

EURÍPEDES ALVES DA SILVA FILHO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE LEVEDURAS
DE DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL PARA
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO**

**RECIFE/PE
2003**

EURÍPEDES ALVES DA SILVA FILHO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE LEVEDURAS
DE DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL PARA
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Júnior

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões

RECIFE/PE

2003

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE LEVEDURAS
DE DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL PARA
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO**

EURÍPEDES ALVES DA SILVA FILHO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões

Tese de Doutorado apresentada e aprovada no dia 7 de novembro de 2003, pela Banca Examinadora, composta dos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Departamento de Microbiologia/UFMG)

Prof. Dr. José Ferreira dos Santos (Departamento de Genética/UFPE)

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Departamento de Micologia/UFPE)

Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz (Departamento de Micologia/UFPE)

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior (Departamento de Genética/UFPE)

SUPLENTE:

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (Departamento de Micologia/UFPE)

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo (Departamento de Antibióticos/UFPE)

OFEREÇO

Aos meus pais Eurípedes Alves da Silva e Maria Gouveia da Silva, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e à minha tia Júlia por também ter contribuído para que eu chegasse até aqui.

DEDICO

Á Valéria, Luiz Augusto e especialmente à Maria Mariana por serem a razão principal deste meu esforço.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro no decorrer do trabalho.

Aos chefes do Departamento de Micologia – UFPE, Professores Dr. Francisco Cordeiro Neto e Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pelo apoio recebido durante minha passagem por este departamento.

À Coordenação de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, nas pessoas da Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira e Profa. Dra. Leonor Costa Maia e ao secretário Luiz Carlos, pelo esforço e boa vontade em atender em todos os momentos que precisei.

Ao Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) da UFPE, Prof. Dr. José Luiz de Lima filho, por disponibilizar o Setor de Biologia Molecular onde este trabalho foi realizado.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior e Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões, pela oportunidade ímpar de conviver e aprender com pessoas incansáveis, dedicadas e brilhantes que são.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – UFPE, pelos ensinamentos e incentivos recebidos durante o curso.

Aos Diretores e Gerentes das destilarias Japungu, Miriri, Giasa e JB, pelo acesso às instalações e apoio durante a realização deste trabalho.

À todos os colegas e amigos do Departamento de Micologia e do Setor de Biologia Molecular do LIKA, em especial às graduandas de Biologia Sheila Karina Brito dos Santos e Alecsandra do Monte Resende pelo apoio valioso na realização deste trabalho.

Às amigas Bereneuza Brasileiro, Amélia Maria e Ubirany Lopes Ferreira, por estarem sempre presentes nas horas mais difíceis, emprestando apoio e solidariedade.

Às bibliotecárias Glória Alencastro e Etiene Silva de Souza Lima, pelas orientações e apoio em todos os momentos em que foram solicitadas.

Às amigas Raquel Coimbra e Sandra Botelho, pela convivência, incentivo e apoio durante o período em que estiveram no Setor de Biologia Molecular do LIKA.

À Professora Luzinete Aciole de Queiroz, que desde o início do curso sempre demonstrou apoio, incentivo e confiança na minha pessoa.

Especialmente ao Professor José Otamar Falcão, pela feliz oportunidade de poder conviver e compartilhar de seus conhecimentos e acima de tudo de sua sabedoria, o que para mim é uma honra e um grande privilégio.

Aos Membros da Banca Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, Prof. Dr. José Ferreira dos Santos, Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz e Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, por terem aceitado o convite para contribuir como examinadores deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 <i>Fermentação Alcoólica</i>	19
2.2 <i>Linhagens Iniciadoras</i>	20
2.3 <i>Seleção de Linhagens</i>	20
2.4 <i>Marcadores Moleculares Utilizados para Tipagem Genética</i>	21
2.4.1 <i>Cariotipagem</i>	21
2.4.2 <i>Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição do DNA mitocondrial RFLP/mtDNA</i>	22
2.4.3 <i>Marcadores Baseados na Reação da Polimerase em Cadeia-PCR</i>	23
2.4.3.1 <i>Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição do DNA ribossomal RFLP/rDNA</i>	23
2.4.3.2 <i>Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico-RAPD</i>	25
2.4.3.3 <i>Sítio de “Splicing” do Intron</i>	27
2.4.3.4 <i>Microssatélites</i>	28
2.5 <i>Considerações</i>	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 <i>Meios de Cultura</i>	33
3.1.1 <i>Wallerstein Laboratories Nutrient Agar-WLN</i>	33
3.1.2 <i>Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose-YPD</i>	33
3.1.3 <i>Meio Definido para Crescimento</i>	33
3.1.4 <i>Meio Definido para Fermentação</i>	34
3.2 <i>Soluções e Tampões</i>	34

3.2.1 Solução de Elementos Traços.....	34
3.2.2 Solução de Vitaminas.....	35
3.2.3 Solução de Lise.....	35
3.2.4 Tampão Tris/EDTA (TE) pH 8,0.....	35
3.2.5 Tampão Tris-Borato (TBE) 5X.....	35
3.2.6 Mistura de dNTPs (solução de trabalho).....	36
3.2.7 Solução de Ácido Denitrossalicílico-ADNS.....	36
3.3 Amostras de Leveduras para Teste dos Iniciadores.....	36
3.4 Coleta e Plaqueamento do Mosto de Cana-de-Açúcar.....	38
3.5 Contagem, Isolamento e Purificação das Colônias	39
3.6 Extração do DNA Nuclear.....	39
3.7 Amplificação do DNA Nuclear.....	40
3.7.1 Microsatélites (GTG) ₅ e (GACA) ₄	40
3.7.2 Região ITS do DNA ribossomal.....	41
3.8 Ensaio Fermentativo dos 16 perfis (GTG) ₅ da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001.....	42
3.8.1 Determinação de Glicerol.....	43
3.8.2 Determinação do °Brix e Açúcares Redutores Totais.....	43
3.8.3 Determinação do Teor Alcoólico.....	44
3.9 Identificação das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001.....	44
3.10 Análise Estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Caracterização Morfológica das Colônias.....	45
4.2 Amplificação do DNA das Leveduras de Coleção.....	46
4.3 Tipagem das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001.....	50
4.4 Identificação das Leveduras Representantes dos 16 Perfis (GTG) ₅ da Destilaria Japungu-Safra 2000/2001.....	51
4.5 Frequências dos Perfis (GTG) ₅ das Leveduras da Destilaria Japungu-Safra 2000/2001.....	55
4.6 Ensaio Fermentativo dos Representantes dos 16 Perfis (GTG) ₅	55
4.7 Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG) ₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2001/2002.....	60

4.8	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2002/2003</i>	63
4.9	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Miriri – Safra 2002/2003</i>	67
4.10	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Giasa – Safra 2002/2003</i>	67
4.11	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria JB – Safra 2002/2003</i>	76
4.12	<i>Comparação Entre as Destilaria com Relação a Alguns Dados do Processo</i>	81
5	DISCUSSÃO	83
5.1	<i>Caracterização Morfológica das Colônias</i>	83
5.2	<i>Amplificação do DNA de Leveduras de Coleção</i>	84
5.3	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001</i>	86
5.4	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2001/2002</i>	89
5.5	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2002/2003</i>	90
5.6	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Miriri – Safra 2002/2003</i>	92
5.7	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Giasa – Safra 2002/2003</i>	93
5.8	<i>Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria JB – Safra 2002/2003</i>	94
6	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	98

LISTA DE FIGURAS

1. Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) flanqueada pelos iniciadores universais ITS4 e ITS5 . Também a região IGS (IGS1-5S-IGS2) flanqueada pelos iniciadores JV51 e JV52.24
2. Tipos morfológicos de colônias de leveduras incubadas em meio WLN por 7 dias a 30°C provenientes de amostras de mosto fermentado de destilarias produtoras de álcool combustível na Paraíba e Pernambuco.....45
3. Perfis da amplificação de ISSR de 11 espécies de leveduras de coleção com o iniciador (GTG)₅. Na pista **M** marcador de peso molecular de 100pb; nas pistas de 1: *Pichia membranaefaciens* 2: *Hansenula anomala* 3: *Dekkera intermedia* 4: *Saccharomyces cerevisiae* 5: *Candida valida* 6: *C. parapsilosis* 7: *Brettanomyces intermedius* 8: *Kluyveromyces polysporus* 9: *Metschnikowia pulcherrima* 10: *Pichia jadinii* 11: *Rhodotorula minuta*47
4. Perfis da amplificação de ISSR de 8 diferentes espécies do gênero *Saccharomyces* com o iniciador (GTG)₅. Nas pistas (**M100**): marcador de peso molecular de 100pb. Pistas 1: *Saccharomyces paradoxus*, 2: *S. bayanus*, 3: *S. calbergensis*, 4: *S. monacensis*, 5: *S. cariocanus*, 6: *S. mikatae*, 7: *S. kudriavzevii*, 8: *S. cerevisiae*.....48
5. Perfis da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ de 15 linhagens de *S. cerevisiae* e 6 espécies de *Saccharomyces*. **5A** - pista **M** , marcador de peso molecular de 100pb, e pistas de 1: *S. cerevisiae* 1460 (a), 2: 1460 (b), 3: IA-1238, 4: IA-1211, 5: IA-1255, 6: IA-1194, 7: IA-1236, 8: IZ-1904, 9: Fleischmann, 10: Itaiquara, 11: Zani-Floc, **5B** – pista **M**, marcador de peso molecular de 100pb, e pistas 12: *S. cerevisiae* ATCC 9763, 13: *S. cerevisiae* LACI Δ, 14: *S. cerevisiae* KS-14B, 15: *S. cerevisiae* STL20-1, 16: *S. chevalieri*, 17: *Candida diversa*, 18: *S. diastaticus* (a), 19: *S. diastaticus* (b), 20: *S. oleaginosus*, 21: *S. oleaceus*, 22: *S. pastorianus* 49
6. Eletroferograma dos 16 perfis genéticos (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2000/2001.....52

7. Dendrograma dos 16 perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2000/2001, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard. À direita estão representados os isolados dos diferentes perfis de amplificação.....52
8. Perfis da amplificação de ISSR com o iniciador (GACA)₄ das leveduras representantes dos 16 perfis caracterizados pelo iniciador (GTG)₅. Pistas (**M-100**): marcador de peso molecular de 100 pares de base. Pistas 1 e 20 - isolado 261(7) amplificado pelo (GTG)₅ usado como marcador; (**A**) pistas 2: P1, 3: P1A, 4: P3, 5: P4, 6: P4A 7: IA1238, 8: P5, 9: P6, 10: P14, (**B**) pistas 11: P15, 12: P15A, 13: P18, 14: P18A, 15: P19, 16: P20, 17: P21, 18: P22, 19: IA1238.53
9. Dendrograma dos perfis resultantes da amplificação de ISSR com o iniciador (GACA)₄ das leveduras representantes dos 16 perfis (GTG)₅, obtido através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard.54
10. Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representante dos perfis (GTG)₅, isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu. (**A**) safra 2000/2001; (**B**) safras 2001/2002 e 2002/200354
11. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu em 15 coletas no período de safra 2000/2001, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅.....57
12. Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2000/2001 na destilaria Japungu..... 58
13. Eletroferograma dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2001/2002, detectadas na população a partir de 10% de frequência.....60
14. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu em 15 coletas no período de safra 2001/2002, de acordo com os perfis obtidos pela

amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG) ₅ , detectadas a partir de 10% de frequência.	61
15. Frequência de cada perfil (GTG) ₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2001/2002 na destilaria Japungu, detectadas a partir de 10% de frequência.....	62
16. Eletroferograma dos perfis (GTG) ₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência.....	64
17. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu em oito coletas no período de safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG) ₅ , detectadas a partir de 10% de frequência.....	65
18. Frequência de cada perfil (GTG) ₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2002/2003 na destilaria Japungu, detectadas a partir de 10% de frequência...66	
19. Eletroferograma dos perfis (GTG) ₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Miriri na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência..68	
20. Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representantes dos perfis (GTG) ₅ , isoladas do mosto fermentado da destilaria Miriri na safra 2002/2003.....	69
21. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Miriri, em 11 coletas no período de safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG) ₅ , detectadas a partir de 10% de frequência.....	70
22. Frequência de cada perfil (GTG) ₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2002/2003 na destilaria Miriri, detectadas a partir de 10% de frequência.....	71

- 23.** Eletroferograma dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Giasa na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência...72
- 24.** Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representantes dos perfis (GTG)₅, isoladas do mosto fermentado da destilaria Giasa na safra 2002/2003 73
- 25.** Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Giasa em nove coletas no período de safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅, detectadas a partir de 10% de frequência. 74
- 26.** Frequência de cada perfil (GTG)₅, das leveduras isoladas do mosto fermentado, em todo período da safra 2002/2003 na destilaria Giasa, detectadas a partir de 10% de frequência.....75
- 27.** Eletroferograma dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria JB na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência.77
- 28.** Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representantes dos perfis (GTG)₅ isoladas do mosto fermentado da destilaria JB na safra 2002/200378
- 29.** Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria JB em 16 coletas no período da safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅, detectadas a partir de 10% de frequência.79
- 30.** Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2002/2003 na destilaria JB, detectadas a partir de 10% de frequência.80

LISTA DE TABELAS

1. Lista e origem das espécies de leveduras utilizadas para testes de discriminação interespecífica e intraespecífica com os microssatélites (GTG)₅ e (GACA)₄.....37
2. Iniciadores usados para amplificar seguimentos de DNA de amostras de leveduras isoladas de mosto fermentado de destilarias produtoras de álcool combustível.....40
3. Protocolo de reação para amplificação de ISSR por PCR com os iniciadores (GTG)₅ e (GACA)₄41
4. Protocolo de reação para amplificação da região ITS do rDNA com os iniciadores ITS4 e ITS5 42
5. Frequência dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2000/200156
6. Ensaio fermentativo das leveduras representantes dos 16 perfis (GTG)₅ isoladas da destilaria JAPUNGU na safra 2000/200159
7. Valores médios de alguns parâmetros acompanhados nos processos das destilarias estudadas no período de 2000 a 200382

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE LEVEDURAS DE DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

EURÍPEDES ALVES DA SILVA FILHO

RESUMO

Um total de 803 amostras de leveduras foram isoladas em intervalos de quinze dias de amostras de mosto fermentado de quatro diferentes destilarias de álcool combustível no Nordeste do Brasil: 110 isolados da destilaria Miriri, 90 da destilaria Giasa e 443 da destilaria Japungu, todas localizadas no Estado da Paraíba. Outras 160 foram da destilaria JB, localizada no Estado de Pernambuco. Todas as leveduras foram submetidas à análise molecular baseada em PCR através do iniciador (GTG)₅, que permite a amplificação de seqüências simples entre dois microssatélites no DNA. Também foram analisadas amostras de DNA de *Saccharomyces cerevisiae* de referência, de diferentes espécies de *Saccharomyces* e de espécies não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Para todas as linhagens de *S.cerevisiae* industriais e de coleção usadas como referência, foram obtidos padrões de amplificação que compartilham bandas não encontradas em outras espécies de *Saccharomyces*, nem nas espécies testadas não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Isto demonstra que o iniciador (GTG)₅ pode ser usado para discriminar *S.cerevisiae* de qualquer outra espécie de levedura, o que sugere seu uso posterior em taxonomia molecular. Além disso, bandas polimórficas foram identificadas entre muitas linhagens de *S. cerevisiae*, tanto de referência quanto de isolados industriais, o que permitiu a discriminação de 17 linhagens nativas de *S. cerevisiae*, confirmadas pelo método clássico de identificação. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o iniciador (GTG)₅ pode ser usado no acompanhamento de populações de leveduras em processos fermentativos. Os isolados de perfil (GTG)₅ P1 e P18 apresentaram características fermentativas e de persistência no processo sendo portanto indicadas para receberem genes de interesse industrial.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, caracterização genética, *Saccharomyces cerevisiae*, microssatélites, ISSR, (GTG)₅, (GACA)₄.

GENETIC CHARACTERIZATION OF YEASTS POPULATIONS OF FUEL ALCOHOL DISTILLERIES TO OTIMIZATION OF FERMENTATION PROCESS

EURÍPEDES ALVES DA SILVA FILHO

ABSTRACT

A total of 803 yeast isolates were obtained from quarterly collected samples from fermented must from four different fuel-ethanol distilleries located in Northern Brazil: 110 isolates from Miriri distillery, 90 isolates from Giasa distillery and 443 isolates from Japungu distillery, all from State of Paraíba, and 160 isolates from JB distillery located at the State of Pernambuco. All yeast isolates were subjected to molecular fingerprinting analysis by using the PCR-based marker (GTG)₅ primer, which allow the amplification of inter simple sequence repeats between two microsatellites in the yeast DNA. In parallel, DNA samples from *S. cerevisiae* type strains, different species of the *Saccharomyces sensu stricto* and non-*Saccharomyces* species were analysed. The results showed that all *S. cerevisiae* type and industrial strains produced amplification patterns that shared common bands not present in other *Saccharomyces* species, neither in the non-*Saccharomyces* species tested. It was demonstrated that (GTG)₅ can be used to discriminate *S. cerevisiae* from any other yeast species, which suggest its use for further molecular taxonomy. Moreover, polymorphic amplified bands were identified among many *S. cerevisiae* strains, both type and industrial isolates, which allowed the discrimination of 17 yeast strains. Taken together, the results obtained in this work demonstrated that (GTG)₅ primer can be promptly used for monitoring populations in the fermentation process. The isolates belonging to P1 and P18 (GTG)₅ amplification patterns showed the best fermentative capacity among all isolates tested, as well as high persistence in the fermentative process. Therefore, they are candidates for further genetic manipulation of industrial interest.

Key words: alcoholic fermentation, genetic characterization, *Saccharomyces cerevisiae*, microsatellites, ISSR, (GTG)₅, (GACA)₄.

1. INTRODUÇÃO

O álcool por ser um combustível limpo, tem na origem renovável seu maior diferencial ambiental, e por razões econômicas e sociais como economia de divisas e geração de empregos, tem estimulado sua utilização como combustível no Brasil e em vários países do mundo, apresentando um enorme potencial de expansão

A produção mundial de álcool atualmente é da ordem de 35 bilhões de litros anuais, dos quais, 21 bilhões (60%) destinam-se ao uso como combustível. Deste mercado, o Brasil participa com 10,4 bilhões de litros, sendo 4,9 bilhões para abastecer aproximadamente 3 milhões de veículos movidos à álcool hidratado, e 5,5 bilhões de litros de álcool anidro misturado à gasolina como aditivo (ÁLCOOL..., 2003)

O álcool é produzido através da fermentação industrial do caldo de cana-de-açúcar e /ou melação por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* produzida para indústria de pão, e em alguns casos por leveduras nativas selecionadas do processo de fermentação alcoólica, atualmente comercializadas pela indústria de fermento Lallemand Co. Apesar de utilizarem inóculos de partida puros para iniciar o período de safra, a fermentação ocorre sem procedimentos de esterilização na maioria das unidades produtoras do país, seja para produção de álcool combustível, seja para a produção de aguardente, o que favorece de forma significativa a contaminação desses processos por bactérias e leveduras.

A contaminação bacteriana pode ser resolvida com sucesso através do emprego do ácido sulfúrico e por eficientes bactericidas existentes no mercado, permitindo às destilarias atingirem bons rendimentos (SILVA-FILHO, 1993). Por outro lado, contaminações por leveduras nativas de baixa capacidade fermentativa pertencentes ou não a espécie *S.cerevisiae*, ocorrem com frequência no processo fermentativo de destilarias de todo país. Estas contaminações trazem consideráveis prejuízos, por retardarem o tempo de fermentação, desviarem açúcar para a produção indesejável de biomassa, provocando expressivas quedas de rendimento na produção de álcool e atrasos no cronograma de moagem, quase sempre levando ao descarte total do fermento uma ou mais vezes no mesmo período de safra.

Atualmente não se conhece antifúngicos que possam atuar de forma seletiva sobre as leveduras indesejáveis, nem procedimentos rápidos e eficientes para resolver este tipo de contaminação. Portanto, o descarte total do fermento e a substituição por outro inóculo, são as opções disponíveis para restabelecerem as condições do processo, juntamente com medidas de melhoria na assepsia das moendas e tubulações, na qualidade da água utilizada na diluição do mosto e no controle da temperatura de fermentação. Entretanto, a substituição por inóculos

constituídos por linhagens nativas de *S. cerevisiae* isoladas do próprio processo, com capacidade fermentativa comprovada, e a manutenção dessas linhagens em alta frequência na população, é hoje o que se apresenta como alternativa mais viável para resolver problemas de contaminação por leveduras de baixa capacidade fermentativa e evitar prejuízos por quedas de rendimento na produção de álcool (ANDRIETTA *et al.*, 1995; 1997; 1999).

Para que se possa utilizar linhagens nativas de *S. cerevisiae* em processos fermentativos de produção industrial de etanol, características como a capacidade fermentativa e o poder de dominância na fermentação devem ser pré-requisitos básicos no processo de seleção dessas linhagens. O conhecimento da dinâmica dessas populações na fermentação alcoólica ao longo de todo período de safra, através da caracterização de linhagens, ajudarão na identificação de leveduras nativas mais produtivas e adaptadas ao processo. Isto permitirá utilizá-las não só como inóculos iniciais em substituição ao fermento de panificação, mas também como linhagens hospedeiras de genes heterólogos de interesse industrial. Desta forma, o presente trabalho apresenta como objetivos:

- 1 – Avaliar a estabilidade populacional das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas como inóculo de partida nos processos fermentativos de destilarias da Paraíba e de Pernambuco, ao longo de todo período de safra, através de perfis genéticos obtidos pela amplificação com marcadores moleculares, tendo como base perfis de linhagens de *S. cerevisiae* de referência;
- 2 – Avaliar a dinâmica de populações de linhagens nativas de *S. cerevisiae* e de leveduras pertencentes à outros gêneros e espécies, que estiverem presentes no mosto fermentado;
- 3 – Avaliar o perfil fermentativo das linhagens que apresentarem maior frequência e dominância, através de ensaios fermentativos em laboratório utilizando culturas puras;
- 4 – Selecionar linhagens mais adaptadas aos processos industriais de produção de álcool combustível e para introdução de genes heterólogos que possam trazer benefícios para o setor alcooleiro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fermentação Alcoólica

Os seres vivos necessitam de energia para realizarem suas mais diversas funções. Aqueles que não realizam fotossíntese, obtém sua energia através do desdobramento de moléculas orgânicas na presença ou ausência de oxigênio, como acontece com as leveduras. A principal fonte de energia para as leveduras são os carboidratos, que podem ser metabolizados na presença de oxigênio pelo processo chamado de respiração, neste caso a glicose é oxidada até gás carbônico e água. Quando são metabolizados na ausência de oxigênio o processo é chamado de fermentação e tem como produtos finais gás carbônico e etanol (TORTORA, 2000).

No caso da fermentação de mosto de caldo de cana-de-açúcar ou deste com melaço, os açúcares presentes em maior quantidade são sacarose, glicose e frutose, que serão imediatamente metabolizadas pela levedura e iniciarão as reações até formação de etanol, com exceção da sacarose, que precisa ser hidrolisada em glicose e frutose através da enzima invertase (COPERSUCAR..., 1987).

A produção de álcool combustível ocorre atualmente através de dois processos: o processo descontínuo também chamado de batelada ou Melle-Boinot, na qual toda fermentação se processa em dornas individuais com recuperação do fermento e sua reutilização em fermentações posteriores; e o processo contínuo, que consiste na fermentação através de várias domas interligadas nas quais a fermentação se processa gradualmente em vários estágios. Como na fermentação em batelada, o processo contínuo também reutiliza o fermento centrifugado, neste caso, retomando de forma contínua para a doma principal, juntamente com o mosto, realimentando o processo (COPERSUCAR...,1987).

O Brasil é hoje o maior produtor mundial de álcool com 284 usinas que fabricam o produto, 212 das quais localizadas no Centro-Sul e 72 no Norte-Nordeste. No Centro-Sul, o maior produtor é o Estado de São Paulo, responsável por dois terços do álcool fabricado na região. No Norte-Nordeste o Estado de Alagoas é o maior produtor (EXPORTAÇÃO...,2003) Com relação ao Estado de Pernambuco, foram produzidos 306,2 milhões de litros na safra 2002/2003 (SINDACUCAR..., 2003).

2.2. Linhagens Iniciadoras

Na indústria alcooleira, um dos mais importantes componentes é a levedura responsável pela produção de etanol a partir do açúcar extraído da cana-de-açúcar. Atualmente as principais fontes de *Saccharomyces cerevisiae* são a levedura de panificação prensada e leveduras isoladas de processos industriais (STROPPA *et al.*, 2000). Tem sido demonstrado que leveduras de panificação não adaptadas ao processo de fermentação alcoólica utilizadas como inóculo são substituídas completamente por leveduras nativas num período de até 40 dias após à inoculação (BASSO *et al.*, 1993).

2.3. Seleção de Linhagens

O acompanhamento da dinâmica de populações de leveduras em processos de fermentação alcoólica industrial pode trazer valiosas informações com relação à seleção de leveduras nativas com alto potencial fermentativo. A adequação do processo às necessidades fermentativas e correções de condutas operacionais inadequadas podem resultar em ganhos de rendimento e produtividade (STROPPA *et al.*, 2000). Vários procedimentos foram utilizados até o momento para caracterizar e identificar leveduras. O método clássico baseado em características morfológicas, reprodutivas e bioquímicas, apesar de ser ainda bastante utilizado é laborioso e pode ser afetado por condições de cultivo, fornecendo resultados imprecisos, além de consumir bastante tempo. É, portanto inadequado à rotina de análise em um sistema de controle de qualidade em processos industriais (BASSO *et al.*, 1993; BALEIRAS COUTO *et al.*, 1996a; BARROS LOPES *et al.*, 1996; GALLEGO *et al.*, 1998).

