal of the Institute of Brewing**, v.94, p.245-248, 1988.
150. VAUGHAN-MARTINI, A. *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces strito sensu* complex based upon nDNA/nDNA homologies. **Systematic and Applied Microbiology**, v.12, p.179-182, 1989.
151. VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C.P. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*.

- International Journal of Systematic Bacteriology**, v.35, p.508-511, 1985.
152. VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C.P. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu lato*. **Mycologia**, v.80, p.241-243, 1988.
153. VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. **Antoine van Leeuwenhoek**, v.53, p.77-84, 1987.
154. VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Eletrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.145-156, 1993.
155. VERSAUD, A.; COURCOUX, P.; ROULLAND, C.; DULAU, L.; HALLET, J.N. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p.3521-3529, 1995.
156. VÉZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J.N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphisms as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.568-571, 1990.
157. VÉZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J.N. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.43, p.83-86, 1992.
158. WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Microbiology**, v.17, n.12, p.482-487, 1999.
159. VIEGAS, M.C. **Desenvolvimento de um Reator de Bancada de Leito Fluidizado para a Produção de Etanol Utilizando Linhagens de Leveduras Floculantes**. Campinas, 1999. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – FEQ, UNICAMP.

160. YAMAMOTO, N.; AMEMIYA, H.; YOKOMORI, Y.; SHIMIZU, K.; TOTSUKA, A. Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. **American Journal of Enology and Viniculture**, v.42, p.358-363, 1991.
161. YARROW, D.; NAKASE, T. DNA base composition of species of genus *Saccharomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.41, p.81-88, 1975.
162. YOKOYA, F. Microbiologia de processo: fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.F.; GALLO, C.R. (eds) **Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1989. p.1-22.
163. YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.6, p.38-39, 1991.
164. ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S.R. Fermentação contínua para produção de álcool. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.10, n.4, p.23-28, 1992.

Códigos de registro das leveduras estudadas na coleção de culturas de leveduras industriais da Divisão de Processos e Biotecnologia do CPQBA/UNICAMP.

Ciealco 95/96		Ciealco 96/97		Unialco 97/98		Diana 95/96		Diana 99/00		Diana 99/00	
01	Inóculo	16	Inóculo	32	C01	48	C2.1	74	Inóculo	100	C12b
02	C1.1	17	C1.1	33	C02	49	C1.1	75	C02	101	C12c
03	C2.1	18	C2.1	34	C03	50	C1.2	76	C03	102	C13a
04	C3.1	19	C1.2	35	C04	51	C2.2	77	C04	103	C13b
05	C1.2	20	C2.2	36	C05	52	C3.2	78	C05a	104	C13c
06	C1.3	21	C1.3	37	C06	53	C4.2	79	C05b	105	C14a
07	C1.4	22	C2.3	38	C07	54	C1.3	80	C05c	106	C14b
08	C2.4	23	C1.4	39	C08	55	C3.3	81	C06a	107	C14c
09	C1.5	24	C2.4	40	C09	56	C4.3	82	C06b	108	C15a
10	C2.5	25	C1.5	41	C10	57	C6.3	83	C06c	109	C15b
11	C3.5	26	C1.6	42	C11	58	C2.3	84	C07a	110	C15c
12	C1.6	27	C2.6	43	C12	59	C5.3	85	C07b	111	C16a
13	C2.6	28	C1.7	44	C13	60	C7.3	86	C07c	112	C16b
14	C3.6	29	C2.7	45	C14	61	C5.4	87	C08a	113	C16c
15	C1.7	30	C1.8	46	C15	62	C2.4	88	C08b	114	C17a
		31	C2.8	47	C16	63	C4.4	89	C08c	115	C17b
						64	C1.4	90	C09a	116	C17c
						65	C3.4	91	C09b	117	C18a
						66	C1.5	92	C09c	118	C18b
						67	C3.5	93	C10a	119	C18c
						68	C2.5	94	C10b	120	C19a
						69	C3.6	95	C10c	121	C19b
						70	C5.6	96	C11a	122	C19c
						71	C4.6	97	C11b		
						72	C1.6	98	C11c		
						73	C2.6	99	C12a		