A seleção baseada na capacidade fermentativa que separa as leveduras de acordo com parâmetros de produção específica e características de crescimento foi utilizada na discriminação de leveduras nativas e no acompanhamento de populações de leveduras inoculadas em unidades produtoras de etanol no Estado de São Paulo (ANDRIETTA *et al.*, 1995; 1999). Parazzi *et al.* (2002) também adotaram este procedimento para avaliar o desempenho fermentativo de novas linhagens nativas de *S. cerevisiae* isoladas como contaminantes de destilarias produtoras de álcool combustível.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem permitido na última década o emprego de marcadores moleculares, gerando grande número de estudos sobre tipagem, identificação, classificação e ecologia de microrganismos, aumentando a resolução taxonômica, principalmente em nível de linhagem (GUILLAMÓN *et al.*, 1998;

MONTROCHER *et al.*, 1998; KURTZMAN, 1998; GARRO *et al.*, 1999; PEREZ *et al.*, 2001).

2.4. Marcadores Moleculares Utilizados para Tipagem Genética

2.4.1. Cariotipagem

Esta técnica consiste na separação eletroforética do DNA cromossômico intacto. O número e o tamanho desses cromossomos podem ser determinados através de eletroforese em campo pulsátil em gel de agarose (PFGE). Tem sido largamente utilizada com sucesso na tipagem, identificação, acompanhamento de populações, e diferenciação em nível intraespecífico de leveduras de processos fermentativos industriais de produção de vinho, cerveja e álcool combustível (VEZINHET *et al.*, 1990; BIDENE *et al.*, 1992; VAUGHAN-MARTINI *et al.*, 1993; BASSO *et al.*, 1993; SCHUTZ *et al.*, 1993; 1994; EGLI *et al.*, 1998; JESPERSEN *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2000; SIPICZKI *et al.*, 2001).

Basso *et al.* (1993) investigaram a utilização da técnica no acompanhamento de linhagens industriais de *S. cerevisiae* no processo fermentativo de várias destilarias produtoras de álcool combustível durante dois períodos de safra. Os autores verificaram que leveduras de panificação empregadas normalmente como inóculos de partida não permaneciam no processo após 40 dias da inoculação, sendo substituídas por leveduras dominantes típicas de cada destilaria. Padrões eletroforéticos distintos foram observados evidenciando a diversidade da população, mesmo assim tais leveduras, em grande parte se mostraram geneticamente mais próximas entre si do que com o padrão da levedura de panificação utilizada como inóculo inicial.

Briones *et al.* (1996) avaliaram a técnica de cariotipagem em 392 isolados provenientes de três vinícolas da região de Valdepeñas na Espanha. Dos 174 perfis cariotípicos obtidos, os autores puderam identificar 26 perfis dominantes de *S. cerevisiae*, tendo como base uma linhagem de referência.

A grande variabilidade genética de populações de leveduras, observada pela cariotipagem, tem como principal causa rearranjos cromossômicos que ocorrem por diferentes processos de recombinação durante a meiose e mitose, como também por eventos de mutação natural e induzida (LONGO & VEZINHET, 1993; FIERRO & MARTÍN, 1999). Em processos industriais de fermentação alcoólica, a alta variabilidade genética observada pela

cariotipagem tem sido atribuída aos rearranjos cromossômicos mitóticos evidenciados por ensaios de estabilidade cromossômica em laboratório (MIKLOS *et al.*, 1997; CODON *et al.*, 1998; EGLI *et al.*, 1998). O significado biológico desses rearranjos parece estar ligado em muitos casos à ausência de troca de material genético por meiose, e a recombinação mitótica tem sido proposta como uma fonte de variação genética em fungos que não apresentam ciclo sexual, ou que, por pressão de fatores abióticos apresentam a reprodução clonal como vantagem para a sua sobrevivência (FIERRO & MARTÍN, 1999; NADAL *et al.*, 1999; HAYFORD *et al.*, 1999; PUIG *et al.*, 2000).

2.4.2. Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição do DNA Mitocondrial RFLP/ mtDNA

O polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA mitocondrial tem sido muito utilizado no acompanhamento da dinâmica de populações de leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* e de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações espontâneas e inoculadas em unidades produtoras de vinho. Querol *et al.* (1992) analisaram o DNA mitocondrial de 14 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas das indústrias de vinho, cerveja, panificação e etanol. A combinação dos padrões obtidos com o uso de sete enzimas de restrição permitiu discriminar a metade das leveduras investigadas. O emprego das enzimas *RsaI* e *HinfI* na análise de restrição do mtDNA de linhagens de *S. cerevisiae* em duas vinícolas, permitiu avaliar as frequências de leveduras selecionadas e nativas em fermentações inoculadas e espontâneas, como também, observar a substituição sequencial associada a diferentes fases da fermentação. O método detectou até 45 padrões distintos de *S.cerevisiae* (QUEROL *et al.*, 1992; 1994).

Constanti *et al.* (1997) também investigaram populações de leveduras de vinho através da análise do mtDNA. Os autores encontraram 18 padrões de *S. cerevisiae* em 98 isolados de duas vinícolas em Terragona na Espanha, com as enzimas *HinfI* e *AluI*.

Comparando os resultados das análises de ácidos graxos e restrição do mtDNA de 20 linhagens de *S.cerevisiae* de vinho, verificou-se que a última técnica foi mais clara, rápida, precisa e com grande poder de discriminação, sendo portanto amplamente aceita (GUTIERREZ *et al.*, 2000).

2.4.3. Marcadores Baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que resulta na amplificação seletiva *in vitro* de uma determinada sequência da molécula de DNA, a partir da utilização da enzima DNA polimerase termorresistente e componentes como desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e oligonucleotídeos denominados de iniciadores. Estes iniciadores hibridizam com a região complementar do DNA alvo para produzir bilhões de cópias dessa sequência em poucas horas. A desnaturação da dupla-hélice do DNA, o emparelhamento dos iniciadores com a sequência alvo pela redução da temperatura da mistura, e a extensão dos iniciadores pela DNA polimerase, se processam automaticamente em um equipamento chamado termociclador (NEWTON & GRAHAM, 1997).

A técnica pode ser aplicada a qualquer situação que necessite da amplificação de regiões do DNA, e tem sido largamente empregada no melhoramento vegetal e animal, tipagens de microrganismos de interesse médico e industrial, diagnóstico de vários tipos de cânceres, e em estudos de DNA forense, entre outros (SAIKI *et al.*, 1998).

2.4.3.1. Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição do DNA Ribossomal RFLP/rDNA

Em *S. cerevisiae*, como na maioria das espécies de eucariontes, quatro diferentes genes do rDNA (5S, 5.8S, 18S e 26S) aparecem agrupados em blocos estando repetidos em dezenas de cópias no genoma. A Figura 1 apresenta a arquitetura do agrupamento gênico do DNA ribossomal. As regiões ITS1 e ITS2 representam sequência interna transcritas que, entretanto, não são traduzidas para as subunidades do RNA ribossomal. A região ITS1-5.8S-ITS2 pode ser amplificada através de iniciadores universais homólogos às sequências finais dos genes 18S e 26S. Como os ribossomos estão presentes em todos os organismos com uma origem evolucionária comum, parte da molécula apresenta-se altamente conservada alternando com regiões variáveis, demonstrando baixo polimorfismo intraespecífico e alto polimorfismo interespecífico (WHITE *et al.*, 1990; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; GARRO *et al.*, 1999). O polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) obtidos por corte da fita dupla de DNA, ocorre através do uso de enzimas de restrição. Os fragmentos são separados em gel de agarose e podem ser visualizados em transiluminador depois de corados com brometo de etídeo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998)

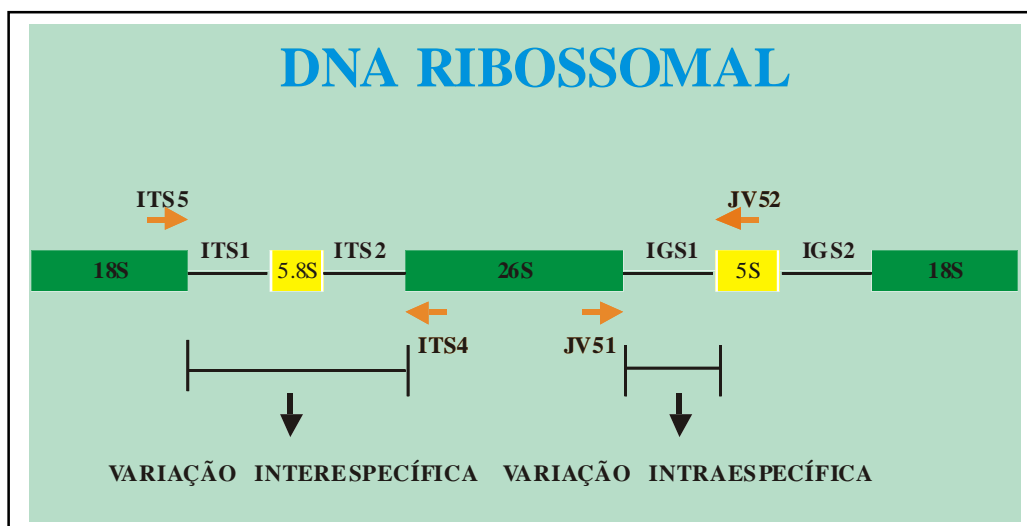


Figura 1. Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) flanqueada pelos iniciadores universais ITS4 e ITS5 . Também a região IGS (IGS1-5S-IGS2) flanqueada pelos iniciadores JV51 e JV52.

Guillamón *et al.* (1998) utilizaram a técnica de análise de restrição do produto de PCR da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA de espécies de leveduras isoladas de fermentação espontânea de vinho com as enzimas *Hinf*I, *Cfo*I e *Hae*III . Os padrões de restrição encontrados foram espécie-específico com exceção das espécies que incluem as formas perfeita e imperfeita. Este método tem sido bastante empregado para identificar espécies de leveduras de baixa capacidade fermentativa durante a fase inicial da fermentação para produção de vinho.

Montrocher *et al.* (1998) realizaram estudos filogenéticos do grupo *Saccharomyces sensu stricto* baseados no polimorfismo das seqüências espaçadoras do rDNA. Os autores utilizaram 10 enzimas de restrição sobre os produtos de PCR, das quais, quatro não revelaram qualquer polimorfismo entre as linhagens. A análise permitiu agrupar as leveduras em dois conjuntos: o “*cerevisiae*” que incluiu 16 dos 23 isolados com nível de reassociação com o DNA genômico da espécie tipo *S. cerevisiae* CBS 1171 maior que 89%, e o grupo “*bayanus*” que incluiu os isolados com nível de reassociação com o DNA nuclear da espécie tipo de *S. bayanus* CBS 380 superior a 72%. As espécies *S. paradoxus* e *S. pastorianus* não puderam ser separadas e foram incluídas nos conjuntos “*cerevisiae*” e “*bayanus*” respectivamente. Mesmo

assim, a técnica pode ser usada como uma ferramenta importante, permitindo inferir na posição filogenética de leveduras altamente relacionadas.

De modo semelhante, Granchi *et al.* (1999) fizeram análise de restrição da região ITS do rDNA de 144 isolados de leveduras provenientes da indústria do vinho, identificadas pelo método clássico. Os produtos de PCR foram digeridos com cinco enzimas de restrição produzindo padrões espécie-específicos exceto para as *Saccharomyces sensu stricto* e formas anamórficas e teleomórficas. Os autores observaram também que a amplificação a partir de uma suspensão mista de células de *Kloeckera apiculata*, *S. cerevisiae* e *Candida stellata*, resultou em três diferentes amplicons de tamanhos correspondentes aos esperados para aquelas espécies. O protocolo de identificação de colônias de leveduras baseado em PCR (PYCIP), que consiste na análise de restrição dos amplicons da região ITS de todas as colônias de uma placa com 24 horas de incubação, também foi introduzido. O método tem sido utilizado industrialmente para identificar diversas espécies de leveduras em amostras mistas do primeiro estágio da fermentação do vinho.

Um total de 169 amostras de leveduras representando 128 espécies de 39 gêneros provenientes da indústria do vinho, cerveja e alimentos, foram analisadas por Dlačhy *et al.* (1999) através da restrição do produto de amplificação do gene 18S junto com a região ITS do rDNA com as enzimas *HaeIII*, *MspI*, *AluI* e *RsaI*. Os autores verificaram que as quatro enzimas geraram padrões distintos o suficiente para identificar a maioria das espécies estudadas.

Os trabalhos realizados por estes autores (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; MONTROCHER *et al.*, 1998; GRANCHI *et al.*, 1999; DLAUCHY *et al.*, 1999) demonstraram que a utilização desses marcadores foi útil na discriminação interespecífica de leveduras. O emprego da técnica em processos da indústria de alimentos e bebidas, permitiu a identificação e acompanhamento de leveduras com maior rapidez e precisão, quando comparada com o método clássico de identificação, o que possibilita às indústrias tomarem decisões operacionais mais rápidas no sentido de resolver problemas com leveduras contaminantes.

2.4.3.2. Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico (RAPD)

Esta técnica consiste na amplificação de seqüências do genoma através de iniciadores curtos de no máximo 10 nucleotídeos com seqüências arbitrárias que em baixas temperaturas de anelamento hibridizam em locos distribuídos aleatoriamente no DNA. Tem sido utilizado

como marcador genético na separação de espécies e linhagens de muitos organismos, inclusive os fungos, apresentando a vantagem de não haver a necessidade de conhecimento específico do genoma a ser estudado.

Um aspecto negativo freqüentemente atribuído à esta técnica é a baixa reprodutibilidade de algumas bandas e a necessidade de várias reações com diferentes iniciadores, aumentando o tempo do ensaio (KURTZMAN, 1998). Quesada & Cenis (1995) utilizaram a técnica de RAPD para caracterizar 26 leveduras de vinho pertencentes à várias espécies através de 16 iniciadores do conjunto OPA, OPB, OPC e OPD. A diferenciação de 12 linhagens de *S.cerevisiae* e quatro de *Rhodotoula mucilaginosa* só foi possível combinando as informações de várias reações, o que traz limitações para o seu uso no monitoramento de leveduras em fermentações.

Baleiras Couto *et al.* (1996a) analisaram 15 leveduras de vinho e cerveja, identificadas pelo sistema API ID 32 como *S. cerevisiae*, a partir de dois iniciadores para regiões de microssatélites e tres iniciadores de RAPD. Os resultados mostraram que só com a análise conjunta das bandas geradas pelos tres iniciadores de RAPD é que foi possível discriminar seis linhagens das 15 analisadas.

A caracterização de leveduras contaminantes da produção de vinho pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* pela técnica de RAPD, permitiu a diferenciação de espécies e linhagens pertencentes a estes gêneros, quando foram usados os iniciadores OPA-02, OPA-03 e OPA-09, e problemas de reprodutibilidade foram resolvidos com o uso de preparações de DNA quantificadas e de alta pureza resultando em padrões consistentes (MITRAKUL *et al.*, 1999).

Marcadores de RAPD também foram utilizados para tipagem de leveduras híbridas resultantes da fusão de protoplastos das linhagens *S. cerevisiae* IZ987 e *S. cerevisiae* ABXR.11B. O dendrograma obtido pelas bandas geradas com os iniciadores OPB-12 e OPX-10 demonstrou baixa similaridade entre as linhagens parentais, o que foi confirmado por padrões cariotípicos muito diferentes. A grande divergência genética observada entre as linhagens enfatizaram a hipótese de não pertencerem ao gênero *Saccharomyces* (MARTINS *et al.*, 1999).

Gomes *et al.* (2000) investigaram a eficiência de quatro métodos utilizados na caracterização de leveduras com o objetivo de estabelecer padrões que pudessem ser utilizados na detecção de leveduras contaminantes de processos fermentativos industriais. Os autores levaram em consideração a eficiência, simplicidade, rapidez e baixo custo. Dos métodos abordados como cariotipagem, SDS-PAGE, absorção de corantes e RAPD, o último

se mostrou mais adequado quando se analisou 10 linhagens de *S. cerevisiae* provenientes da indústria de cerveja, panificação e álcool combustível. Todas as linhagens puderam ser discriminadas quando se utilizou a combinação de bandas geradas por sete iniciadores. A necessidade de rigor especial foi ressaltada, com relação à padronização da reação para que se pudesse obter boa reprodutibilidade, como realizado por Mitrakul *et al.* (1999).

Também comparando a eficiência de técnicas de tipagem molecular como a cariotipagem, análise de restrição do rDNA e RAPD, Tomai-Lehoczki *et al.* (2000) indicaram que a última técnica se mostrou mais sensível e eficaz na diferenciação específica e discriminação intraespecífica de leveduras de cervejarias. Segundo Brasileiro (2003) o RAPD foi um dos mais eficientes entre quatro marcadores moleculares utilizados para caracterizar e medir a variabilidade genética de 18 isolados de *Fusarium solani* ao nível intraespecífico.

2.4.3.3. Sítio de “Splicing” do Intron

O RNA presente no núcleo de eucariontes é maior que o RNA mensageiro citoplasmático. Em 1977 ficou evidente que essa diferença era devido a existência de interrupções no gene, ou seja, seqüências de DNA que são transcritas em RNA mensageiro, mas não são codificantes. Estas seqüências denominadas de introns são retiradas antes que o RNA seja traduzido através do processo de montagem chamado “splicing”, que remove os introns e reúne os segmentos codificantes (exons) na mesma ordem em que estão presentes no DNA (NEWTON, 1987). A grande maioria dos introns do genoma nuclear são seqüências não codificantes, ao contrário do genoma mitocondrial que apresenta introns que codificam proteínas (FOURY *et al.*, 1998).

Seqüências de introns foram empregadas para detectar polimorfismo em 13 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da indústria de vinho, cerveja, pão e saké. O DNA dessas leveduras foi amplificado com os iniciadores EI1, EI2, LA1 e LA2, isoladamente e em duplas. Nenhum dos iniciadores isoladamente gerou padrões polimórficos suficientes para discriminar todas as linhagens analisadas, mas em conjunto permitiram a discriminação da maioria das linhagens. O iniciador EI1 foi o mais eficiente, e sete dentre oito linhagens de vinho puderam ser discriminadas com o iniciador EI1, podendo ser usado para monitorar a propagação de leveduras no processo fermentativo (BARROS LOPES *et al.*, 1996). Os resultados de Pataro *et al.* (2000) também demonstraram polimorfismo genético em linhagens de *S. cerevisiae*, quando investigavam leveduras associadas à fermentações espontâneas em tres destilarias

produtoras de cachaça no Brasil. Os resultados obtidos da amplificação com o iniciador EI1 mostraram ser possível acompanhar a sucessão de linhagens de *S. cerevisiae* durante os ciclos fermentativos na produção de cachaça.

Observações na seqüência de introns do gene mitocondrial *COXI* indicaram que o número e posição de introns são variáveis entre espécies. Em leveduras, o polimorfismo dessas seqüências já foi bem exemplificado em linhagens de *Kluyveromyces lactis* (CLARK-WALKER, 1992). Baseados em evidências na variação do número e posição de introns do gene mitocondrial *COXI*, López *et al.* (2003) desenvolveram um novo método para monitorar linhagens de *S.cerevisiae* em fermentação de vinho. Desenharam 12 iniciadores homólogos às regiões que flaqueiam os introns desse gene em *S. cerevisiae* e testaram em tres linhagens de referência e 13 linhagens comerciais de vinho. O maior polimorfismo foi obtido quando se usou os iniciadores 3L, 3R, 4L e 5R em conjunto na mesma reação, resultando em padrões específicos para cada linhagem testada, inclusive as de referência. Em condições industriais, o método não permitiu acompanhar a sucessão de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* no decorrer da fermentação. Por outro lado, o método foi capaz de detectar antecipadamente se uma linhagem previamente inoculada se estabeleceu no processo. A amplificação de amostras diretamente do mosto sem a necessidade de purificação de DNA, apresentou-se como uma vantagem sobre outros métodos baseados em PCR e DNA mitocondrial, reduzindo o tempo de análise para oito horas, o que permite intervenções e correções quando a linhagem inoculada não se estabelece.

2.4.3.4 Microsatélites

Microsatélites são seqüências curtas de até seis nucleotídeos repetidas em bloco encontradas no genoma de vários organismos. Estudos têm demonstrado que estas seqüências são relativamente instáveis, sofrendo deleções e adições de unidades de repetição em *S.cerevisiae*, *Escherichia coli* e em mamíferos (LEVINSON & GUTMAN, 1987; HENDERSON & PETES, 1992; WEBER & WONG, 1993; FIELD & WILLS, 1998). Esta mutabilidade resulta em polimorfismos largamente usados em mapeamentos genéticos e estudos forenses (JEFFREYS *et al.*,1997). Seu significado funcional é ainda desconhecido apesar de ter sido associado a vários tipos de doenças, como o câncer de cólon retal associado com a instabilidade de microsatélites em genes humanos (KOLODNER, 1999). Os estudos

sugerem que o processo de reparação da cadeia de DNA durante a replicação seja o principal mecanismo de mutação dos microssatélites (SIA *et al.*, 1997; KOKOSKA *et al.*, 1998).

A utilização deste tipo de seqüência como marcador molecular pode ser posto de duas maneiras: 1) a utilização de iniciadores externos aos microssatélites; e 2) a utilização da própria seqüência microssatélite como iniciador de amplificação do DNA. No segundo caso, as seqüências de nucleotídeos localizadas entre as microssatélites são amplificadas, e este método é chamado de amplificação de seqüências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats – ISSR). O polimorfismo destas regiões entre repetições mostrou ser uma excelente ferramenta de discriminação intraespecífica, tanto para isolados de *Cryptococcus neoformans* patogênicos (MEYER & MITCHELL, 1995), como para isolados de *S. cerevisiae* industriais (LIECKFELDT *et al.*, 1993).

Weising *et al.* (1995) usaram 19 diferentes iniciadores de microssatélites representados por di, tri e tetranucleotídeos para testar a aplicabilidade em análise genética de diferentes genomas, e para monitorar a sensibilidade da técnica em diferentes condições de reação. Os autores concluíram que a amplificação de seqüências simples entre repetições constitui uma técnica rápida e fácil para visualizar polimorfismos ao nível inter e intraespecífico. Como no RAPD, os padrões de bandas também são afetados por parâmetros como o tipo e concentração do iniciador escolhido, concentração e pureza do DNA molde, magnésio e temperatura de anelamento. Mesmo assim, é mais reprodutível e confiável que o RAPD, em função da maior estringência de anelamento, maior tamanho do iniciador e alto grau de homologia entre as seqüências usadas como iniciadores e seus sítios de ligação no DNA alvo, se as seqüências estiverem próximas o suficiente para que possam ser amplificadas (MEYER & MITCHELL, 1995).

Baleiras Couto *et al.* (1996b) analisaram 126 isolados de leveduras da indústria de alimentos, identificadas pelo sistema API ID 32. Os autores empregaram os iniciadores (GAC)₅ e (GTG)₅ na amplificação de microssatélites, para a diferenciação das espécies em questão. O (GTG)₅ mostrou maior poder de diferenciação, gerando 28 padrões distintos, o que possibilitou a diferenciação de todos os isolados ao nível de espécie. Destas, seis espécies não puderam ser identificadas pelo sistema API, mas tres delas apresentaram padrões semelhantes àqueles obtidos pelo (GTG)₅, enquanto as outras tres apresentaram padrões totalmente distintos, indicando tres outras espécies que não estavam presentes no banco de dados do sistema API. Os resultados mostraram também que o (GTG)₅ foi capaz de discriminar linhagens de *Zygosaccharomyces bailii*.

O polimorfismo do DNA de isolados clínicos pertencentes a 26 espécies e linhagens de leveduras do gênero *Candida* foi analisado através de ampliações com iniciadores de RAPD e de microssatélites como o (GTG)₅. Os resultados demonstraram que os dois tipos de iniciadores empregados foram capazes de diferenciar todos os isolados ao nível específico, e que isolados clínicos que não puderam ser identificados por métodos bioquímicos de rotina foram identificados por padrões genéticos espécie-específicos quando comparados com o padrão da espécie de referência (THANOS *et al.*, 1996).

Dalle *et al.* (2000) realizaram tipagem molecular de 48 isolados invasivos e 48 isolados não invasivos de *C. albicans*, através da amplificação específica de microssatélite localizado na região promotora do gene que codifica para o fator de alongação 3 (CEF3). Os autores puderam observar que os dois grupos de isolados possuem importante polimorfismo no loco CEF3, permitindo agrupar os 96 isolados clínicos em 17 perfis distintos. A diferenciação de linhagens através da amplificação específica de microssatélites, utilizando um par de iniciadores, tem sido a técnica mais usada nos últimos três anos. Techera *et al.* (2001) diferenciaram de forma inequívoca nove linhagens industriais empregadas na produção de vinho, através do polimorfismo de tamanho de tres microssatélites onde cada loco foi amplificado com um par de iniciadores. O método mostrou-se altamente reprodutível em razão da especificidade dos iniciadores e da alta temperatura de anelamento, podendo ser realizado em 14 horas.

Perez *et al.* (2001) compararam a aplicabilidade das técnicas de RAPD, clivagem de seqüências polimórficas amplificadas (CAPS) e ISSR na discriminação de 14 linhagens de *S.cerevisiae* durante a fermentação espontânea para a produção de vinho. O RAPD gerou 153 bandas com 7,84% de polimorfismo permitindo uma diferenciação intraespecífica reprodutível com 12 bandas polimórficas. A CAPS gerou 349 produtos com uma percentagem de polimorfismo de 6,87%, possibilitando também uma discriminação ao nível intraespecífico. A amplificação de apenas um microssatélite identificou 11 alelos no locus *ScTAT1*, suficiente para obter o mesmo nível de discriminação dos outros métodos. As técnicas apresentaram níveis de resolução suficientes para separar de forma clara as linhagens analisadas, indicando vantagens sobre a taxonomia clássica por detectarem diferenças entre padrões genéticos de linhagens de uma mesma espécie. Por outro lado, a rapidez e o polimorfismo observados diferem significativamente entre os métodos avaliados. RAPD e CAPS envolvem o emprego de muitos iniciadores e enzimas resultando em maior tempo na análise, enquanto ampliações específicas de ISSR revelaram alto nível de polimorfismo, facilidade de interpretação e rapidez na análise, sendo portanto, indicado para o

acompanhamento da diversidade genética de espécies que predominam na fermentação espontânea do vinho.

A amplificação de microssatélites utilizando iniciadores externos, tem permitido avaliar o polimorfismo de tamanho dessas seqüências. A análise de seqüências no banco de dados do genoma de *S. cerevisiae* permitiu a seleção de microssatélites, incluindo di e trinucleotídeos, para estudar o polimorfismo em linhagens de *S. cerevisiae* industriais, de laboratório e de interesse médico (SIA *et al.*, 1997; HANNEQUIN *et al.*, 2001). Os resultados indicaram que a análise múltipla de microssatélites é um método reproduzível e com alto grau de polimorfismo, levando ao nível de discriminação jamais alcançado pelos métodos de tipagens já divulgados, podendo ser usado como ferramenta segura, rápida, eficiente e de fácil interpretação na tipificação, identificação e diferenciação genética de linhagens no acompanhamento de populações industriais (PÉREZ *et al.*, 2001; HANNEQUIN *et al.*, 2001).

2.5. Considerações

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

As técnicas de tipagem genética empregadas até agora em processos industriais, apresentaram variações com relação à sua resolução e execução. Aquelas baseadas em impressão digital do DNA, que utilizaram enzimas de restrição como o DNA mitocondrial, e PCR como RAPD, INTRON e ISSR, mostraram bons resultados na identificação de espécies e discriminação de linhagens de leveduras e bactérias. Entretanto, problemas de reprodutibilidade foram observadas principalmente por questões relacionadas à padronização da reação e pureza do DNA, o que muitas vezes dificultou a interpretação dos resultados. Além do disso, o tempo de análise ainda é longo quando se pretende empregar os resultados para monitorar processos. A cariotipagem, apesar de ser uma técnica sensível e muito

empregada no estudo de variabilidade genética de microrganismos, é laboriosa, cara e portanto inadequada para processos industriais. Enquanto que, a amplificação da região ITS do DNA ribossomal, por apresentar padrões espécie-específicos, tem sido particularmente útil para detectar e identificar espécies de leveduras e de bactérias contaminantes em indústrias de alimentos. Por outro lado, por sua característica específica, a utilização é limitada quando se trata de acompanhar linhagens de leveduras em processos industriais.

O polimorfismo de tamanho observado pela amplificação de seqüências de microssatélites e introns através de iniciadores externos, é hoje a técnica mais rápida e precisa para discriminar linhagens de leveduras em apenas oito horas de análise. Por outro lado, a seqüência a ser amplificada precisa ser conhecida, desta forma, a técnica só pode ser aplicada em leveduras que já tenham seu genoma seqüenciado.

Como todas as técnicas disponíveis apresentam vantagens e limitações, se faz necessário a busca de novos marcadores que apresentem elevado nível de discriminação, ao mesmo tempo que possam ser empregados como ferramentas no acompanhamento e seleção de leveduras em processos de fermentação alcoólica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de Cultura

3.1.1. Wallerstein Laboratories Nutrient Agar - WLN (p/ 1L)

Glicose (Nuclear).....	50,0 g
Extrato de Levedura (Biobrás).....	4,0 g
Caseína (hidrólise enzimática) Sigma.....	5,0 g
KH ₂ PO ₄ (Reagen) *	0,55 g
KCl (Reagen) *	0,43 g
CaCl ₂ . 6H ₂ O (Reagen) *	0,13 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Reagen) *	0,13 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O (Reagen) *	0,0025 g
MnSO ₄ . 4H ₂ O (Reagen) *	0,0025 g
Verde de Bromocresol (Reagen).....	0,022 g
Agar-agar (Agar Brasileiro)	20,0 g
Ácido nalidíxico *	0,050 g
Ampicilina *	0,050 g
pH 5,5 ajustado com HCl 1N	

* componentes adicionados na forma de soluções previamente preparadas.

Meio preparado de acordo com Oliveira e Silva (1994).

3.1.2. Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose - YPD (p/ 1L)

Extrato de levedura(Biobrás).....	10,0 g
Peptona (Difco)	20,0 g
Glicose (Nuclear).....	20,0 g

3.1.3. Meio Definido para Crescimento (p/ 1L)

Sacarose (Nuclear)	20,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Reagen).....	7,5 g
KH ₂ PO ₄ (Reagen).....	14,4 g

MgSO₄ . 7H₂O (REAGEN)..... 0,5 g
Solução de elementos traços 2,0 mL
Solução de vitaminas1,0 mL
pH 6,5

3.1.4. Meio Definido para Fermentação (p/ 1L)

Sacarose (Reagen).....120,0 g
(NH₄)₂SO₄ (Reagen)..... 5,0 g
KH₂PO₄ (Reagen).....3,0 g
MgSO₄ . 7H₂O (Reagen).....0,5 g
Solução de elementos traços1,0 mL
Solução de vitaminas1,0 mL
pH 5,5

Todos os meios e soluções tiveram seus volumes ajustados para 1000ml com água destilada e foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

3.2. Soluções e Tampões

3.2.1. Solução de Elementos Traços (p/ 1L)

EDTA (Sigma) (Reagen)..... 15,0 g
ZnSO₄. 7H₂O (Reagen).....4,5 g
MnCl₂. 2H₂O (Reagen).....0,84 g
CoCl₂. 6H₂O (Reagen) 0,3 g
CuSO₄. 5H₂O (Reagen)..... 0,3 g
Na₂Mo O₄. 2H₂O (Reagen).....0,4 g
CaCl₂. 6H₂O (Reagen).....4,5 g
FeSO₄. 7H₂O (Reagen).....3,0 g
H₃BO₃ (Reagen)..... 1,0 g
KI (Reagen).....0,1 g

3.2.2. Solução de Vitaminas (p/ 1L)

D-biotina (Sigma).....	0,05 g
Pantotenato de cálcio (Sigma)	1,0 g
Ácido nicotínico (Sigma)	1,0 g
Mio-inositol (Sigma).....	25,0 g
Cloreto de tiamina (Sigma).....	1,0 g
Cloreto de piridoxal (Sigma).....	1,0 g
Ácido p-aminobenzóico (Sigma).....	0,2 g

A solução de vitaminas foi esterilizada por filtração em membrana com diâmetro de poro de 0,2µm.

3.2.3. Solução de Lise

Tris-HCl 1M pH 8,0 (Gibco)	2,0 mL
EDTA 0,5M pH 8,0 (Gibco)	0,5 mL
SDS 10% (Sigma).....	1,0 mL
NaCl 0,5M (Reagen).....	0,5 mL
Água destilada esterilizada .	6,0 mL

3.2.4. Tampão Tris/EDTA (TE) pH 8,0

Tris.Cl (pH 8,0) (Sigma).....	10mM
EDTA (pH 8,0) (Sigma).....	1mM

3.2.5. Tampão Tris-Borato (TBE) 5X (p/ 1L)

Tris base (Sigma).....	54,0 g
Ácido bórico (Gibco).....	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0 (Gibco).....	20,0 mL

O volume foi completado com água destilada para 1000mL

3.2.6. Mistura de dNTPs (solução de trabalho)

dATP	10 µL
dTTP	10 µL
dGTP	10 µL
dCTP	10 µL
Água destilada esterilizada	460 µL

3.2.7. Solução de Ácido Denitrossalicílico (p/500mL)

Solução A

5,0 g de ADNS dissolvidos em 100 mL de NaOH 2N à 70°C

Solução B

150,0 g de tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 100 mL de água destilada

As soluções foram transferidas para um balão de 500 mL e o volume foi completado com água destilada após o resfriamento da solução.

O meio YPD foi preparado de acordo com Techera *et al.* (2001). Os meios definidos de crescimento e de fermentação, bem como as soluções de vitaminas e de elementos traços foram preparadas segundo Verduyn *et al.* (1992). As outras soluções e tampões foram preparados segundo Sambrook *et al.* (1989).

3.3. Amostras de Leveduras para Testes dos Iniciadores

Para testar a capacidade de discriminação interespecífica e intraespecífica dos iniciadores para regiões de microssatélites (GTG)₅ e (GACA)₅ foram utilizadas as espécies listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Lista e origem das espécies de leveduras utilizadas para testes de discriminação interespecífica e intraespecífica com os microsatélites (GTG)₅ e (GACA)₄

Espécies	Origem/Acesso
<i>Brettanomyces intermedius</i>	URM - 2713
<i>Candida diversa</i>	URM - 4081
<i>C. parapsilosis</i>	URM - 729
<i>C. valida</i>	URM - 2639
<i>Dekkera intermedia</i>	URM - 2688
<i>Hansenula anomala</i>	URM - 2631
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	URM - 1283
<i>Pichia membranaefaciens</i>	URM - 863
<i>Torula utilis</i> *	URM - 115
<i>Torulopsis pulcherrima</i> *	URM - 1061
<i>Rhodotorula minuta</i>	URM - 1147
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	URM - 1460
<i>S. chevaliri</i>	URM - 2624
<i>S. diastaticus</i>	URM - 2716
<i>S. oleaceus</i>	URM - 1820
<i>S. oleaginosus</i>	URM - 1337
<i>S. pastorianus</i>	URM - 512
<i>S. bayanus</i>	NRRL - Y-12624
<i>S. cariocanus</i>	NRRL - Y- 27337
<i>S. kudriavzevii</i>	NRRL - Y-27339
<i>S. mikatae</i>	NRRL - Y-27341
<i>S. calbergensis</i>	CLIB - 176
<i>S. monacensis</i>	CLIB - 180
<i>S. cerevisiae</i>	IAUR - IA-1238
<i>S. cerevisiae</i>	IAUR - IA-1211
<i>S. cerevisiae</i>	IAUR - IA-1255
<i>S. cerevisiae</i>	IAUR - IA-1194
<i>S. cerevisiae</i>	IAUR - IA-1236
<i>S. cerevisiae</i>	IZSP - IZ-1904
<i>S. cerevisiae</i>	Fleischmann
<i>S. cerevisiae</i>	Itaiquara
<i>S. cerevisiae</i>	Zani-Floc
<i>S. cerevisiae</i>	Laci Δ
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC - 9763
<i>S. cerevisiae</i>	KS14-B
<i>S. cerevisiae</i>	STL20-1

- § IAUR – (Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife-PE, Brasil) - Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil
- § Coleção de Culturas da Micoteca URM – Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil .
- § NRLL – Cult. Collect. Ferment. Sect. Northern Utiliz. Res. Branch – USA
- § CLIB – Collection de Luvures d’Intérêt Biotechnologique
- § IZSP – Instituto Zimotécnico de São Paulo – USP, Brasil
- § ATCC – American Type Culture Collection – Washington, USA

* Nomes atuais

Pichia jadinii (Wickerham) Kurtzman

Metschnikowia pulcherrima J.I. Pitt & M.W. Miller

As culturas foram mantidas sob óleo mineral em meio WLN sem corante.

3.4. Coleta e Plaqueamento do Mosto de Cana-de-Açúcar

As amostras para o acompanhamento das populações de leveduras foram obtidas através de coletas de 100 mL de mosto fermentado na dorna de último estágio do processo de fermentação contínua, com intervalos de 15 dias entre as coletas durante todo o período da safra 2000/2001, intervalos de oito dias na safra 2001/2002, e intervalos de 30 dias na safra 2002/2003, na destilaria Japungu, localizada no município de Santa Rita, Estado da Paraíba. Para as destilarias Miriri, Giasa e JB, o intervalo foi de 15 dias para o período de safra 2002/2003. O mosto coletado foi diluído em solução salina 0,85% até 1:10⁶, e 0,1 mL das diluições 1:10⁵ e 1:10⁶ foram plaqueados em duplicata por espalhamento na superfície do meio WLN adicionado de 50mg.L⁻¹ de ampicilina e de 50mg.L⁻¹ de ácido nalidíxico, para inibição do crescimento bacteriano, de forma a se obter aproximadamente 100 colônias de leveduras por placa. Na safra 2001/2002 as amostras de mosto fermentado foram diluídas até 1:10⁷ para se obter placas com 10 a 15 colônias de leveduras. A incubação foi realizada a 30°C por sete dias. Todo trabalho de plaqueamento foi realizado nos laboratórios de microbiologia das destilarias estudadas.

3.5. Contagem, Isolamento e Purificação das Colônias

Após incubação, foram selecionadas placas com aproximadamente 100 colônias que apresentassem boa distribuição com relação ao crescimento. As colônias foram caracterizadas morfológicamente quanto ao bordo, superfície, consistência, tamanho e cor. Após definição dos morfotipos, as frequências foram calculadas pelas porcentagens com relação ao total de colônias daquela placa. O isolamento das leveduras foi realizado através de amostragem dos representantes de cada morfotipo. Nas safras seguintes à safra 2000/2001, em todas as destilarias, o plaqueamento foi ajustado de forma a se obter 10 a 15 colônias de leveduras por placa, e todas as colônias foram coletadas para extração de DNA e tipagem genética independente dos morfotipos presentes. Amostras das colônias foram suspensas em 1mL de salina 0,85% e semeadas por estrias em meio WLN por no mínimo duas vezes para confirmação da pureza das culturas. As culturas puras foram mantidas em tubo com meio WLN sem corante, sob óleo mineral esterilizado.

3.6. Extração do DNA Nuclear

Os isolados foram inoculados em meio YPD líquido e incubados a 30°C por 16 horas a 150rpm. Amostras de 1,0mL de cada cultura foram transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugados por tres minutos a 5.900g. O sobrenadante foi descartado e 600µL de solução de lise foram adicionados, seguido de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada cinco minutos. Igual volume de fenol/clorofórmio (24:1) foi adicionado e após breve agitação as suspensões foram centrifugadas a 15.400g por 10 minutos. Foram transferidos 500µL da fase superior para microtubos novos de 1,5mL e 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (1:1) foram adicionados. As amostras foram centrifugadas mais uma vez por igual período e rotação, e 400µL da fase superior foram transferidos para microtubos novos de 1,5mL. A estes tubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por duas horas a -20°C para precipitação do DNA. Após a precipitação, o DNA foi coletado por centrifugação a 15.400g por 10 minutos, lavado em etanol a 70% por duas vezes, secado em estufa a 37°C por 30 minutos e em seguida ressuspenso em Tampão TE pH 8,0 (TRIS 10mM/EDTA 1mM) mantido a -20°C. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de

260nm após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA , utilizou-se a relação $1 \text{ DO} = 50\mu\text{g/mL}$ (SAMBROOK *et al.* 1989).

3.7. Amplificação do DNA Nuclear

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores usados para amplificar segmentos de DNA de amostras de leveduras isoladas de mosto fermentado de destilarias produtoras de álcool combustível

INICIADOR	SEQÜÊNCIA	MARCADOR	
		MOLECULAR	REFERÊNCIA
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	ISSR	Lieckfeldt <i>et al.</i> (1993)
(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	ISSR	Meyer & Mitchel (1995)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	rDNA	White <i>et al.</i> (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA	rDNA	White <i>et al.</i> (1990)

3.7.1. Microsatélites (GTG)₅ e (GACA)₄

A reação de amplificação de seqüências simples entre repetições (ISSR) por PCR com os iniciadores (GTG)₅ e (GACA)₄ foram realizadas em 25µL de volume final utilizando-se um termociclador HIBRID, de acordo com o protocolo da Tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de reação para amplificação de ISSR por PCR com os iniciadores (GTG)₅ e (GACA)₄

Componentes	Concentração estoque	Volume na reação (µL)	Concentração final
Água destilada		9,75	
Tampão PCR	10X	2,50	1X
BSA (soro albumina bovina)	0,25µg/µL	2,50	0,025µg/µL
Mistura de dNTP	2,0mM	2,50	0,2mM
Iniciador	1,0pmol/µL	5,00	0,2pmoles/µL
MgCl ₂	50mM	1,50	3,0mM
Taq Polimerase	5 U/µL	0,25	0,05U/µL
DNA	50,0ng/µL	1,00	2,0ng/µL

A amplificação para (GTG)₅ foi programada para um ciclo de desnaturação de cinco minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos. Para o iniciador (GACA)₄ foi utilizado a mesma programação alterando a temperatura de anelamento para 45°C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3% submetidos a 7,5 volts/cm por 150 minutos em tampão TBE 0,5X, corados em brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados em sistema Polaroid.

3.7.2. Região ITS do DNA ribossomal

A reação de amplificação da região ITS do DNA ribossomal por PCR foi realizada em 25µL de volume final utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, em termociclador HIBRID de acordo com o protocolo da Tabela 4. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial de seis minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese, nas mesmas condições descritas na seção anterior.

Tabela 4. Protocolo de reação para amplificação da região ITS do rDNA com os iniciadores ITS4 e ITS5

Componentes	Concentração estoque	Volume na reação (μL)	Concentração final
Água destilada		13,35	
Tampão PCR	10X	2,5	1X
BSA	0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2,5	0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Mistura de dNTPs	2,0mM	2,5	0,2mM
Iniciador ITS4	12,5pmoles/ μL	1,0	0,5pmoles/ μL
Iniciador ITS5	12,5pmoles/ μL	1,0	0,5pmoles/ μL
MgCl ₂	50,0mM	0,75	3,0mmoles/ μL
Taq Polimerase	5U/ μL	0,40	0,05U/ μL
DNA	50ng/ μL	1,0	2,0ng/ μL

3.8. Ensaio Fermentativo dos 16 perfis (GTG)₅ da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001

As culturas foram pré-inoculadas em 10 mL de meio definido de crescimento contidos em tubos de cultura de 15x150mm e incubadas por 16 horas a 30°C. Em seguida foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 mL de meio definido de crescimento com 2% de sacarose e incubadas por 24 horas a 30°C. Ao final da incubação as culturas foram diluídas 100 vezes para leitura da densidade óptica (DO) em 600 nanômetros. As células foram coletadas por centrifugação a 2800g por cinco minutos em temperatura ambiente, com posterior lavagem em salina 0,85% esterilizada. Em seguida as células foram ressuspendidas em meio de fermentação com 12% de sacarose em volume calculado para se obter uma DO de 120 e transferidas para tubos de cultura de 20x180mm. A fermentação ocorreu a 33°C em banho agitado até que o °brix se repetisse e a produção de CO₂ estivesse encerrada, confirmando o final da atividade fermentativa. Foram realizadas medidas de DO no início e final da fermentação diluindo-se as amostras 100 vezes. Durante a fermentação foram observadas a produção de CO₂, a leitura de °brix e tempo de fermentação. Ao final da fermentação o volume fermentado foi centrifugado a 2800g por cinco minutos a 4°C e o

sobrenadante transferido para tubos de cultura de 15x150mm com tampas de rosca e mantido a 4°C para posterior determinação do teor alcoólico, glicerol e açúcares redutores totais.

3.8.1. Determinação de Glicerol

A concentração de glicerol do sobrenadante após ensaio fermentativo foi determinada pelo método enzimático através de “kit” GPO-PAP (LABORLAB, Brasil) para determinação de triglicerídeos em amostras clínicas. Foi preparada uma curva de calibração de glicerol na concentração de 2g/L com diluições de 1,6g/L, 1,2g/L, 0,8g/L e 0,4g/L. Para 10 µL de cada diluição foi adicionado 1mL do reagente enzimático. O branco foi constituído de 10µL de água destilada mais 1mL do reativo enzimático. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos e a DO lida em comprimento de onda de 505 nanômetros como recomendado pelo fabricante. A concentração de glicerol em g/L foi obtida multiplicando-se a DO pela diluição da amostra (quando houve) e pelo fator da curva de calibração.

3.8.2. Determinação do °Brix e Açúcares Redutores Totais (ART)

A determinação do °Brix foi realizada utilizando-se o refratômetro e a concentração do açúcar inicial e final das fermentações foi realizada pelo método do ácido denitrosalisílico (ADNS). Foi preparada uma curva de calibração com uma solução aquosa de glicose na concentração de 2g/L com diluições de 0,5g/L, 1,0g/L, 1,5g/L e 2,0g/L. Foi utilizado 1mL da amostra do meio fermentado adicionando-se 100µL de HCL 1M. Após agitação a amostra foi aquecida a 100°C por 10 minutos para hidrólise da sacarose e em seguida foi adicionado 100µL de NaOH 1M e 1mL de reativo ADNS. Após aquecimento a 100°C por cinco minutos o volume foi completado para 10mL com água destilada após o resfriamento e a DO lida em comprimento de onda de 540nm. O valor do açúcar em g/L foi obtido multiplicando-se o valor da leitura de DO pela diluição e pelo fator da curva de calibração. O controle foi preparado com 1ml de água destilada nas mesmas condições.

3.8.3. *Determinação do Teor Alcoólico*

O conteúdo de álcool nas amostras de mosto fermentado foi determinado por cromatografia gasosa em equipamento CG-37 no laboratório de controle de qualidade da destilaria Japungu. Após calibração do equipamento, 5µL do mosto fermentado centrifugado foi injetado para análise do teor alcoólico.

3.9. *Identificação das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001*

A identificação das leveduras representantes dos 16 perfis (GTG)₅ da destilaria Japungu isoladas na safra 2000/2001 foi realizada pelo método clássico no Departamento de Micologia da UFPE.

3.10. *Análises Estatísticas*

Os dados obtidos das ampliações com os marcadores (GTG)₅ e (GACA)₄ foram analisados pelo programa Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs – NTSYS-PC 2.1 (ROHLF, 1998; BUSSAB *et al.* 1990). Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, nas quais o número 1 (um) significa a presença da banda e o número 0 (zero) a ausência da banda. A partir das bandas no gel, o programa construiu uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente similaridade de Jacard (J) calculado de acordo com a fórmula:

Onde:

$$J = \frac{A}{(P - D)}$$

A= número de concordâncias positivas (variáveis presentes);

P= número total de variáveis;

D= número de concordâncias negativas (variáveis ausentes)

A partir da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average).

Os resultados das análises fermentativas representam a média aritmética de 3 ensaios fermentativos consecutivos para cada isolado.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização Morfológica das Colônias

A Figura 2 ilustra 23 diferentes tipos de colônias encontradas e utilizadas na definição dos morfotipos. Colônias rugosas com bordo irregular, levemente convexas, e com diâmetro maior que 4 mm, apresentaram grande variação de tonalidades em razão da absorção do corante presente no meio. As colônias lisas apresentaram diâmetro variando entre 2 e 5 mm, bordo circular, consistência butirosa, elevação convexa ou cônica. Variações de tonalidades com relação ao corante também foi observado, facilitando a discriminação dos morfotipos.

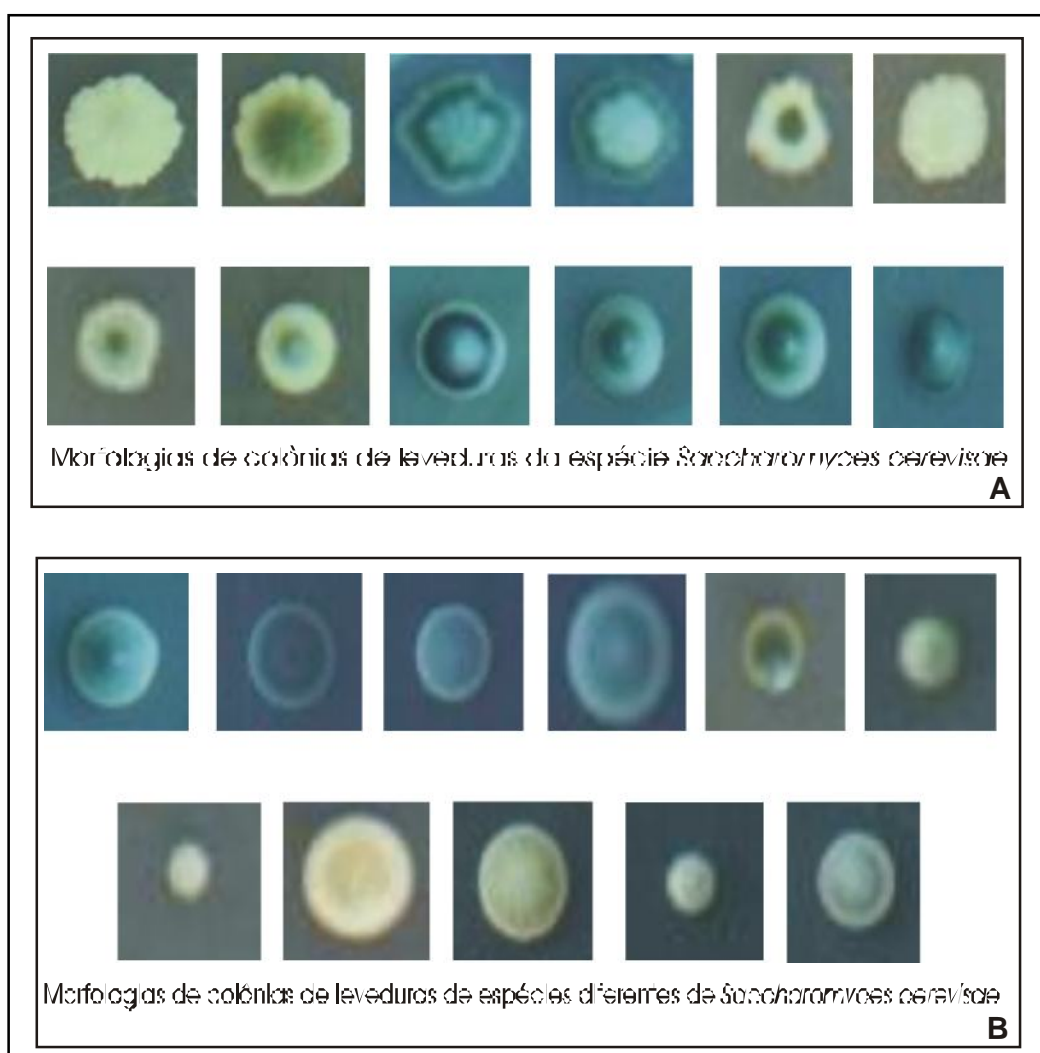


Figura 2. Tipos morfológicos de colônias de leveduras incubadas em meio WLN por sete dias a 30°C, provenientes de amostras de mosto fermentado de destilarias produtoras de álcool combustível da Paraíba e Pernambuco.

4.2. Amplificação do DNA das Leveduras de Coleção

A Figura 3 mostra os perfis das regiões de seqüências simples inter-repetidas (ISSR) de 11 espécies de leveduras de coleções pertencentes a 10 gêneros, obtidos após amplificação com o iniciador (GTG)₅. O DNA de todas as espécies foram amplificados apresentando padrões que variaram de nove a 19 fragmentos com peso molecular entre 450 e 3100 pares de bases (pb). O elevado polimorfismo observado permitiu que todas fossem discriminadas por padrões espécie-específicos.

O iniciador (GTG)₅ também foi analisado quanto a capacidade para diferenciar espécies de um mesmo gênero e linhagens de uma mesma espécie. A Figura 4 ilustra os perfis obtidos da amplificação de oito diferentes espécies de leveduras de coleção pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. A amplificação gerou perfis com padrão variando de nove bandas para *S.kudriavzevii* (pista 7) a 17 bandas para *S. bayanus* (pista 2), permitindo discriminação de todas as espécies analisadas.

A Figura 5 apresenta os perfis obtidos da amplificação de 15 linhagens de *S. cerevisiae* entre leveduras de coleção e industriais, cinco diferentes espécies do gênero *Saccharomyces* sendo uma delas com duas linhagens e uma espécie não pertencente a este gênero. Das 15 linhagens de *S. cerevisiae*, 11 foram discriminadas através de bandas polimórficas. As linhagens IA-1238 e IZ-1904 (pistas 3 e 8) apresentaram o mesmo padrão de bandas, o mesmo acontecendo para ITAIQUARA e ATCC 9763 (pistas 10 e 13), e para as linhagens de laboratório KS14-B e STL20-1 (pistas 14 e 15). A linhagem IA-1194 apresentou perfil com padrão totalmente distinto daquele observado na espécie *S. cerevisiae*. Das cinco espécies do gênero *Saccharomyces* analisadas nesta amplificação, apenas *S. chevaliere* e *S.pastorianus* apresentaram perfis com padrão de bandas distinto do padrão típico encontrado em *S. cerevisiae*.

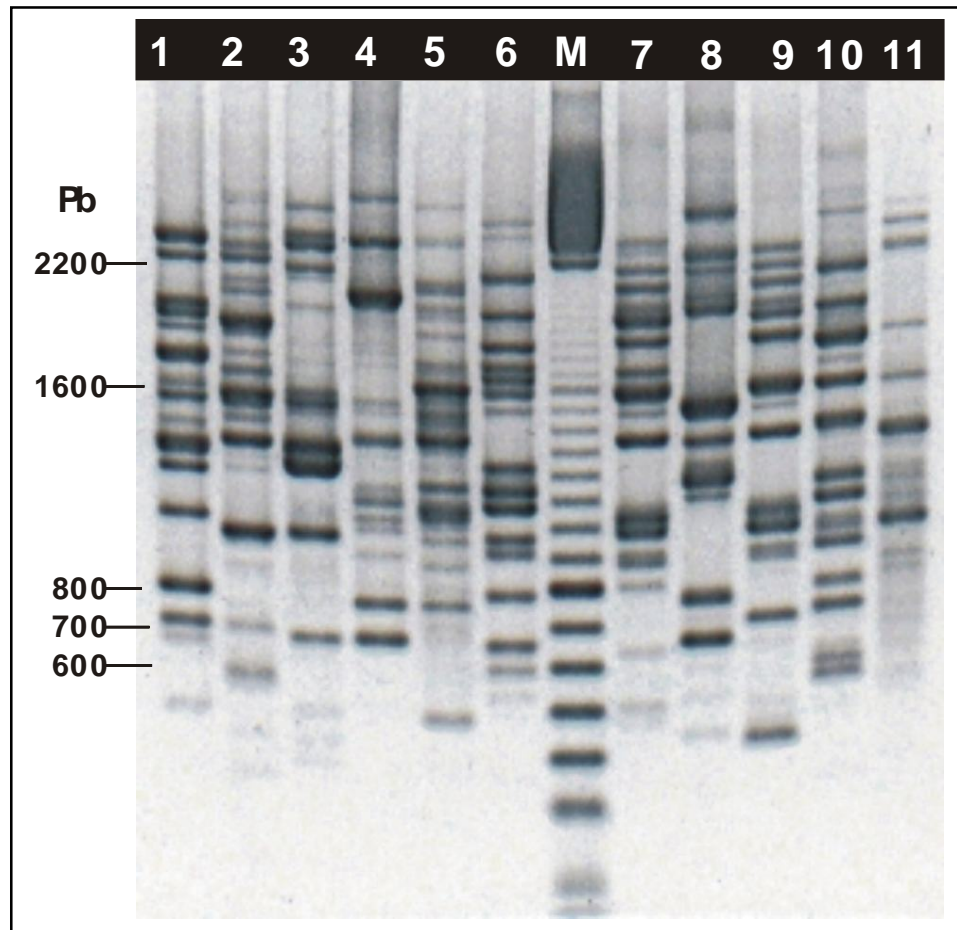


Figura 3 . Perfis da amplificação de ISSR de 11 espécies de leveduras de coleção com o iniciador (GTG)₅. Na pista **M** marcador de peso molecular de 100pb; nas pistas de 1: *Pichia membranaefaciens* 2: *Hansenula anomala* 3: *Dekkera intermedia* 4: *Saccharomyces cerevisiae* 5: *Candida valida* 6: *C. parapsilosis* 7: *Brettanomyces intermedius* 8: *Kluyveromyces polysporus* 9: *Metschnikowia pulcherrima* 10: *Pichia jadinii* 11: *Rhodotorula minuta*

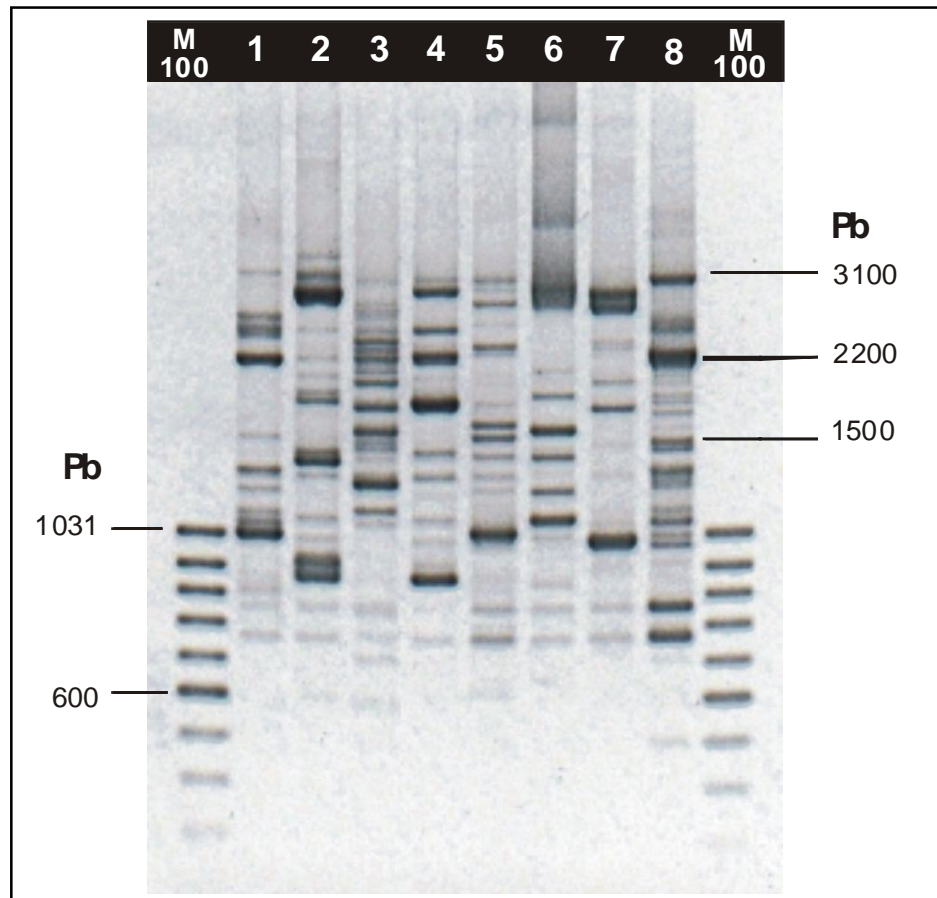


Figura 4. Perfis da amplificação de ISSR de 8 diferentes espécies do gênero *Saccharomyces* com o iniciador $(GTG)_5$. Nas pistas (M100): marcador de pelo molecular de 100pb. Pistas 1: *Saccharomyces paradoxus*, 2: *S. bayanus*, 3: *S. calbergensis*, 4: *S. monacensis*, 5: *S. cariocanus*, 6: *S. mikatae*, 7: *S. kudriavzevii*, 8: *S. cerevisiae*

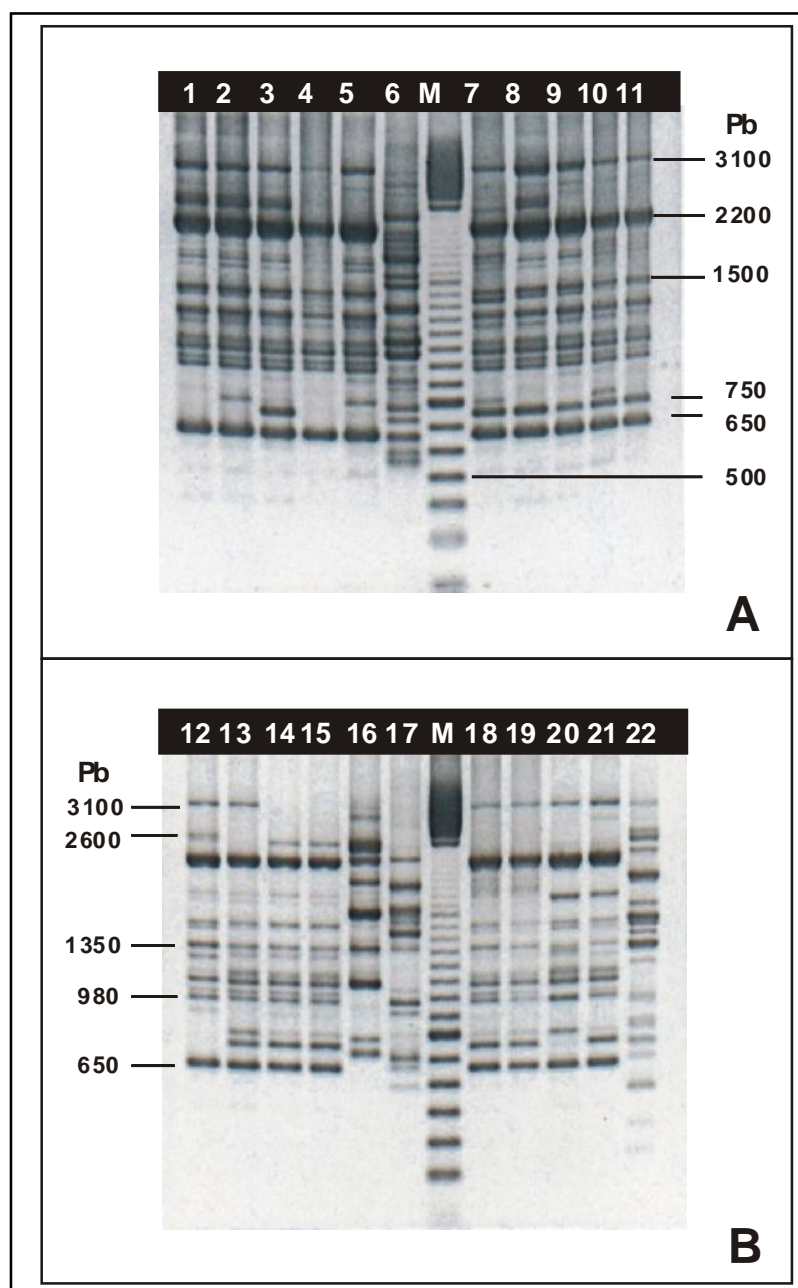


Figura 5. Perfis da amplificação de ISSR com o iniciador $(GTG)_5$ de 15 linhagens de *S. cerevisiae* e 6 espécies de *Saccharomyces*. **5A** - pista **M**, marcador de peso molecular de 100pb, e pistas de 1: *S. cerevisiae* 1460 (a), 2: 1460 (b), 3: IA-1238, 4: IA-1211, 5: IA-1255, 6: IA-1194, 7: IA-1236, 8: IZ-1904, 9: Fleischmann, 10: Itaiquara, 11: Zani-Floc, **5B** – pista **M**, marcador de peso molecular de 100pb, e pistas 12: *S. cerevisiae* ATCC 9763, 13: *S. cerevisiae* LACI Δ , 14: *S. cerevisiae* KS-14B, 15: *S. cerevisiae* STL20-1, 16: *S. chevalieri*, 17: *Candida* diversa, 18: *S. diastaticus* (a), 19: *S. diastaticus* (b), 20: *S. oleaginosus*, 21: *S. oleaceus*, 22: *S. pastorianus*

4.3. Tipagem das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001

Em razão dos melhores resultados encontrados para discriminar linhagens de *S.cerevisiae*, o iniciador (GTG)₅ de ISSR foi adotado como marcador molecular para acompanhar populações desta espécie em domas de fermentação para produção de álcool combustível. No período de 211 dias de safras, 213 colônias isoladas do mosto fermentado foram amplificadas pelo (GTG)₅ e agrupados em 16 tipos de perfis genéticos (Figura 6). Os perfis encontrados apresentaram padrão de bandas que variou de 450 pb a 3100 pb como no perfil P14. As bandas de 650, 980, 1020, 1080, 1120, 1350, 1450, 1500, 2200 e 3100 pb apresentaram-se como um conjunto de bandas monomórficas, caracterizando o perfil típico da espécie *S. cerevisiae*. A banda de 750 pb foi a única da região inferior dos perfis entre as bandas de 650 e 980 que apresentou polimorfismo com amplificação consistente. O maior polimorfismo foi encontrado na região superior dos perfis entre as bandas de 2200 e 3100 pb. A presença ou ausência de bandas neste intervalo, juntamente com a presença ou ausência da banda de 750 pb permitiram discriminar linhagens de *S. cerevisiae*. O isolado de perfil P21 foi o único que apresentou padrão distinto, compartilhando com os demais perfis apenas tres bandas das 15 apresentadas.

Representantes dos 16 perfis gerados pela amplificação com iniciador (GTG)₅ foram agrupados pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard. O dendrograma obtido apresentado na Figura 7 mostra o grau de similaridade entre eles. Todos os perfis, com exceção do P22, puderam ser agrupados com 78% de similaridade. Onze perfis foram reunidos em dois grandes grupos com 85% de similaridade: o grupo A representado pelos perfis P1, P1A, P3, P6, P18, P19, e o grupo B representado pelos perfis P4, P4A, P20, P5, e P15. Os isolados P15A e 18A foram reunidos em um grupo com 92% de similaridade. O perfil P18A e a linhagem *S.cerevisiae* IA-1238 de referência apresentaram 100% de similaridade. Os perfis P22 e P14 apresentaram maior distância genética com 62% e 70% de similaridade respectivamente. O perfil P21 apresentou a menor relação genética entre os perfis agrupados com apenas 8% de similaridade.

Os mesmos representantes dos 16 perfis genéticos caracterizados pelo (GTG)₅ foram amplificados com o iniciador (GACA)₄ para amplificação de ISSR. A amplificação gerou perfis de nove a 14 bandas com peso molecular variando entre 300 e 2800pb (Figura 8). Os perfis gerados também foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard. O dendrograma obtido indicou o grau de similaridade entre os isolados (Figura 9). A amplificação com o (GACA)₄ mostrou maior percentual de

similaridade e conseqüentemente menor variação genética, discriminando apenas sete dos 16 perfis isolados e caracterizados pelo (GTG)₅. Os perfis foram reunidos em dois grupos: grupo A representado pelos perfis P1, P18, P1A, P4A, P5, P15, P19, P18A, P14, E P20 com 92 % de similaridade, e o grupo B representado pelos perfis P3, P6, P4, P15A com 88 % de similaridade. O perfil P22 apresentou-se isolado, relacionando-se com o grupo A em nível de 78% de similaridade. Os grupos A e B relacionaram-se ao nível de 62% de similaridade. O perfil P21 mostrou-se geneticamente distante, com apenas 4% de similaridade.

O fragmento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA de *S. cerevisiae* amplificado pelos iniciadores ITS4 e ITS5, já foi seqüenciado revelando um tamanho de 880 pb (GUILLAMÓN *et al.*, 1998). Os representantes dos 16 perfis foram amplificados com estes iniciadores para verificar se os isolados caracterizados pelo (GTG)₅ como *S. cerevisiae* de fato apresentavam a banda de 880 pb. Com exceção do isolado 181-P21 que apresentou banda de 450pb (Figura 10A), em todas as amostras de DNA foi confirmada a banda típica de 880 pb. Os isolados das safras 2001/2002 e 2002/2003 também foram submetidos a mesma amplificação para confirmação do fragmento de 880pb. Na Figura 10B, os perfis P5, P6, e P18 representam os isolados predominantes da safra 2001/2002 detectados a partir de 10% na população, na qual observa-se que todos apresentaram o mesmo fragmento de amplificação da linhagem de referência. Os isolados da safra 2002/2003 estão representados pelos perfis P1, P18, P24, e perfis de leveduras selvagens do tipo S1, S2, S3, S4, com bandas de 520 pb.

4.4. Identificação das Leveduras Representantes dos 16 Perfis (GTG)₅ da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001

Estes isolados foram enviados para identificação no Departamento de Micologia da UFPE e confirmados como *S. cerevisiae* ou sua fase assexuada *Candida robusta*, com exceção do isolado 181-P21 que foi identificado como *Brettanomyces anomalus*, fase assexuada de *Dekkera anomala*.

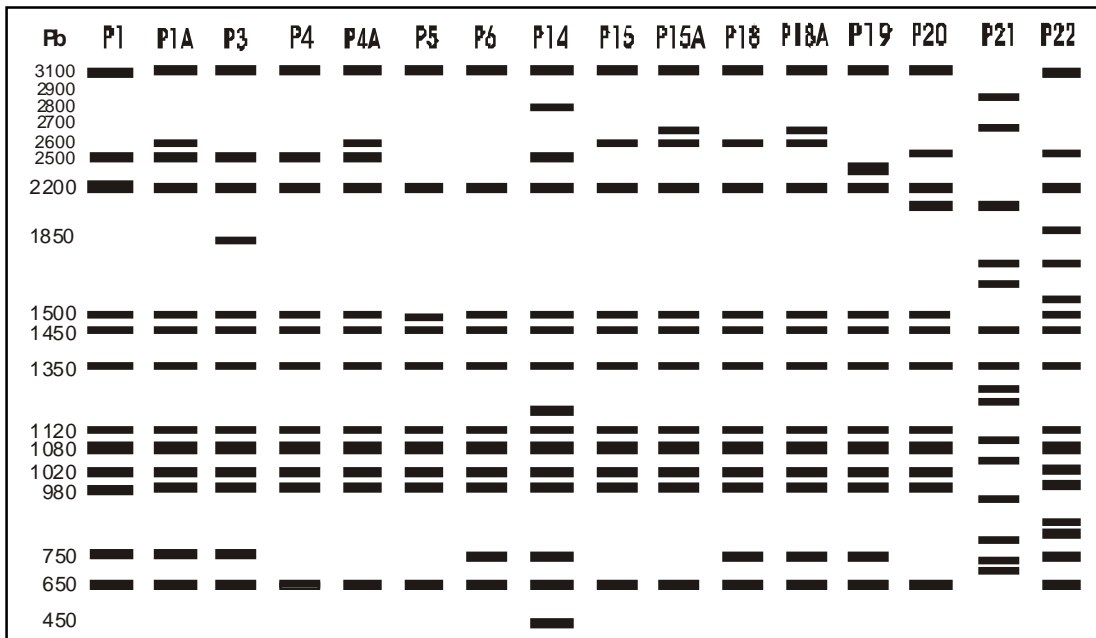


Figura 6. Eletroferograma dos 16 perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2000/2001

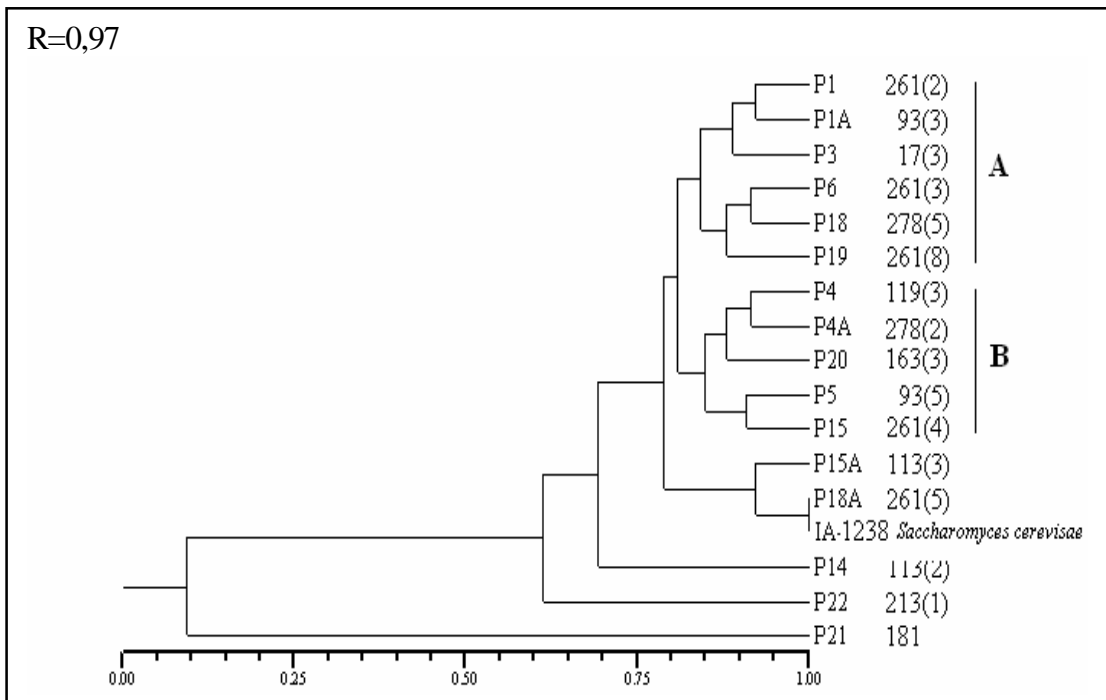


Figura 7. Dendrograma dos 16 perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2000/2001, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard. À direita estão representados os isolados dos diferentes perfis de amplificação

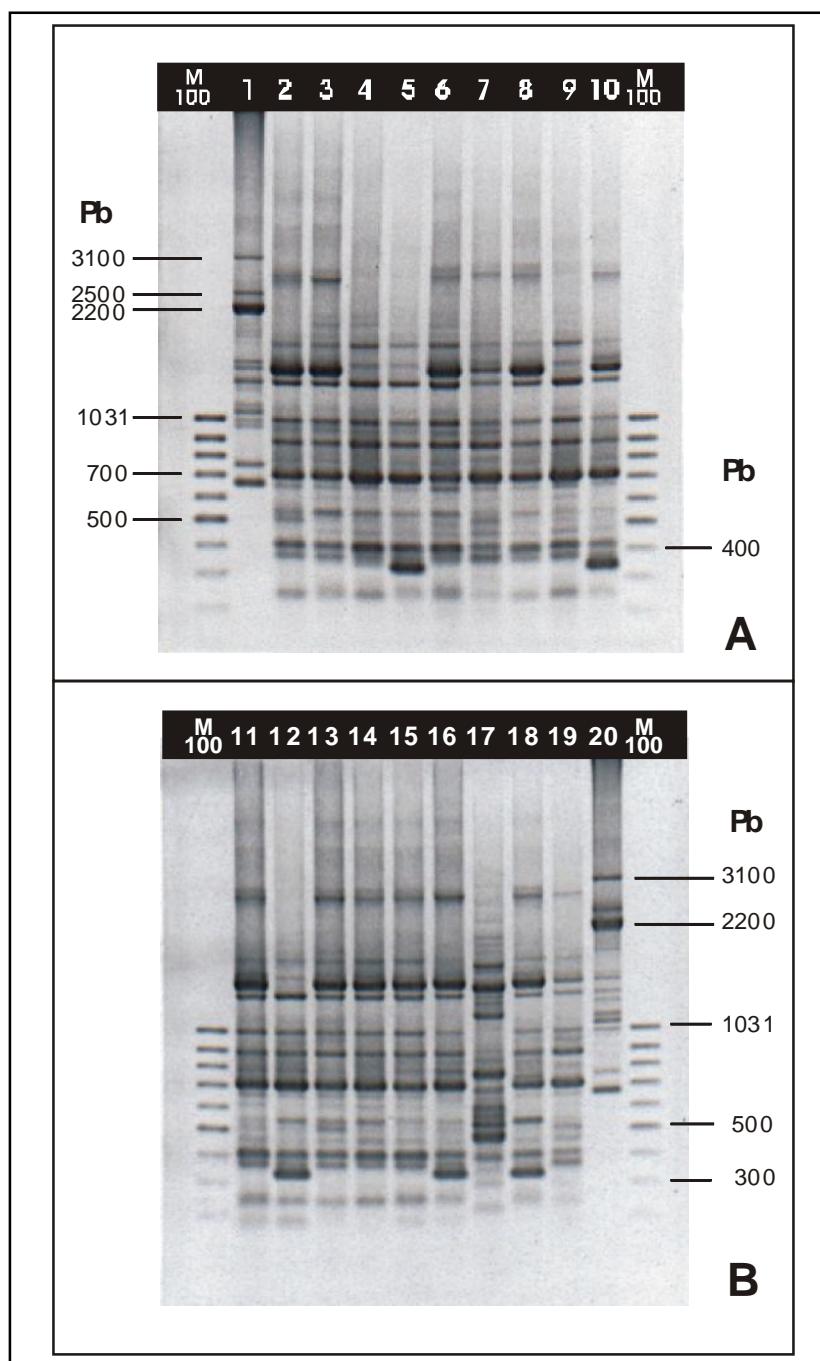


Figura 8. Perfis da amplificação de ISSR com o iniciador $(GACA)_4$ das leveduras representantes dos 16 perfis caracterizados pelo iniciador $(GTG)_5$. Pistas (M-100): marcador de peso molecular de 100 pares de base. Pistas 1 e 20 - isolado 261(7) amplificado pelo $(GTG)_5$ usado como marcador; (A) pistas 2: P1, 3: P1A, 4: P3, 5: P4, 6: P4A 7: IA1238, 8: P5, 9: P6, 10: P14, (B) pistas 11: P15, 12: P15A, 13: P18, 14: P18A, 15: P19, 16: P20, 17: P21, 18: P22, 19: IA1238

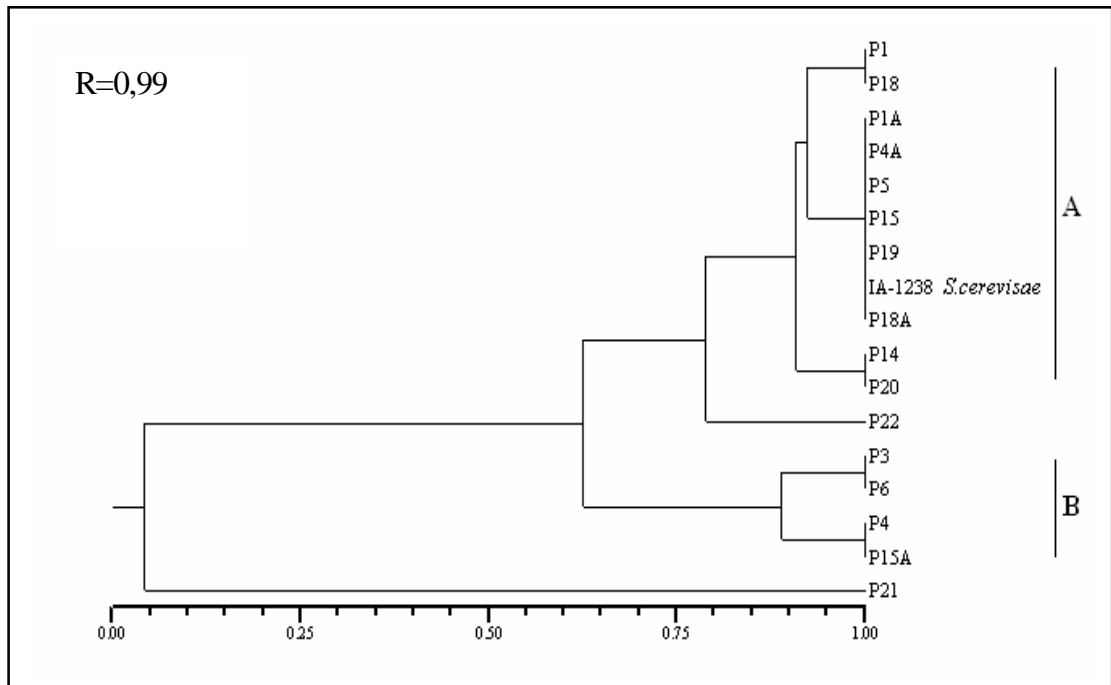


Figura 9. Dendrograma dos perfis resultantes da amplificação de ISSR com o iniciador (GACA)₄ das leveduras representantes dos 16 perfis (GTG)₅, obtido através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard.

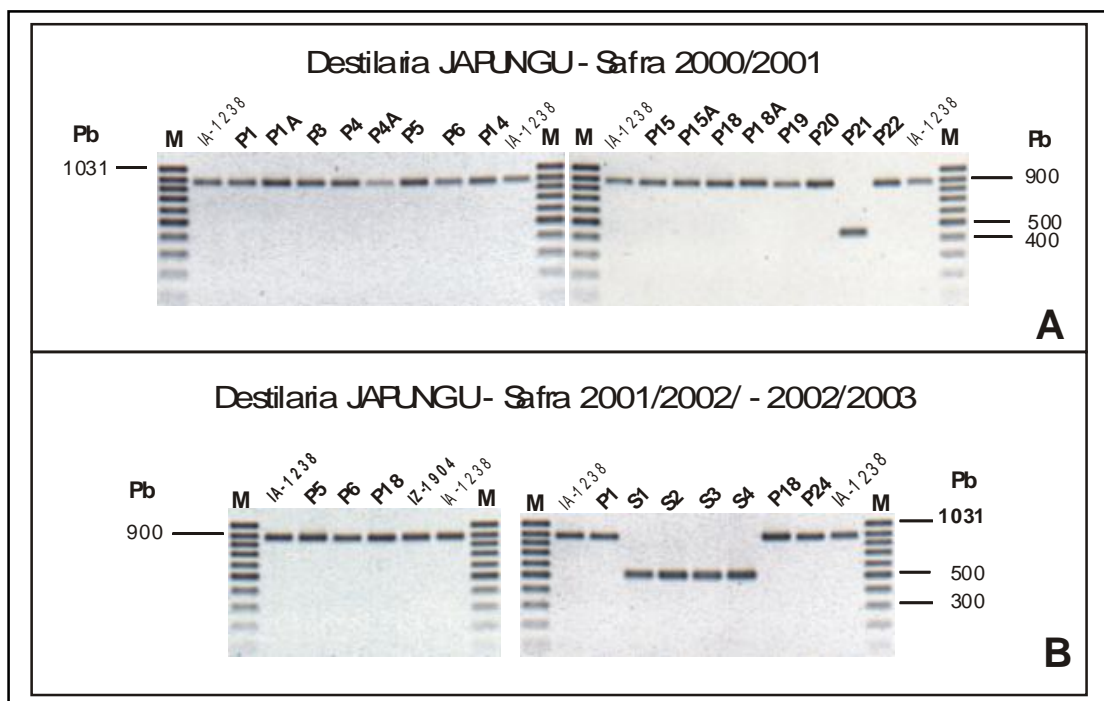


Figura 10. Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representante dos perfis (GTG)₅, isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu. (A) safra 2000/2001; (B) safras 2001/2002 e 2002/2003

4.5. Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001

As frequências das leveduras representadas pelos perfis (GTG)₅ no período de 211 dias da safra 2000/2001 são apresentadas na Tabela 5. A Figura 11 ilustra graficamente as frequências dos perfis em cada coleta ao longo do período. A linhagem de partida *S.cerevisiae* IA-1238, que tem perfil P18A, apresentou 100% de frequência na 1ª coleta do início da safra. Entretanto, após 15 dias de fermentação não foi mais detectada sua presença, reaparecendo apenas na 14ª coleta, com 196 dias. Os perfis P3, P14, P15A, P20 e P21 apareceram apenas uma vez em todo período, nas coletas 2, 7, 9 e 10, com frequências de 52,2, 4,3, 8,7, 7,7 e 7,1%, respectivamente (Tabela 5). Os perfis P1 e P4 foram os mais frequentes, aparecendo em 14 das 15 coletas realizadas com 93,3%. O perfil P1 apareceu dominando em oito das 15 coletas (53,3%), enquanto o perfil P4 dominou em 4 das 15 coletas (26,6%).

Na Figura 12 observa-se a frequência de cada perfil em todo período da safra 2000/2001. Os três perfis mais frequentes em nenhum momento da safra foram utilizados como inóculos, mas se estabeleceram espontaneamente. Apesar de se observar grande diversidade de perfis nas populações de leveduras, 13 dos 16 perfis tiveram frequências abaixo de 10%, indicando que a fermentação foi dominada por um número pequeno de linhagens.

4.6. Ensaio Fermentativo dos Representantes dos 16 Perfis (GTG)

Foram realizados ensaios fermentativos em laboratório com os representantes dos 16 perfis utilizados na tipagem pelo (GTG)₅. Após a fermentação de 120 gramas de sacarose por litro, com 10% de células em volume úmido, foram analisados para cada isolado, o açúcar residual, produção de etanol, glicerol, rendimento, eficiência e tempo de fermentação. O tempo de fermentação variou de duas a quatro horas, e o açúcar residual foi menor que 1g/L para todos, com exceção dos isolados correspondentes aos perfis P21 e P22, que encerraram a fermentação com 50,3 e 46,3 gramas por litro respectivamente, resultando em baixos rendimentos. A maioria dos isolados apresentaram elevados rendimentos com eficiências de fermentação acima de 90% (Tabela 6).

Tabela 5. Frequência dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2000/2001

dias	P1	P1A	P3	P4	P4A	P5	P6	P14	P15	P15A	P18	P18A	P19	P20	P21	P22
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND
15	26,1	ND	52,2	13,1	ND	4,3	4,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	30	10	ND	30	ND	ND	20	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND
44	62,5	ND	ND	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12,5	ND	ND	ND	ND	ND
60	12,5	25	ND	37,5	ND	ND	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
75	42,8	28,6	ND	14,3	ND	14,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
90	17,4	8,7	ND	21,7	4,3	ND	13,1	4,3	8,7	8,7	13,1	ND	ND	ND	ND	ND
105	30	20	ND	20	ND	20	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
120	38,5	7,7	ND	15,4	ND	30,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7,7	ND	ND
134	7,2	ND	ND	57,2	ND	ND	7,1	ND	7,1	ND	7,2	ND	ND	ND	7,1	7,1
148	20	33,3	ND	33,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13,4
165	45	5	ND	10	ND	25	5	ND	ND	ND	5	ND	5	ND	ND	ND
181	23,5	5,9	ND	17,5	5,9	11,8	5,9	ND	11,8	ND	11,8	ND	5,9	ND	ND	ND
196	43,7	ND	ND	6,3	6,3	ND	6,3	ND	18,6	ND	6,3	6,3	6,2	ND	ND	ND
211	47,3	ND	ND	5,3	15,7	5,3	5,3	ND	ND	ND	21,1	ND	ND	ND	ND	ND

* Os valores representam o percentual de cada perfil em relação ao número total de isolados analisados em cada coleta.

ND – não detectado.

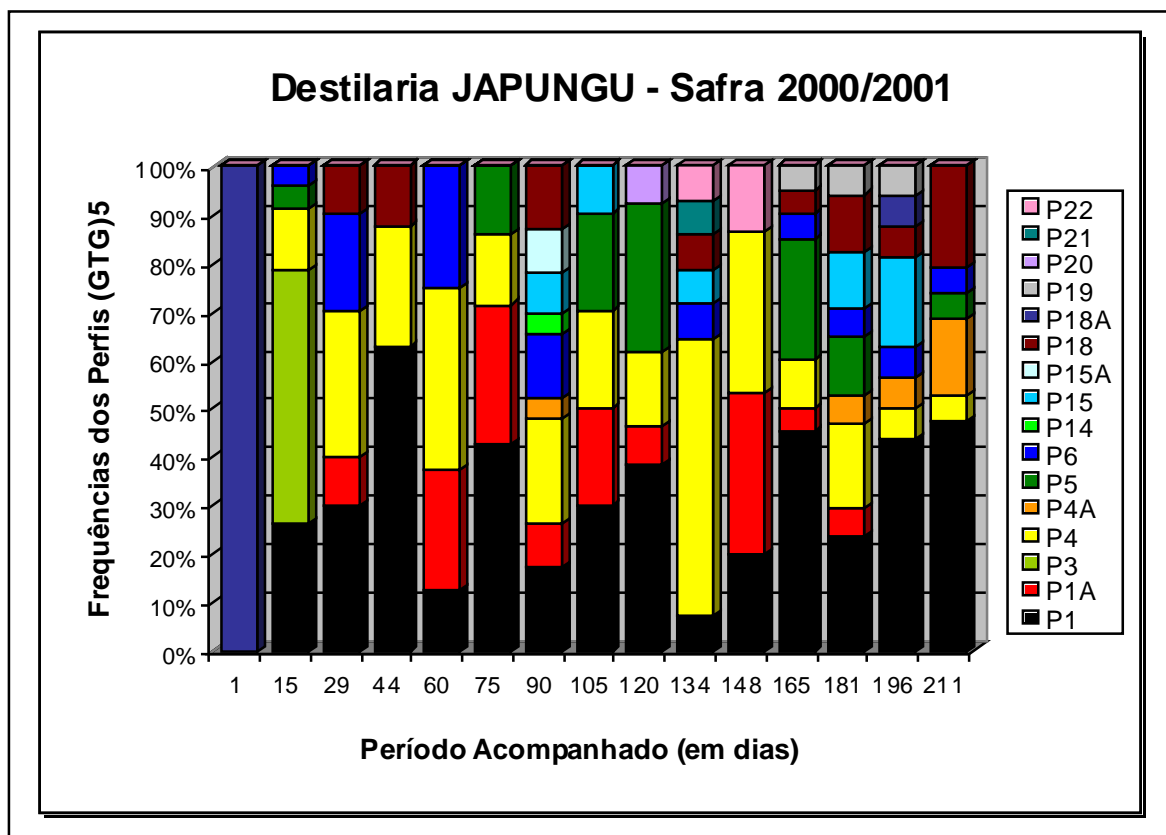


Figura 11. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu em 15 coletas no período de safra 2000/2001, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅

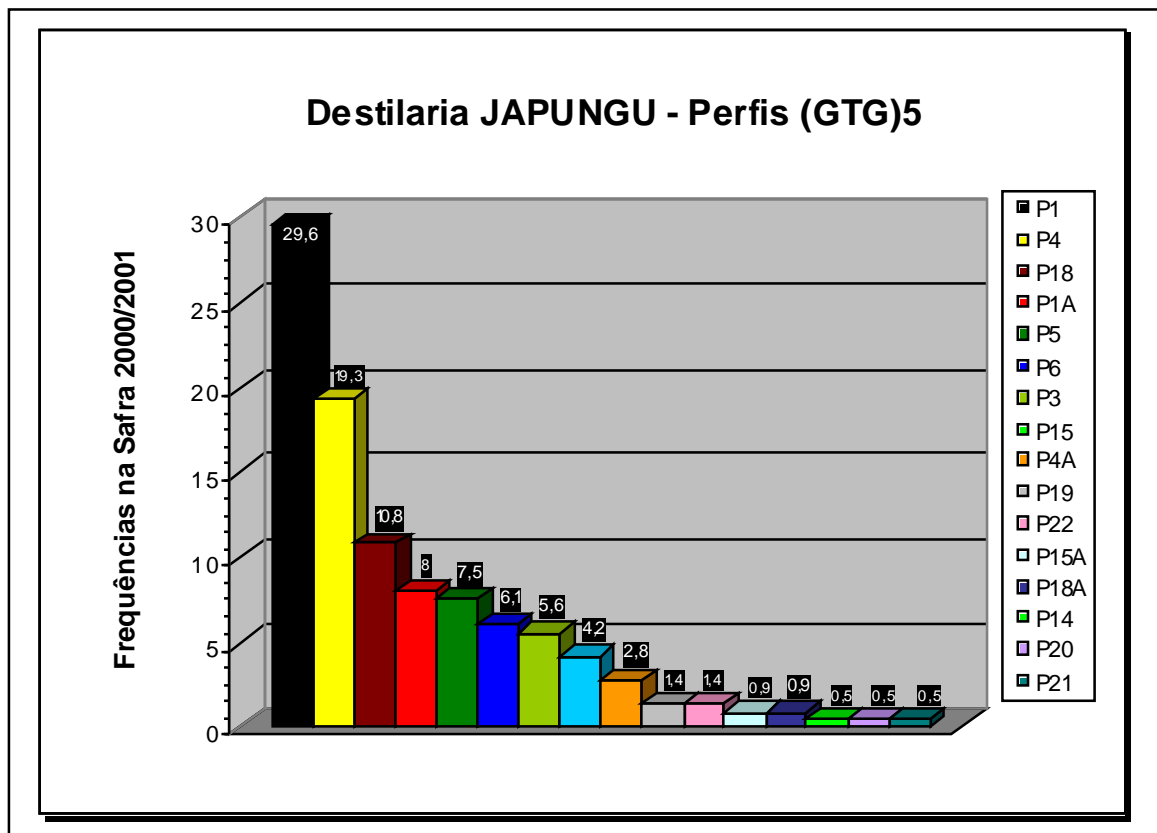


Figura 12. Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2000/2001 na destilaria Japungu

Tabela 6. Ensaio fermentativo das leveduras representantes dos 16 perfis (GTG)₅, isoladas da destilaria JAPUNGU na safra 2000/2001

parâmetro	perfil / isolado															
	P1	P1A	P3	P4	P4A	P5	P6	P14	P15	P15A	P18	P18A	P19	P20	P21	P22
	261(1)	93(1)	16(3)	18(2)	246(4)	151	68(1)	113(2)	113(3)	113(5)	261(9)	114(2)	261(8)	163(3)	181	185(3)
T. FERM.(h)	3,3	4	3	4	4	4	3	3	4	3	3	3	2	2	4	3
AI (g/L)	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
AF (g/L)	0,3	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,4	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	50,3	46,3
ETOH (g/L)	59	58	54	57	60	55	54	56	59	56	56	55	61	60	30	33
REND (g etanol/g sac)	0,49	0,49	0,45	0,48	0,50	0,46	0,45	0,47	0,49	0,47	0,47	0,46	0,51	0,50	0,25	0,28
EMT (%)	96	96	88	94	98	90	88	92	96	92	92	90	100	98	49	55
GLICEROL(g/L)	5,9	7,8	7,4	6,8	6,5	8,5	7,8	5,8	5,9	5	7,3	6,2	6,8	7,8	1,9	2,9

T. FERM (h) = tempo de fermentação em horas

AI (g/L) = açúcar inicial em gramas por litro

AF (g/L) = açúcar final em gramas por litro

ETOH (g/L) = etanol em gramas por litro

REND (g. etanol/g. sac) = rendimento em grama de etanol por grama de sacarose

EMT = eficiência do máximo teórico

* Os resultados representam a média aritmética de 3 ensaios fermentativos consecutivos para cada isolado.

4.7. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2001/2002

A safra 2001/2002 foi iniciada a partir de uma cultura pura com perfil P18, que apareceu com frequência de 21,1% no mosto fermentado da última coleta da safra anterior (Tabela 5). No período de 134 dias da safra 2001/2002, o DNA de 150 colônias isoladas do mosto fermentado foi amplificado pelo (GTG)₅ e agrupadas em três perfis: P5, P6 e P18 (Figura 13). O perfil P5 esteve presente em duas das 15 coletas realizadas no período (13,3% de aparecimento) com frequências de 10 e 20% respectivamente. O perfil P6 apareceu apenas uma vez apresentando frequência de 10%. A distribuição das frequências destes perfis, ilustrada no gráfico das Figuras 14 e 15 indica a predominância do perfil P18 em todo período de safra. Este fato se deve à prática de injeção de fermento no processo (Tabela 7), que nesta safra foi de 416.666 litros mensais, com o objetivo de manter a frequência da levedura de processo sempre alta, o que também depende diretamente das características da levedura que está sendo usada.

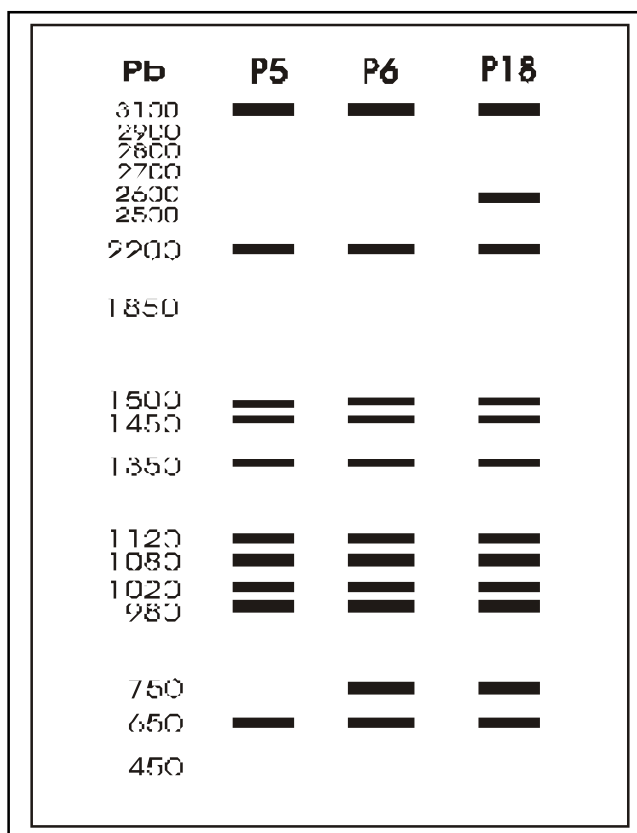


Figura 13. Eletroferograma dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2001/2002, detectadas na população a partir de 10% de frequência

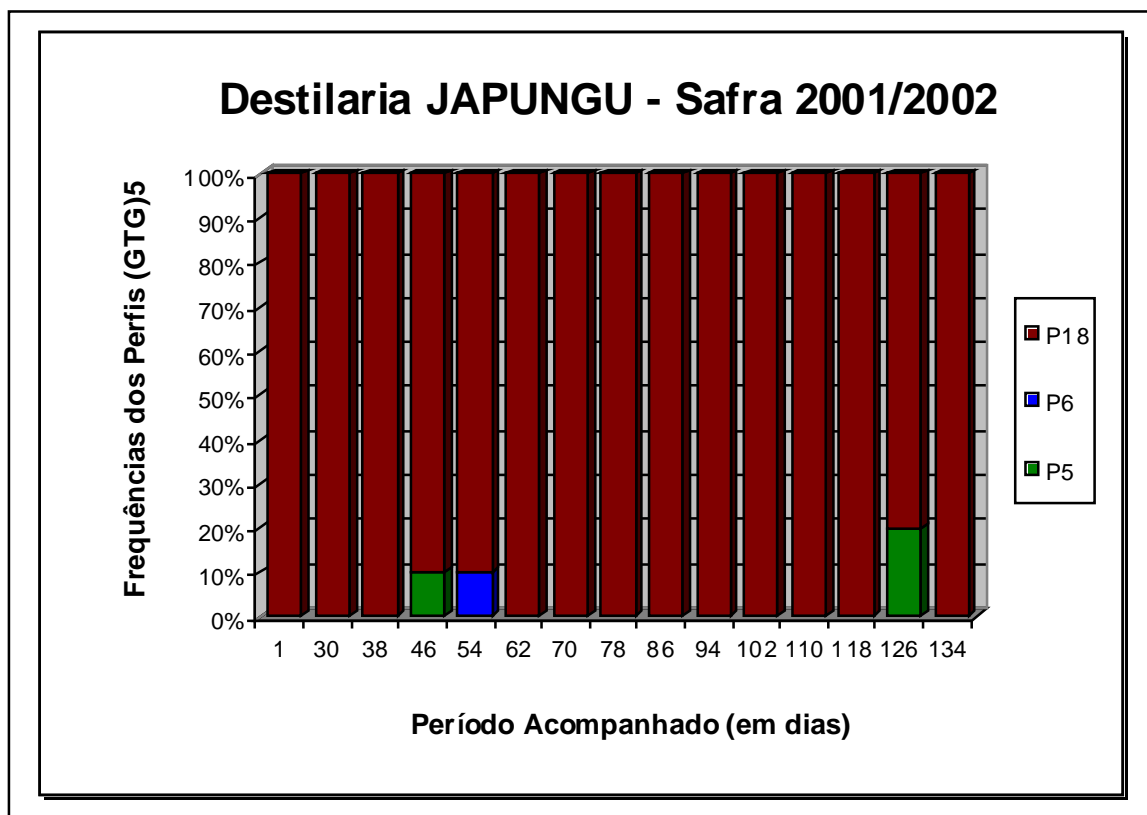


Figura 14. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu em 15 coletas no período de safra 2001/2002, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador $(GTG)_5$, detectadas a partir de 10% de frequência

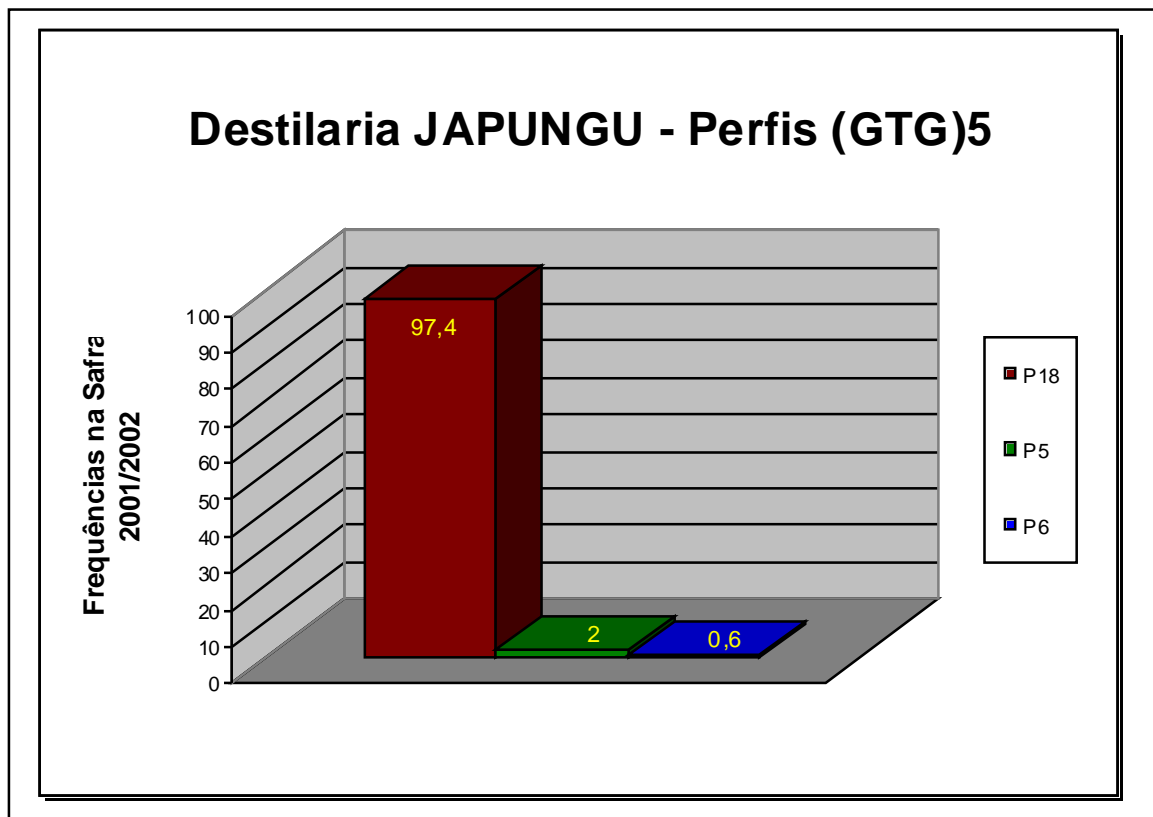


Figura 15. Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2001/2002 na destilaria Japungu, detectadas a partir de 10% de frequência

4.8. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2002/2003

A safra 2002/2003 foi iniciada a partir de culturas puras com perfil P18 isoladas no final das safras 2000/2001 e 2001/2002. No período de 213 dias, o DNA de 80 colônias isoladas do mosto fermentado foi amplificado com o (GTG)₅ e identificadas como perfis P1, P18, P24 e selvagens S1, S2, S3 e S4 (Figura 16). As frequências desses perfis em cada coleta estão ilustradas na Figura 17 e foram detectadas a partir de 10% de frequência na população. Observa-se que a levedura de partida P18 apareceu dominando em seis das oito coletas do período. Nesta safra foram injetados no processo 187.500 litros mensais desta cultura (Tabela 7). Na 5ª coleta, com 124 dias de safra, 40% das leveduras do processo apresentaram perfis do tipo selvagens. Na coleta seguinte, com 153 dias de safra, a frequência de leveduras selvagens subiu para 80%, a frequência das leveduras do tipo P18 caiu para 10%, e o perfil P1 foi detectado com frequência de 10%. Problemas no processo advindos do elevado nível de leveduras selvagens na população acarretou o descarte total do fermento e a troca por outro inóculo de leveduras do tipo P18 utilizadas no início da safra. Na coleta seguinte, com 186 dias, os perfis P18 e P1 apareceram dominando com 40% de frequência cada um, enquanto 20% da população era composta por um perfil novo do tipo *S. cerevisiae* catalogado como P24, que só apareceu nesta coleta. Na última coleta da safra, os perfis P18 e P1 dominavam o processo com 70% e 30% de frequências respectivamente (Figura 17). A frequência média de cada perfil em todo período de safra está representada na Figura 18. Pela primeira vez foram detectadas leveduras selvagens em níveis que levaram à substituição total do fermento por outro inóculo com a mesma levedura de processo.

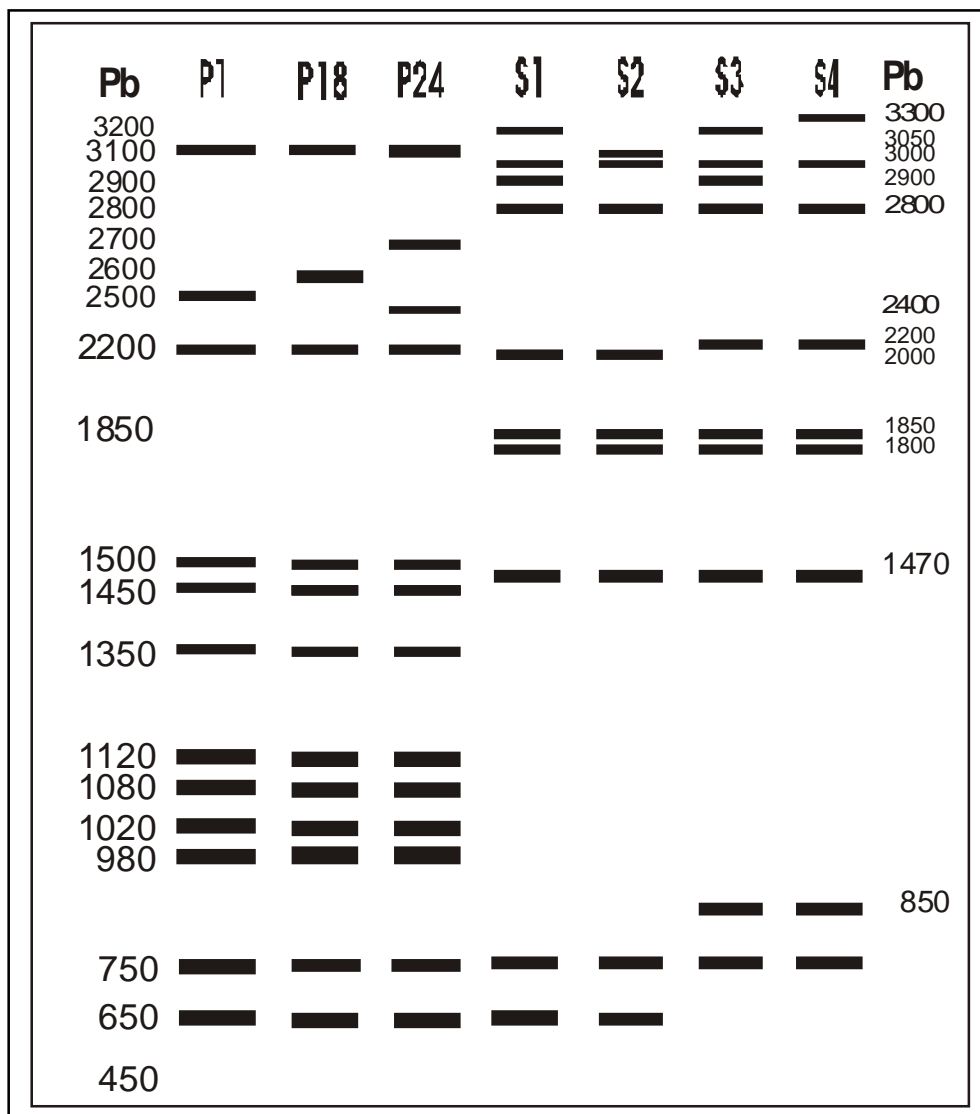


Figura 16. Eletroferograma dos perfis $(GTG)_5$ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência

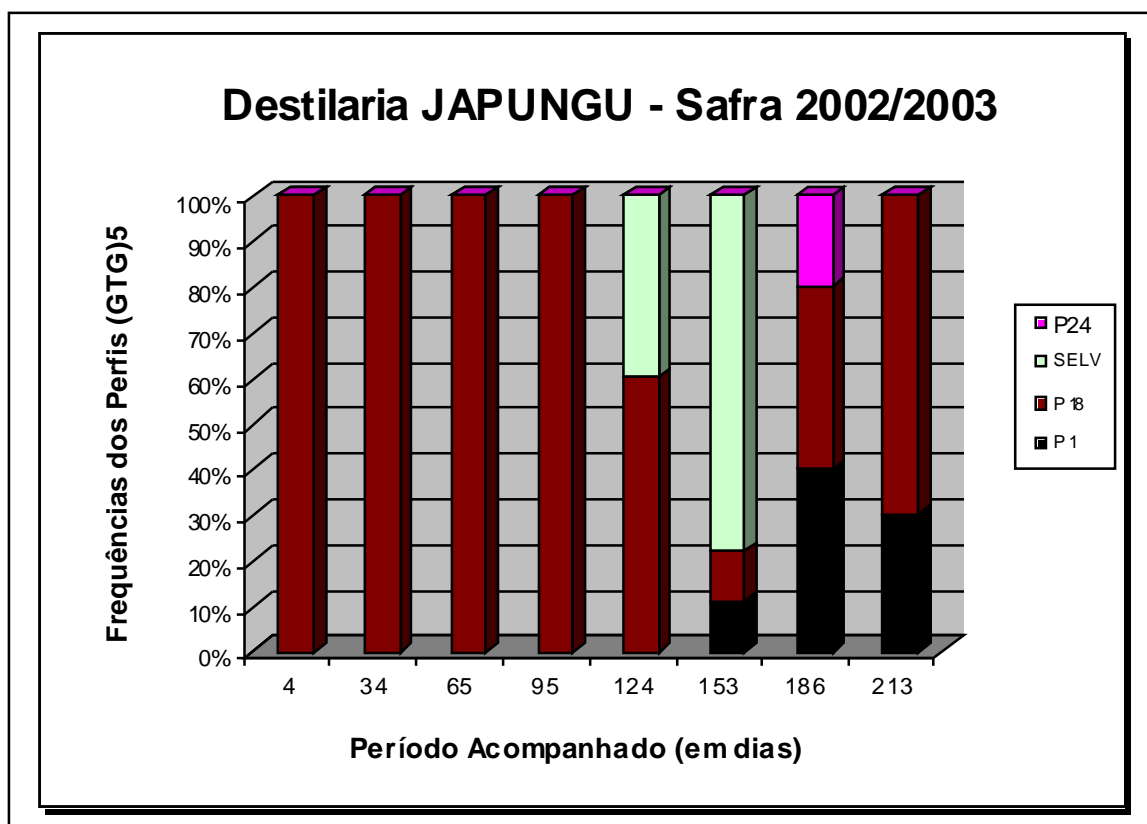


Figura 17. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Japungu em oito coletas no período de safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅, detectadas a partir de 10% de frequência

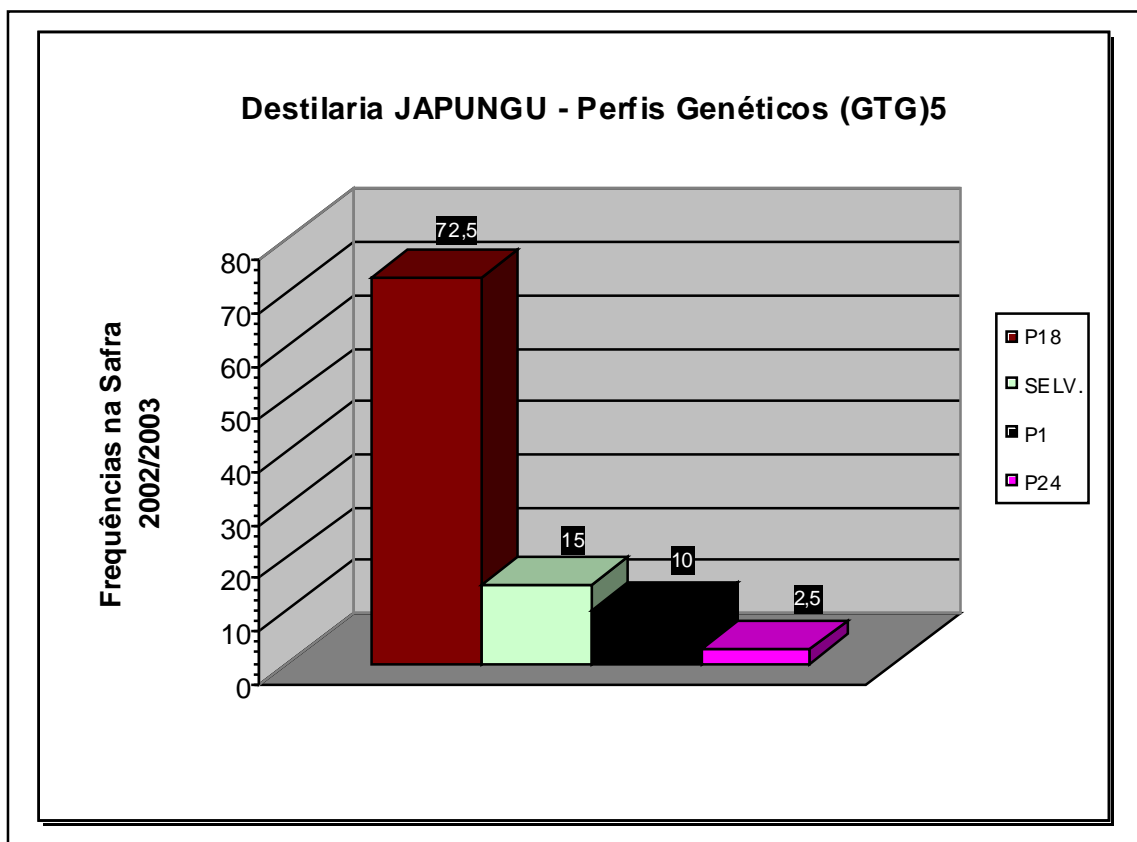


Figura 18. Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2002/2003 na destilaria Japungu, detectadas a partir de 10% de frequência.

4.9. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Miriri – Safra 2002/2003

A safra foi iniciada a partir de cultura pura com perfil P18 adquirida da Destilaria Japungu. No período de 152 dias da safra 2002/2003, 110 colônias foram isoladas do mosto fermentado e amplificadas com o (GTG)₅ e identificadas como perfis P1, P1A, P4, P6, P18 e leveduras selvagens com perfis do tipo S1, S3 e S5 (Figura 19). As frequências destes perfis estão ilustradas na Figura 21. Os perfis P18 e P1 estiveram presentes em todas as coletas. A levedura de partida P18 apresentou na 1ª coleta apenas 10% de frequência, mas dominou em cinco das 11 coletas do período (45,5% de dominância) até 104 dias de safra. O perfil P1 dominou as três últimas coletas, indicando ser uma levedura com características naturais de persistência e dominância, apesar da injeção de 600.000 litros mensais da levedura de processo P18 (Figura 7). A frequência média de cada perfil na safra está ilustrada na Figura 22. Os representantes dos perfis detectados foram submetidos à amplificação com os iniciadores da região ITS para confirmação dos perfis do tipo *S. cerevisiae* e do tipo selvagem (S) juntamente com a linhagem de referência *S. cerevisiae* IA-1238 (Figura 20). Os perfis P1, P1A, P4, P6, P18, do tipo *S. cerevisiae* apresentaram bandas alinhadas com a banda de 880 pb da linhagem de referência. Os perfis S1 e S3 apresentaram bandas de 520 pb e perfis polimórficos para algumas bandas com relação ao (GTG)₅ o que pode indicar discriminação de linhagens, enquanto o perfil S5 apresentou banda de 650 pb indicando se tratar de outra espécie (Figura 20).

4.10. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Giasa – Safra 2002/2003

A safra foi iniciada a partir da linhagem comercial PE-2 que possui perfil (GTG)₅ P1A, adquirida da Lallemand Co., na forma de fermento seco. No período de 121 dias da safra 2002/2003 foram realizadas nove coletas quinzenais, das quais 90 colônias isoladas do mosto fermentado foram amplificadas com o iniciador (GTG)₅ e identificadas como perfis P1, P1A, P4, P5, P6, P15 P15A, P18, e perfil selvagem do tipo S3 (Figura 23). A Figura 25 mostra frequências dos perfis em cada coleta. Observa-se que a levedura de partida PE-2 esteve presente em seis das nove coletas (66,6%), dominando com 100% de frequência até o 16º dia de safra, mas não ultrapassando 30% a partir da 3ª coleta. Os perfis P18 e P15A só

apareceram uma vez cada um, com 61 e 94 dias de safra, respectivamente. O perfil P6 também esteve presente com 66,6% de frequência de aparecimento dominando as três últimas coletas. Os perfis P5 e P1 estiveram sempre presentes a partir da 3ª coleta, entretanto, só dominaram em uma coleta ao longo do período de safra. O perfil P15 apareceu em quatro coletas e o perfil P4 em cinco coletas, ambos não ultrapassando 20% de frequência entre os perfis das coletas em que estiveram presentes. A Figura 26 ilustra a frequência de cada perfil em todo período de safra. Todos os perfis do tipo *S. cerevisiae* apresentaram bandas de 880pb na mesma posição da linhagem de referência *S. cerevisiae* IA-1238 após amplificação da região ITS do rDNA, e banda de 520pb para a levedura selvagem com perfil do tipo S3 (Figura 24).

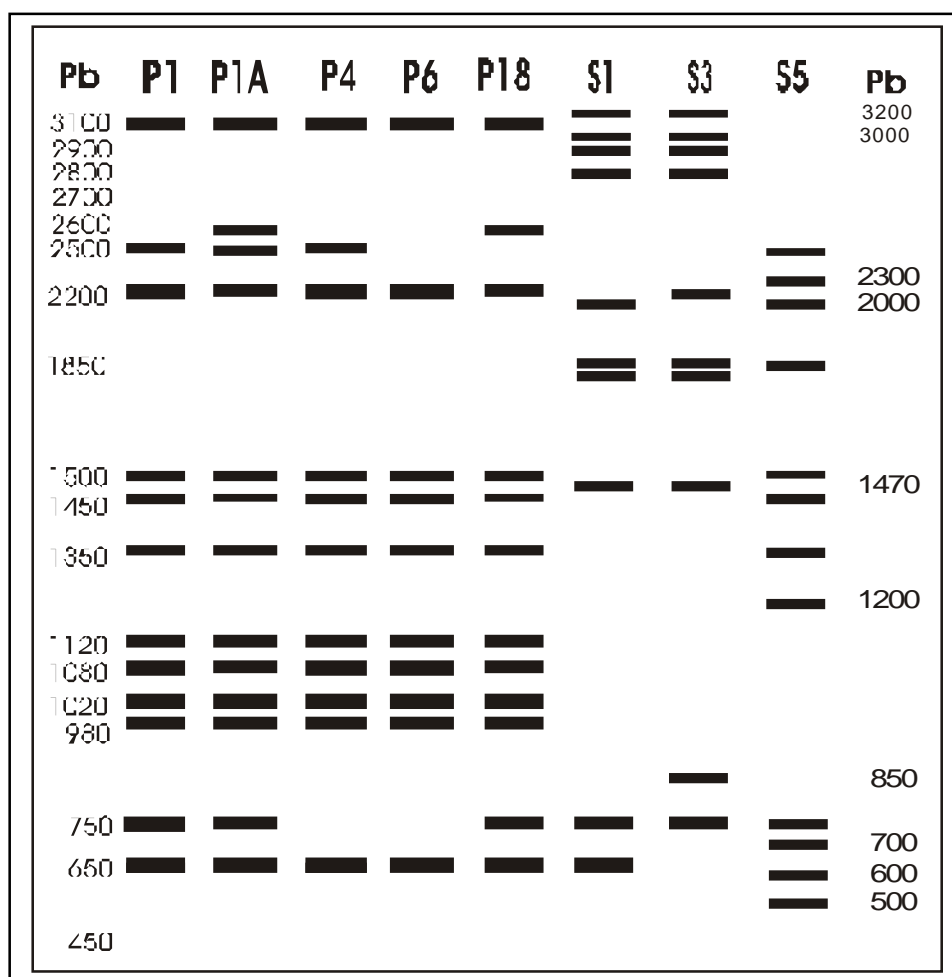


Figura 19. Eletroferograma dos perfis (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Miriri na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência



Figura 20. Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representantes dos perfis $(GTG)_5$, isoladas do mosto fermentado da destilaria Miriri na safra 2002/2003

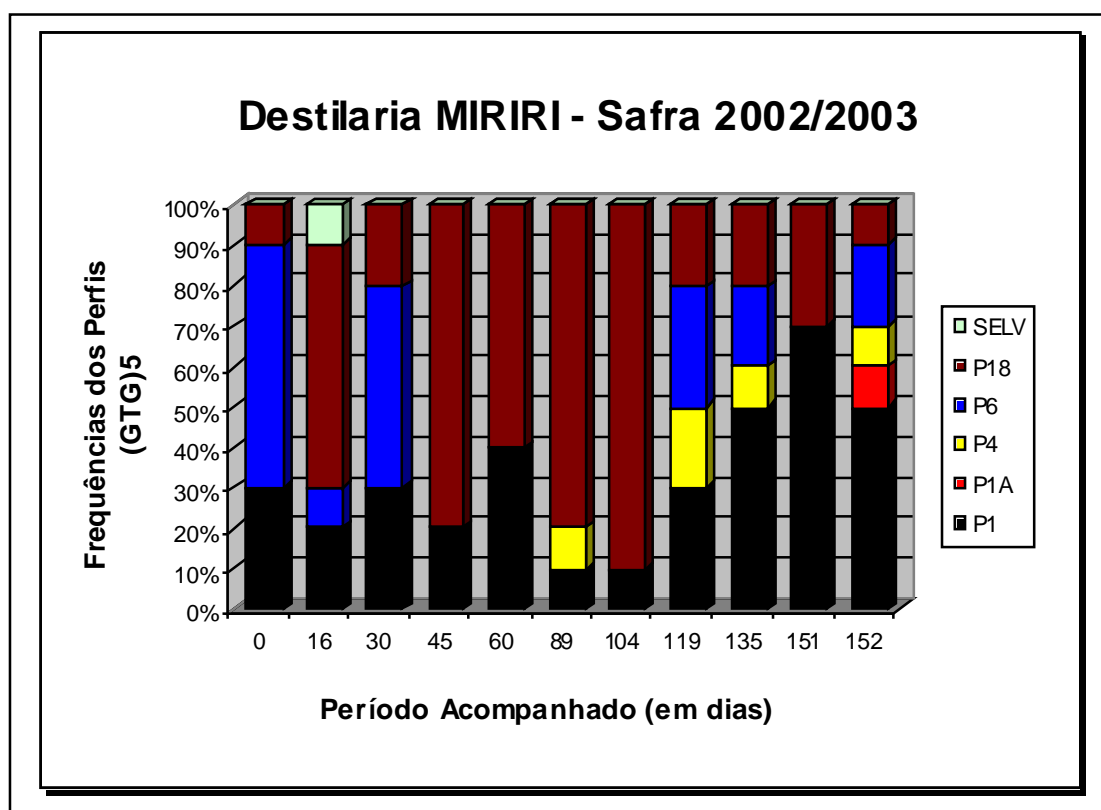


Figura 21. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Miriri, em 11 coletas no período de safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microsatélites (ISSR) com o iniciador $(GTG)_5$, detectadas a partir de 10% de frequência

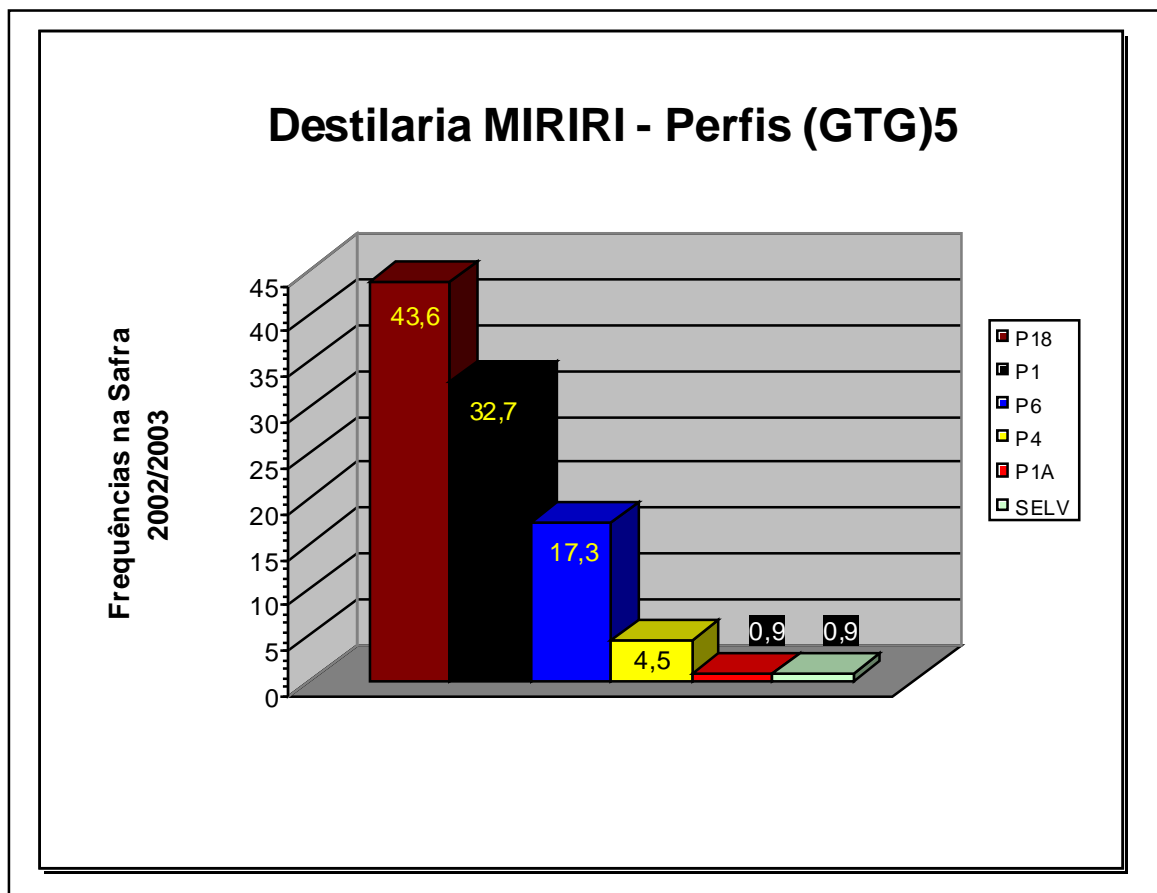


Figura 22. Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2002/2003 na destilaria Miriri, detectadas a partir de 10% de frequência

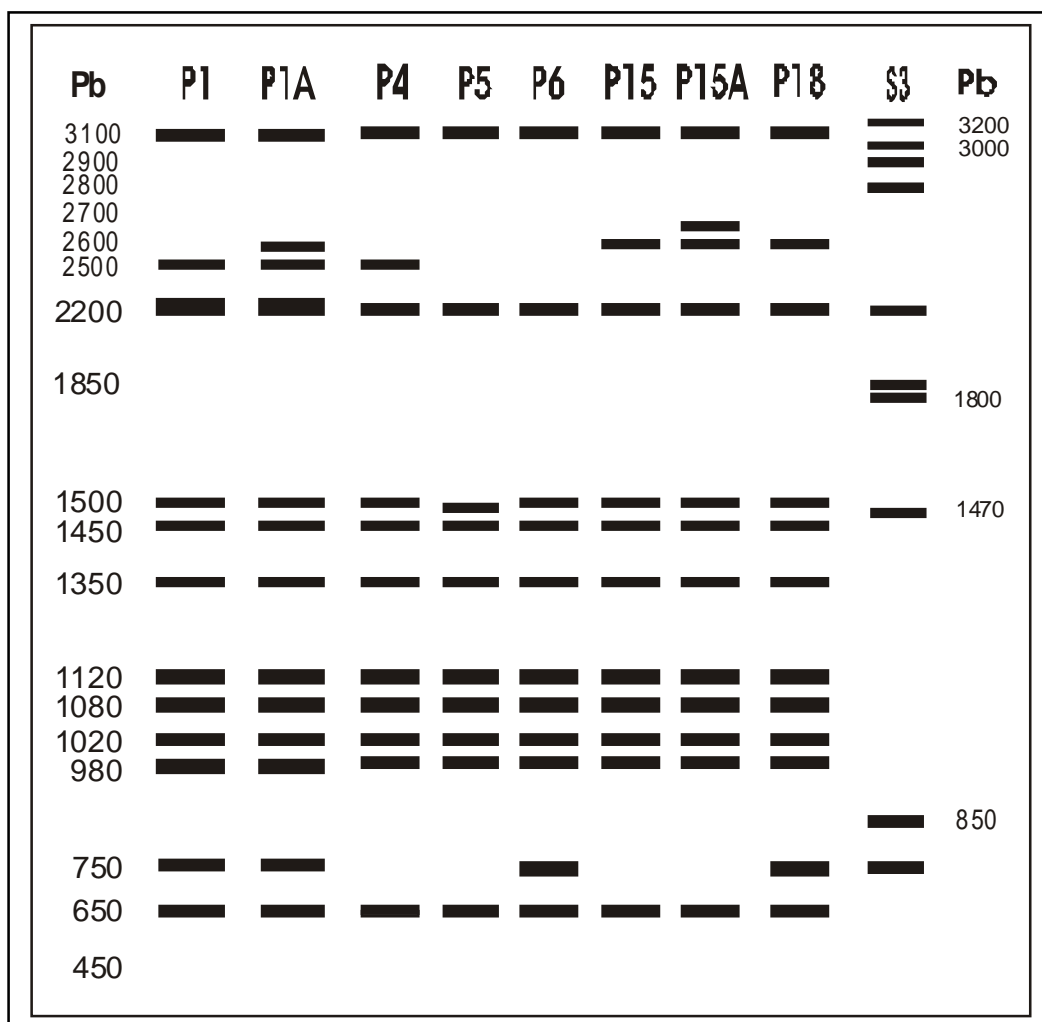


Figura 23. Eletroferograma dos perfis $(GTG)_5$ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Giasa na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência

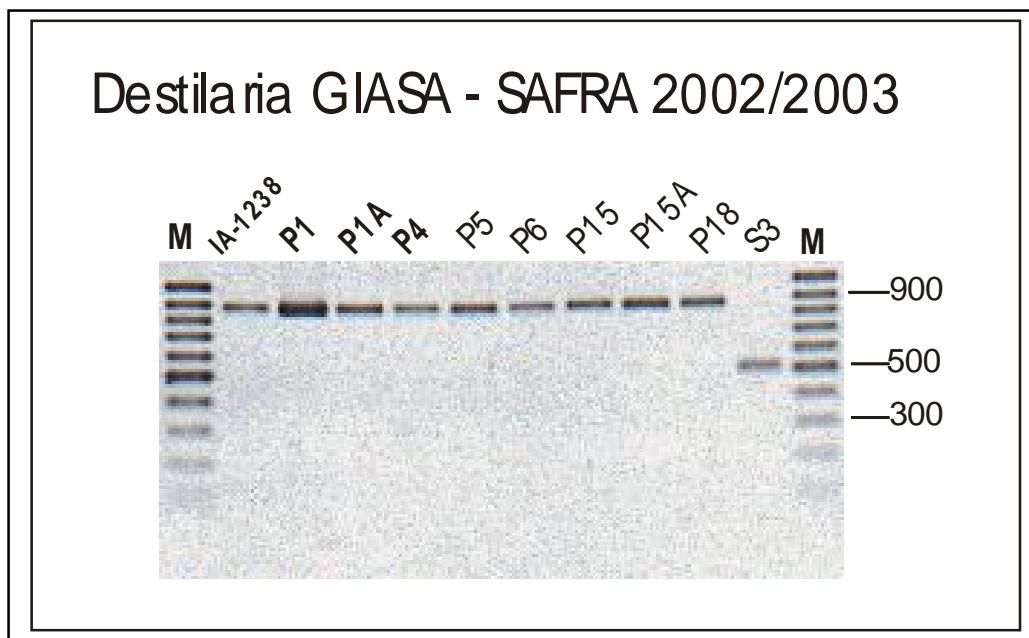


Figura 24. Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representantes dos perfis $(GTG)_5$, isoladas do mosto fermentado da destilaria Giasa na safra 2002/2003

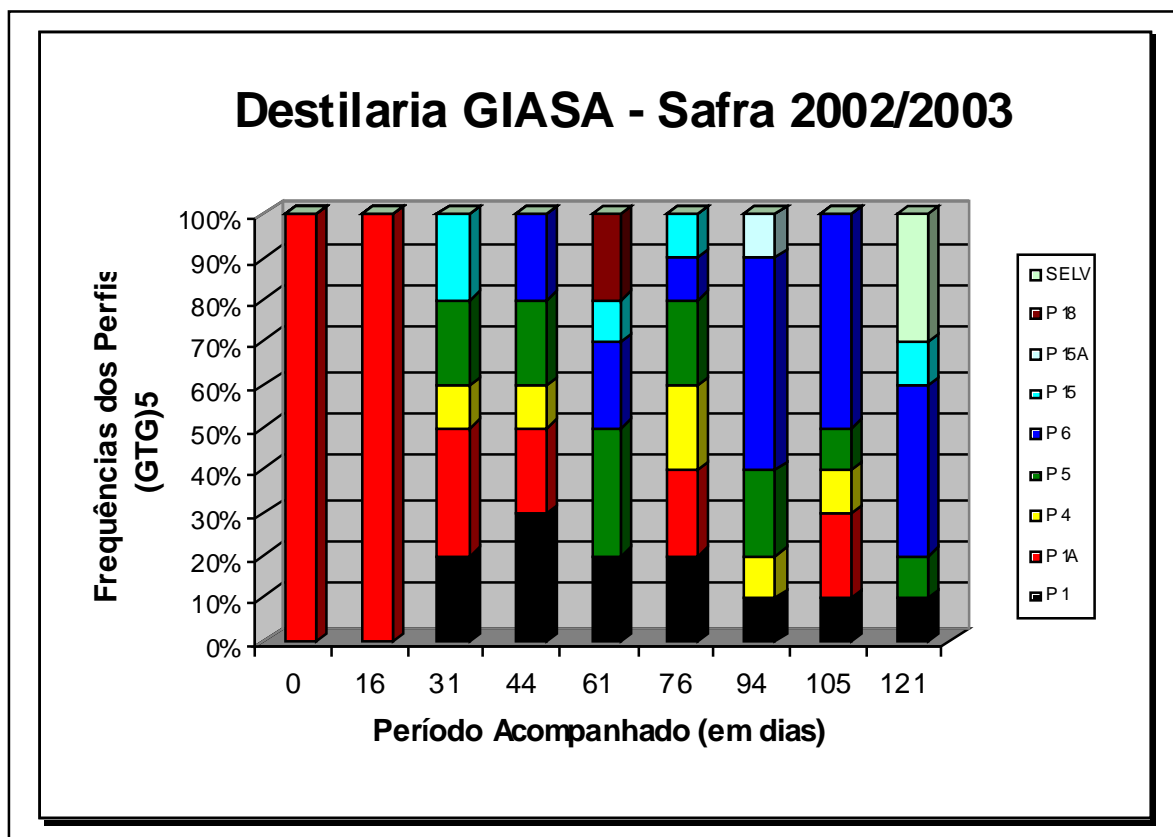


Figura 25. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria Giasa em nove coletas no período de safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅, detectadas a partir de 10% de frequência

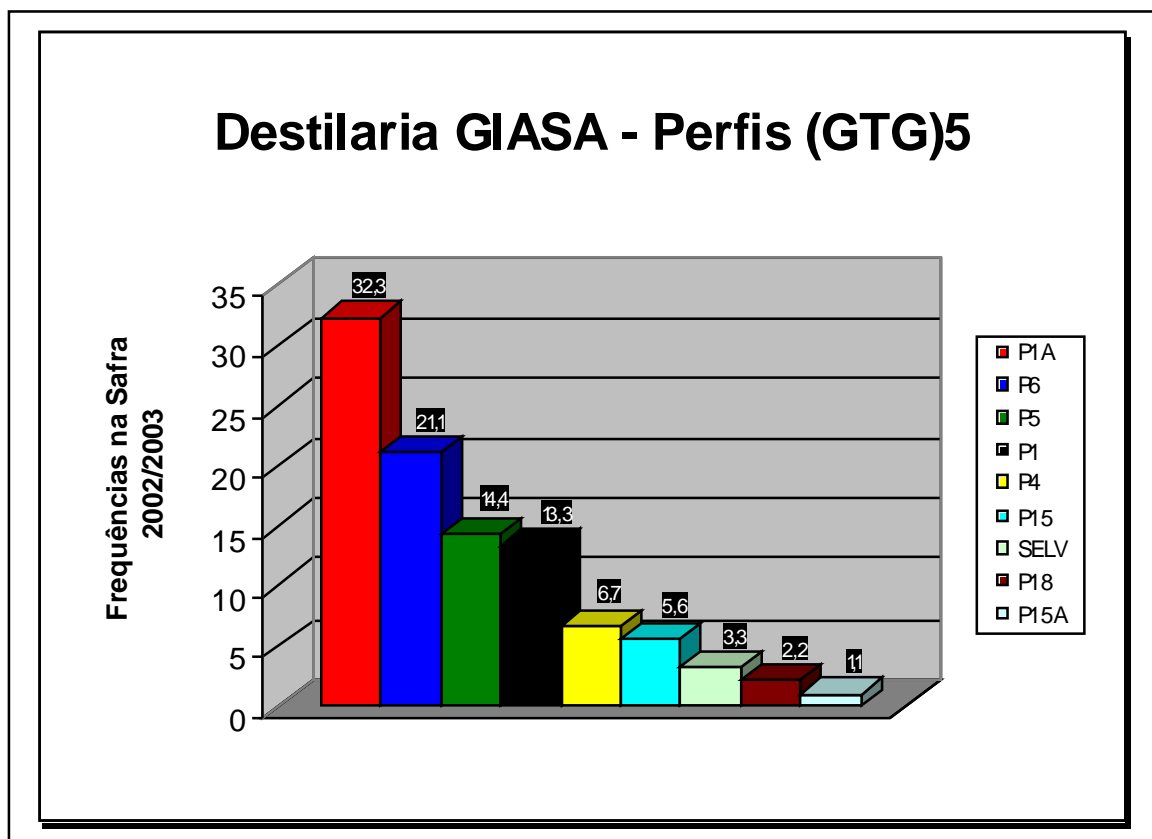


Figura 26. Frequência de cada perfil (GTG)₅, das leveduras isoladas do mosto fermentado, em todo período da safra 2002/2003 na destilaria Giasa, detectadas a partir de 10% de frequência

4.11. Tipagem e Freqüência dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria JB – Safra 2002/2003

A safra foi iniciada a partir da linhagem de panificação Fleischmann na forma de fermento seco adquirida diretamente do produtor. No período de 216 dias da safra 2002/2003 realizou-se 16 coletas de mosto fermentado, das quais 160 colônias foram isoladas, amplificadas com o iniciador (GTG)₅ e identificadas como perfis P1, P1A, P4, P5, P6, P15, P18, P18A, S1, S3, S4, S6, S7 e S8 (Figura 27). As freqüências dos perfis em cada coleta encontram-se na Figura 29. A partir do 13º dia de fermentação, a levedura de partida Fleischmann de perfil P6 foi gradativamente substituída por leveduras selvagens com perfis (GTG)₅ dos tipos S1, S3 e S7, até 60 dias do início da safra, o que levou à 1ª injeção de 30.000 litros de fermento PE-2 obtido de outra destilaria. Como pode ser observado na Figura 29, as leveduras selvagens que dominaram nas coletas dois, tres e quatro, reapareceram na 6ª coleta e dominaram até o 105º dia, quando foi realizado o primeiro descarte total do fermento e preparado outro inóculo com a levedura Fleischmann. Decorridos 25 dias da 1ª troca de fermento, as leveduras selvagens já dividiam a predominância com os perfis P6 e P18 com 30% de freqüência, tendo sido neste momento realizada a 2ª troca de fermento, através do inóculo de 90.000 litros de fermento Fleischmann de perfil tipo P6, que juntamente com o perfil P18 dominaram a partir da 11ª coleta (Figura 29). Dos nove tipos de perfis encontrados, quatro apareceram apenas uma vez em todo período, com freqüências variando de 10% à 20%. Os perfis do tipo selvagem estiveram presentes em nove das 16 coletas realizadas, com freqüência de aparecimento de 56,3%, e dominando em cinco das 16 coletas (31,3%). A Figura 30 ilustra a freqüência de cada perfil em todo período de safra.

Os perfis do tipo *S. cerevisiae* tiveram a banda de 880pb confirmada pela amplificação da região ITS do rDNA, e as leveduras selvagens apresentaram cinco padrões distintos para o (GTG)₅, mas apresentando o mesmo fragmento ITS de 520 pb para os perfis S1, S3, S4, S6 e S7, e de 650 pb para o perfil S8 (Figura 28).

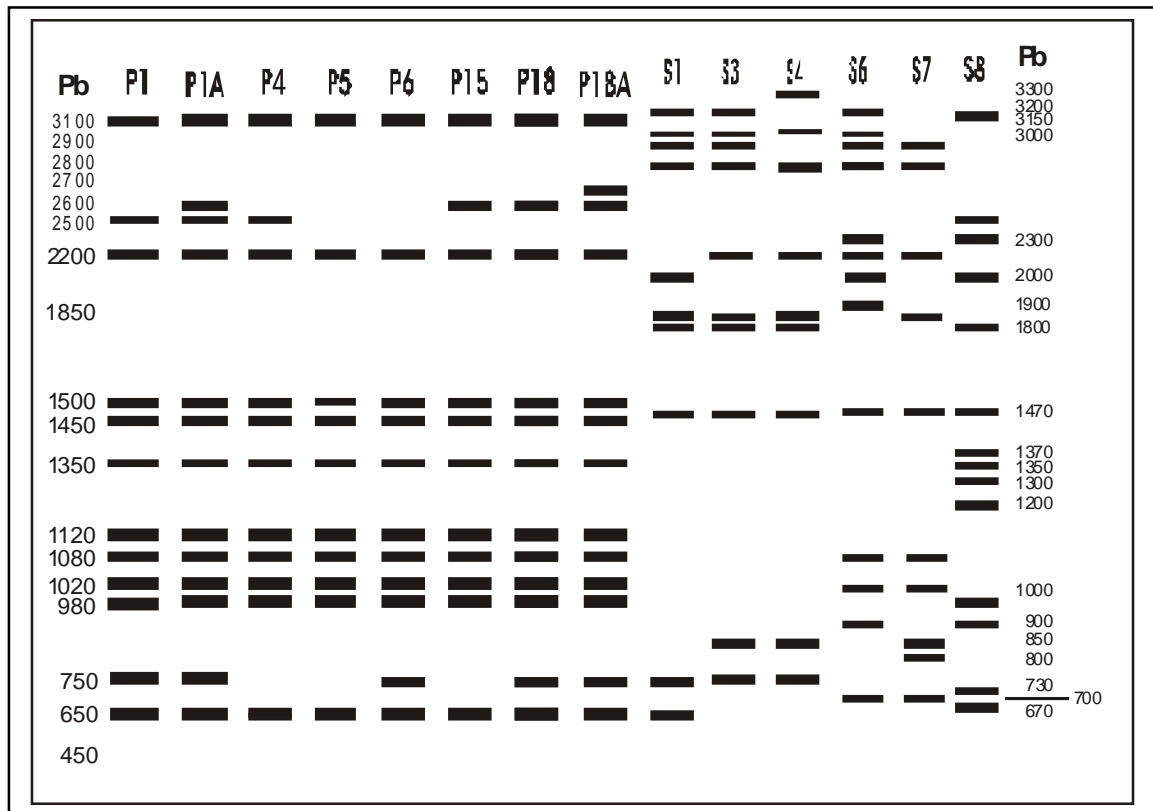


Figura 27. Eletroferograma dos perfis $(GTG)_5$ das leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria JB na safra 2002/2003, detectadas na população a partir de 10% de frequência

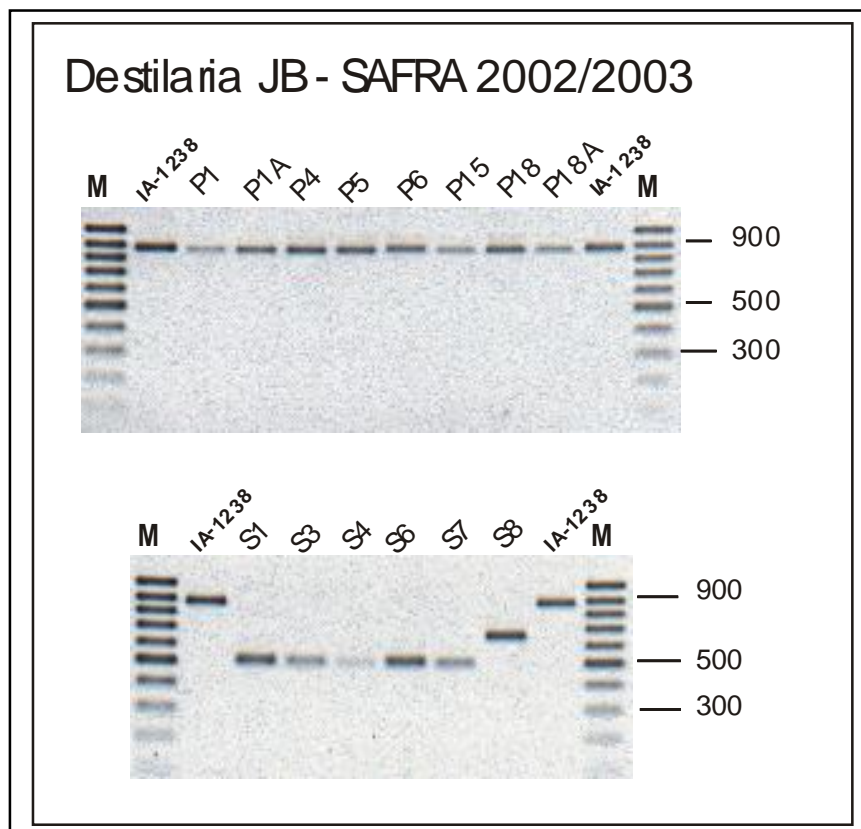


Figura 28. Amplificação da região ITS do rDNA das leveduras representantes dos perfis $(GTG)_5$ isoladas do mosto fermentado da destilaria JB na safra 2002/2003

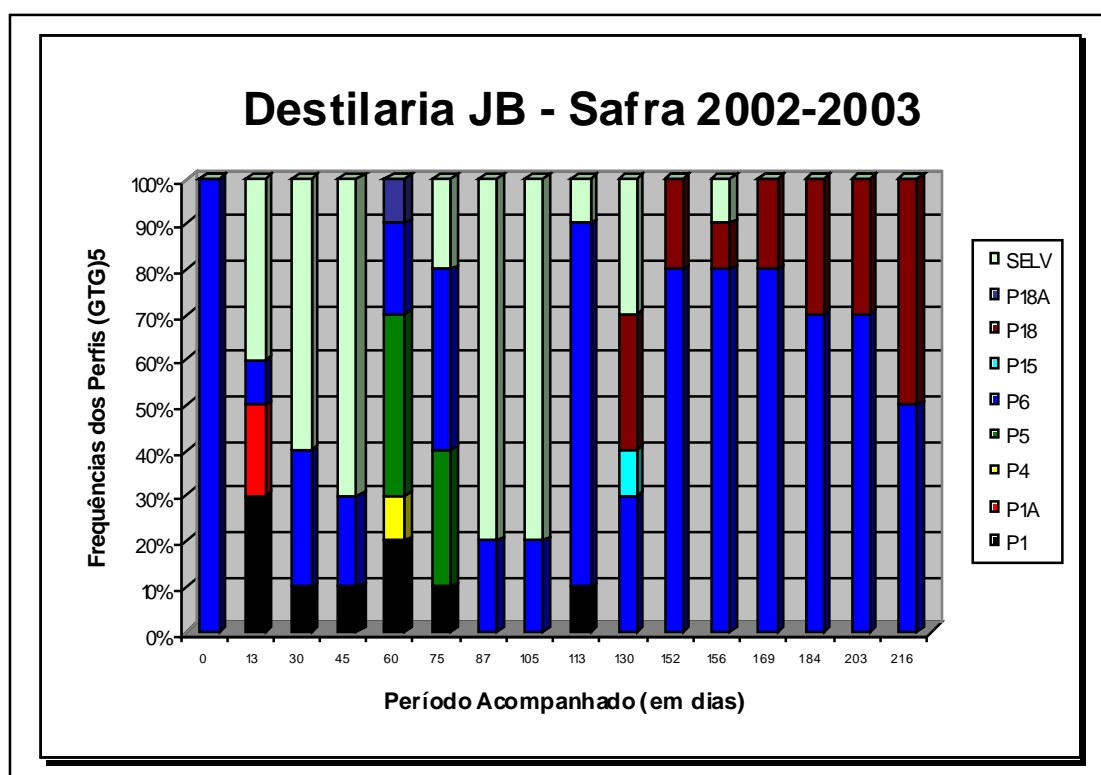


Figura 29. Distribuição da população de leveduras isoladas do mosto fermentado da destilaria JB em 16 coletas no período da safra 2002/2003, de acordo com os perfis obtidos pela amplificação de regiões de microssatélites (ISSR) com o iniciador (GTG)₅, detectadas a partir de 10% de frequência

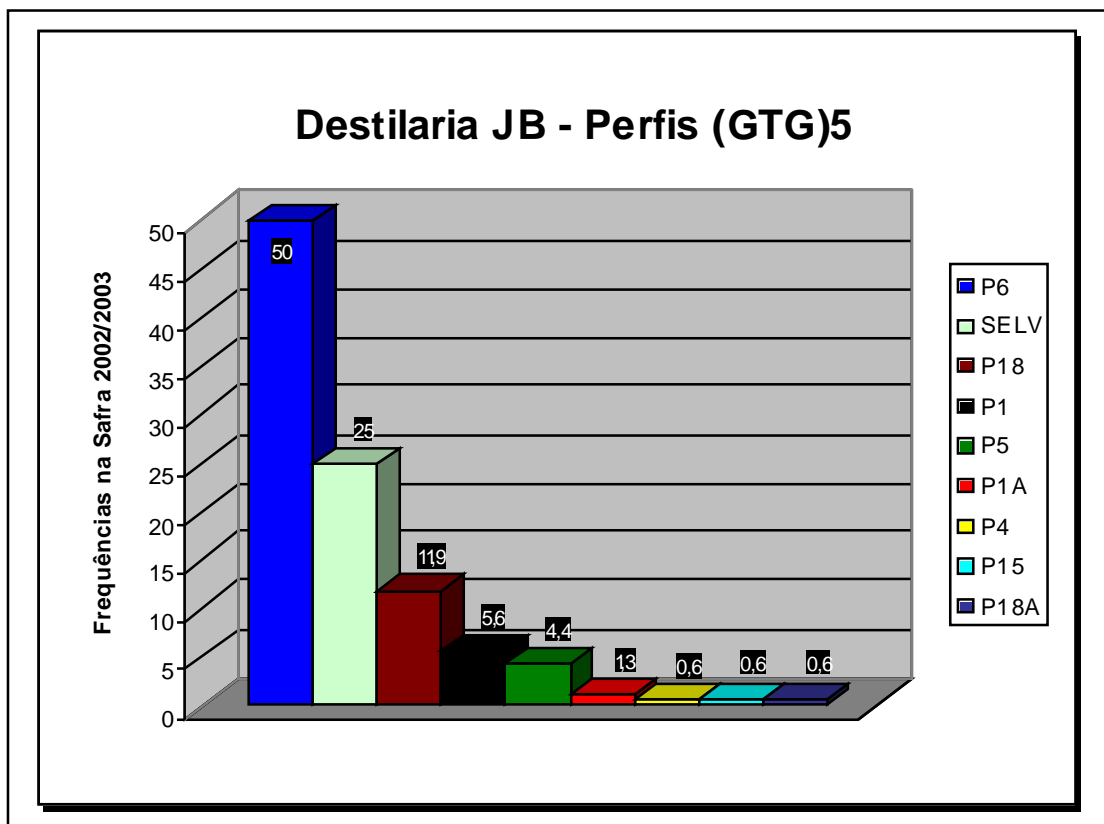


Figura 30. Frequência de cada perfil (GTG)₅ das leveduras isoladas do mosto fermentado em todo período da safra 2002/2003 na destilaria JB, detectadas a partir de 10% de frequência

4.12. Comparação Entre as Destilarias com Relação a Alguns Dados do Processo

A Tabela 7 ilustra a comparação de alguns dados do processo obtidos dos boletins de safra entre as destilarias estudadas. Foram acompanhadas tres safras seguidas na destilaria Japungu e uma safra nas destilarias Miriri, Giasa e JB correspondente ao período de safra 2002/2003. Observando-se o teor alcoólico das quatro destilarias na safra 2002/2003, verifica-se que Giasa apresentou valor de 7% e JB 19,5% menores em relação às destilarias Miriri e Japungu, que apresentaram o mesmo teor alcoólico de 6,9%. O rendimento em litros por tonelada de cana (L/TC) na última safra foi muito próximo entre as destilarias Japungu e Miriri, com diferença de 1,4 L/TC a mais para Japungu. Por outro lado, as destilarias Giasa e JB apresentaram diferenças de rendimento bastante expressiva de menos 7,9% e 13,1 % respectivamente, quando comparado àquele da destilaria Japungu na mesma safra. Para uma produção diária de 500 mil litros, isto significa 39,5 mil litros a menos para Giasa e 65,5 mil litros para JB. Os valores de injeção de fermento da Tabela 7 mostram que as destilarias Giasa e JB utilizaram os menores volumes da levedura inóculo no procedimento de injetar fermento no processo. Por outro lado, foram aquelas que mais empregaram antibióticos para controle de infecção bacteriana no período. Com relação a origem da cana moída, apenas a destilaria Miriri apresentou 100% de cana de fomedor, enquanto a participação de cana de fornecedor nas outras destilarias variou de 36,9% para a destilaria JB a 45,5% para a destilaria Japungu, na safra 2002/2003.

Tabela 7. Valores médios de alguns parâmetros acompanhados nos processos das destilarias

DESTIL	SAFRA	ART (%)	ACM (g/L)	T.ALC. (%)	AMF (g/L)	V.CEL (%)	REND. (L/TC)	I.FERM (L)	T.FERM (X)	ANTIB. (kg)	A.SULF. (kg)	C.FORN (%)	P.PLUV. (mm)
JAPUNGU	2000/01	10,78	0,73	6,61	2,72	70,9	82,3	388.888	0	15,4	33.654	58,2	132,1
JAPUNGU	2001/02	11,26	0,72	6,89	2,61	79,6	87,5	416.666	0	27,2	25.130	54,7	42,8
JAPUNGU	2002/03	11,16	0,72	6,91	2,65	79,5	83,6	187.500	1	20,4	27.600	45,5	102,9
MIRIRI	2002/03	10,11	0,84	6,90	2,52	84,6	82,2	600.000	1	18,70	3.0	100,00	69,30
GIASA	2002/03	14,4	0,69	6,42	2,14	90,9	77	26.600	1	36,5	22.610	49,6	34,3
JB	2002/03	10,69	1,56	5,56	2,55	78,6	70,5	16.125	2	46,1	39.800	36,9	80,8

estudadas no período de 2000 a 2003

DESTIL. = destilaria

ART (%) = açúcares redutores totais

ACM (g/L) = acidez do caldo misto em grama/litro

T. ALC (%) = teor alcoólico

AMF (g/L) = acidez do mosto fermentado em grama/litro

V. CEL (%) = viabilidade celular

REND (L/TC) = rendimento em litro/tonelada de cana

I. FERM (L) = injeção de fermento em litro

T. FERM (L). = troca de fermento

ANTIB (kg) = antibiótico

A. SULF = ácido sulfúrico

C.FORN (%) = cana de fornecedor

P. PLUV (mm) = precipitação pluviométrica em mm

Estes dados foram obtidos dos boletins de processo das destilarias acompanhadas.

5. DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização Morfológica das Colônias

A determinação das características macroscópicas das colônias com relação ao diâmetro, cor, superfície, bordo e textura é uma prática necessária na identificação clássica de microrganismos, e teve um papel importante na definição dos morfotipos como um recurso auxiliar na seleção preliminar das leveduras presentes em amostras de mosto fermentado coletadas nas tres safras consecutivas na destilaria Japungu e na safra 2002/2003 nas destilarias Miriri, Giasa e JB.

O emprego do meio Wallerstein Laboratory Nutrient Medium (Green & Gray,1950) foi adotado por apresentar em sua composição o corante verde de bromocresol, que pode ser ou não absorvido pelas células, resultando em colônias com várias tonalidades de verde em função da afinidade da célula pelo corante. A coloração, juntamente com as outras características macroscópicas, permitiu selecionar 23 morfotipos em amostras de mosto fermentado e mosto de alimentação provenientes das coletas da 1ª safra da destilaria Japungu (Figura 2). A definição destes morfotipos foi mais importante na primeira fase do trabalho, durante o isolamento das leveduras na safra 2000/2001, quando foi necessário verificar a frequência de cada morfotipo na população antes de se fazer uma amostragem para isolamento, purificação e tipagem genética das leveduras presentes nas placas. Nas safras seguintes este procedimento tomou-se secundário, uma vez que todas as colônias das placas foram coletadas para tipagem genética, indiferentemente das características macroscópicas. A Figura 2A ilustra 12 morfotipos isolados de mosto fermentado e identificados como perfis do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto a Figura 2B ilustra 11 morfotipos isolados do mosto fermentado, mas que não apresentaram perfis típicos da espécie *S.cerevisiae*. Green & Gray (1950) demonstraram que a adição de 2,0µg/ml de actidione (ciclohexamida) ao meio WLN foi suficiente para inibir a levedura de processo *Saccharomyces cerevisiae*, permitindo o crescimento de outros microrganismos não afetados por esta concentração. Desde então, o WLN tem sido bastante utilizado como meio de rotina no controle de qualidade microbiológica em cervejarias e destilarias de álcool combustível.

Silva Filho (1993) utilizou o meio WLN adicionado dos antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico na concentração final de 50 µg/ml para quantificar leveduras totais, e WLN com actidione na concentração final de 5µg/ml para quantificar leveduras selvagens resistentes a esta concentração em amostras de mosto fermentado, mosto de alimentação e fermento

tratado provenientes de uma unidade produtora de álcool combustível no Estado de Pernambuco. Os resultados mostraram que o meio foi adequado para a quantificação de leveduras, especialmente com relação ao monitoramento de leveduras selvagens no processo. Oliveira e Silva (1994) também utilizaram o meio WLN com antibióticos e actidione nas mesmas condições descritas por Silva Filho (1993) para contagem de leveduras totais e para detectar leveduras selvagens resistentes a 5µg/mL de actidione. Os autores analisaram amostras de mosto de alimentação, mosto fermentado, fermento tratado, vinho delevurado e espuma de vinho, em várias unidades industriais produtoras de álcool combustível no Estado de São Paulo, com o objetivo de caracterizar, quantificar e identificar leveduras contaminantes de processo industriais para produção de álcool combustível. Os resultados mostraram que o emprego do meio WLN não só permitiu a quantificação de leveduras totais, como também a identificação de tres biotipos característicos: o biotipo 1 representado por colônias lisas, cônicas e com bordo circular, típico da levedura de processo; o biotipo 2 representado por colônias de superfície áspera (rugosa), bordos irregulares e crescimento rápido, formadas por cadeias multicelulares ramificadas; e biotipo 3 representado por colônias normalmente menores que as outras, e só detectáveis a partir de 72 horas de incubação. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados neste trabalho, como pode ser observado na Figura 2A, similares aos biotipos 1 e 2 e Figura 2B, similares ao biotipo 3. As leveduras selvagens detectadas nas destilarias estudadas realmente só apareceram no meio WLN após 72 horas de incubação, como verificado por Oliveira e Silva (1994). O meio WLN adicionado de antibióticos e actidione tem sido empregado com freqüência em muitas destilarias produtoras de álcool combustível no nordeste para monitorar leveduras selvagens resistentes a este antifúngico.

5.2. Amplificação do DNA de Leveduras de Coleção

O DNA de leveduras de 11 espécies pertencentes a nove gêneros foram amplificados com o iniciador (GTG)₅ e apresentaram perfis distintos para cada uma das espécies indicando o poder de discriminação interespecífica do iniciador (Figura 3). O mesmo procedimento realizado para oito espécies do gênero *Saccharomyces* demonstrou que o (GTG)₅ também tem capacidade para distinguir espécies dentro de um conjunto geneticamente mais relacionado, como observado na Figura 4. Baleiras Couto *et al.*(1996b) realizaram acompanhamento de leveduras presentes na cadeia produtiva da indústria de maionese e

saladas durante 14 meses, e isolaram 127 leveduras preliminarmente identificadas pelo “kit” API ID 32 como espécies pertencentes aos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Cryptococcus*. Os iniciadores testados (GAC)₅ e (GTG)₅ geraram 21 e 28 perfis distintos respectivamente, para as espécies identificadas pelo “kit” API. O (GTG)₅ foi ainda capaz de discriminar seis isolados que não puderam ser identificados pelo sistema API. Destes, tres foram linhagens de *Z. bailii*, enquanto os outros tres isolados apresentaram perfis totalmente distintos do resto das espécies encontradas, sugerindo a presença de tres outras espécies que não estavam presentes no banco de dados do sistema API. Os autores concluíram que o (GTG)₅ apresentou alto nível de discriminação interespecífico e intraespecífico, confirmando os resultados de Baleiras Couto *et al.*(1996a) obtidos com 15 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de vinho e cerveja. Neste último trabalho, os autores utilizaram tres iniciadores de RAPD (24, 28 e OPA 11), restrição do fragmento ITS com as enzimas *TaqI* e *MseI* e os microsatélites (GAC)₅ e (GTG)₅, confirmando mais uma vez a superioridade deste último marcador na discriminação intraespecífica.

Linhagens de *S. cerevisiae* industriais e de coleção juntamente com outras espécies de *Saccharomyces* e a espécie *Candida diversa*, foram amplificadas pelo (GTG)₅ para confirmação da sua capacidade de discriminação intraespecífica (Figura 5A e 5B). Das 15 linhagens testadas, 11 (73,3%) foram discriminadas pela apresentação de padrões distintos, e as espécies *Saccharomyces diastaticus*, *S. oleaginosus* e *S. oleaceus* apresentaram padrões típicos de *S. cerevisiae*, indicando tratar-se da mesma espécie, como observado por Barnett *et al.* (1990). A linhagem IA-1194 não é uma levedura *S. cerevisiae*, uma vez que apresentou perfil com padrão de bandas totalmente distinto daquele encontrado para esta espécie.

Baleiras Couto *et al.* (1996a) conseguiram discriminar 13 de 15 linhagens de *S. cerevisiae* provenientes de vinho e cerveja, combinando os padrões obtidos com iniciadores de RAPD e (GTG)₅, o que equivale a 86,6% do total de linhagens estudadas. Por outro lado, com o (GTG)₅ os autores conseguiram discriminar apenas seis isolados dentre os 15 analisados, o que corresponde a 40%. Entretanto, os perfis obtidos por Baleiras Couto *et al.*(1996a, 1996b) não puderam ser repetidos neste trabalho, quando realizados nas mesmas condições de análise. A dificuldade de reprodução dos perfis também aconteceu com relação aos resultados de Lieckfeldt *et al.* (1993), quando utilizou o (GTG)₅ para analisar polimorfismo em 23 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da indústria de vinho, cerveja, pão e álcool. Estas observações fizeram com que, no presente trabalho, a reação de amplificação fosse otimizada principalmente pela adição de soroalbumina bovina (BSA) e pela

padronização da concentração de DNA em 50ng/μL para reações de 25μL, resultando em perfis com padrões de bandas mais ricos e definidos.

A amplificação de seqüências com iniciadores simples, tanto para microssatélites como para aquelas distribuídas aleatoriamente no genoma (RAPD), necessitam de reações muito bem otimizadas, principalmente com relação à combinação das concentrações iniciador/DNA molde, magnésio e temperatura de anelamento. Estes fatores apresentam considerável influência na qualidade do padrão de bandas. A não padronização desses parâmetros pode resultar em amplificação de bandas inespecíficas, em função de anelamentos imprecisos durante os primeiros ciclos da amplificação. Essas ligações inespecíficas entre iniciador e o DNA molde tendem a desaparecer até certo ponto com o aumento da temperatura de anelamento e pela adição de formamida ou espermidina para aumentar a especificidade da amplificação (WEISING *et al.*, 1995).

5.3. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2000/2001

Em razão da vantagem sobre outros iniciadores de microssatélites e de RAPD, pela sua maior especificidade e poder de discriminação intraespecífica relatada na literatura e confirmada em testes preliminares, o (GTG)₅ foi o iniciador escolhido para amplificar as regiões de microssatélites do DNA das leveduras isoladas do mosto fermentado durante o estudo de populações na destilaria Japungu, nos períodos de safra de 2000/2001, 2001/2002 e 2002/2003, e nas destilarias Miriri, Giasa e JB no período de safra 2002/2003. As três primeiras destilarias estão localizadas no Estado da Paraíba e a última no Estado de Pernambuco com produções em torno de 500 mil litros por dia. O procedimento inicialmente adotado com relação ao plaqueamento foi o de utilizar diluições que resultassem em placas com aproximadamente 100 colônias. A caracterização prévia da morfologia das colônias foi necessária para a definição dos morfotipos, e para determinação de sua frequência na população. Inicialmente houve a necessidade de saber se morfotipos idênticos apresentavam o mesmo perfil genético, ou se poderiam apresentar perfis diferentes, ou no caso inverso, se morfotipos diferentes poderiam apresentar o mesmo perfil genético. Após as análises das tipagens, verificou-se que a definição de morfotipos na maioria dos casos, levou facilmente a uma discriminação interespecífica favorecida pelo corante presente no meio WLN, confirmada pelos diferentes perfis (GTG)₅ obtidos para cada morfotipo. Entretanto,

características sutis observadas entre colônias, nem sempre ajudaram na discriminação entre linhagens, como pôde ser constatado pela diferença entre as frequências dos morfotipos (não apresentadas) e dos seus respectivos perfis (GTG)₅. Outra característica desse procedimento foi o elevado número de isolados, em razão da amostragem de vários representantes de determinado morfotipo, quando este apareceu com frequência alta em determinado plaqueamento, além do fato de que as colônias de cada coleta foram amostradas de forma independente da anterior, mesmo que os morfotipos já tivessem sido determinados. Desta forma, ao final da safra 2000/2001, 213 colônias foram isoladas, purificadas, tipadas e agrupadas em 16 perfis distintos pelo (GTG)₅, a partir das quais as bandas de 650, 980, 1020, 1080, 1120, 1350, 1450, 1500, 2200 e 3100 pb foram identificadas como o conjunto de bandas monomórficas que caracteriza o perfil típico da espécie *S. cerevisiae* (Figura 6).

A similaridade entre estes perfis, através do método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jacard foi de 78% para 13 dos 16 perfis encontrados (Figura 7). Torriani *et al.* (1999) estudaram a relação genética de 20 isolados de vinho com espécies de *Saccharomyces* do *sensu stricto*, e encontraram 13 isolados identificados como *S. cerevisiae* reunidos em dois grupos com 72% e 77% de similaridade pelo método de agrupamento UPGMA através da tipagem com os iniciadores (GTG)₅, M13 e 1283.

A Figura 8 ilustra os perfis obtidos com o iniciador (GACA)₄ para os representantes dos 16 perfis (GTG)₅. Como pode ser observado, a amplificação gerou bom número de bandas, mas com nível de polimorfismo inferior, discriminando apenas sete dos 16 perfis (43,7%) identificados pelo (GTG)₅. O agrupamento desses perfis pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jacard indicou elevada similaridade entre eles, revelando menor poder de discriminação ao nível intraespecífico (Figura 9).

Meyer e Mitchell (1995) analisaram o polimorfismo de DNA em 27 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* através de ISSR incluindo microssatélites di, tri e tetranucleotídeos, e também constataram a superioridade do (GTG)₅ com relação ao (GACA)₄ na discriminação intraespecífica, já observada nos resultados de Lieckfeldt *et al.* (1993). Estes autores demonstraram ainda, por meio de subcultivos semanais e re-amplificações mensais por um período superior a dois anos, que os padrões obtidos são estáveis *in vitro* desde que se mantenham constantes todas as condições inicialmente padronizadas, inclusive a marca da DNA polimerase e o termociclador.

Os representantes dos 16 perfis (GTG)₅ foram ainda submetidos à amplificação com os iniciadores ITS4 e ITS5 para confirmação do tamanho da região ITS do rDNA. Com exceção do isolado 181, representante do perfil P21, todos apresentaram bandas de 880pb típica da

espécie *S. cerevisiae* (Figura 10A). A amplificação do DNA de leveduras *S. cerevisiae* de coleções com o (GTG)₅ gerou um padrão mínimo de bandas caracterizando um perfil típico para esta espécie. Este perfil típico juntamente com a informação da banda de 880pb obtida da amplificação da região ITS permitiu identificar 15 isolados dos 16 representantes dos perfis como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*, com exceção do isolado 181 de perfil P21, indicando tratar-se de outra espécie. Valente *et al.* (1996) amplificaram a região ITS de várias espécies de *Saccharomyces* inclusive as do *sensu stricto* e encontraram para *S. cerevisiae* um fragmento com 860pb, enquanto Guillamón *et al.* (1998) e Granchi *et al.* (1999) trabalhando com leveduras isoladas de vinho registraram fragmentos de 880pb para a região ITS. A diferença com relação ao tamanho do fragmento decorre da estimativa aproximada baseada no marcador de peso molecular utilizado. Em todos os casos, os valores foram sempre comparados com os fragmentos amplificados de uma levedura *S. cerevisiae* de referência.

As frequências dos perfis (GTG)₅ representando as populações de leveduras isoladas nesta safra estão ilustradas na Figura 11. Como já discutido anteriormente, o grande número de perfis detectados foi em parte resultado do procedimento de amostragem adotado, evidenciando uma grande diversidade de perfis do tipo *S. cerevisiae*, mas com baixas frequências de aparecimento nas coletas e no período. Apenas os perfis P1 e P4 estiveram presentes em 14 das 15 coletas realizadas, com 93,3% de aparecimento, seguidos dos perfis P1A e P6, presentes em 9 das 15 coletas, com 60% de aparecimento. Com relação à dominância desses perfis por coleta, o perfil P1 foi o mais frequente, dominando em nove das 15 coletas.

A levedura *S. cerevisiae* IA-1238 utilizada como fermento de partida, só foi detectada na 1ª e 14ª coletas com 100% e 6,3% de frequência respectivamente, sendo substituída pelas leveduras nativas em 13 das 15 coletas do período. Apesar das injeções de 388 mil litros mensais (Tabela 7), o fermento IA-1238 não apresentou nenhuma capacidade de se instalar no processo, ao contrário da levedura nativa de perfil P1, que registrou as melhores frequências de aparecimento e dominância (Figura 11), características competitivas altamente desejáveis na fermentação. Juntamente com o bom desempenho fermentativo e boa velocidade de fermentação (Tabela 6), esta linhagem pode tomar-se uma excelente candidata para ser utilizada como inóculo.

Com exceção dos representantes dos perfis P21 e P22, todas as leveduras apresentaram bom desempenho fermentativo em laboratório, com tempos de fermentação de duas a quatro horas. Entretanto, nenhuma apresentou capacidade de permanecer no processo, como

observado para a representante do perfil P1. Esta capacidade competitiva deve estar ligada a características como resistência à temperatura e teor alcoólico mais elevados, maior velocidade de consumo de substrato, fator “killer”, entre outros, que devem ser investigados para selecionar leveduras candidatas a linhagens industriais, inclusive para recepção de genes heterólogos.

Stroppa *et al.* (2000) realizaram trabalhos de acompanhamento de populações de leveduras em duas destilarias do Estado de São Paulo: uma delas utilizou como inóculo uma levedura isolada do próprio processo, enquanto a outra utilizou fermento de panificação prensado. Os autores adotaram a capacidade fermentativa como sistema de classificação designado por Andrietta *et al.* (1999), que separa as leveduras de acordo com a associação de parâmetros de produção específica e características cinéticas após a definição de morfotipos de amostras crescidas em meio WLN com antibióticos, em concentração superior a 10^6 UFC/mL. Verifica-se que os autores também utilizaram as características morfológicas proporcionadas pelo meio diferencial WLN, mas neste caso determinaram as frequências dos morfotipos ao longo do período de safra, baseando-se nos morfotipos das coletas anteriores e não de forma independente em cada coleta. Isto significa, por exemplo, que os morfotipos caracterizados na coleta 1 foram utilizados como referência nas coletas seguintes, o que implica na discriminação morfológica de diferentes espécies, mas, também de linhagens de *S.cerevisiae*. Este critério pode trazer resultados equivocados com relação às frequências dos morfotipos, principalmente com relação à discriminação de linhagens, uma vez que a tipagem de colônias com morfologias diferentes pode apresentar o mesmo perfil eletroforético, e que colônias com morfologias semelhantes podem apresentar perfis eletroforéticos distintos, como constatado neste trabalho com o uso do microsatélite (GTG)₅. Mesmo assim, os resultados demonstraram maior estabilidade microbiológica na destilaria que utilizou inóculo isolado do próprio processo, onde as leveduras isoladas foram reunidas em um mesmo grupo com relação ao critério capacidade fermentativa, diferentemente daquela que utilizou fermento prensado, onde houve grande oscilação nos grupos dominantes ao longo da safra.

5.4. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2001/2002

O processo fermentativo da safra 2001/2002 foi iniciado com uma levedura de perfil (GTG)₅ caracterizado como P18 e denominado JP1-P18, por ter sido a primeira levedura

isolada na destilaria Japungu a ser utilizada como linhagem inóculo na safra seguinte. Este isolado esteve presente em oito das 15 coletas da safra 2000/2001 com 53,3% de aparecimento, e apenas na última coleta apresentou frequência superior a 20% (Figura 11). Esta levedura foi selecionada do último plaqueamento daquela safra baseando-se apenas no critério morfológico das colônias predominantes, o que devido a grande semelhança dos morfotipos entre linhagens, implicou na seleção da linhagem de perfil P18 no lugar da linhagem de perfil P1 que dominou 53,3% das coletas e naquele momento apresentava 47,3% de frequência (Tabela 5). Mesmo assim, a levedura de perfil P18 utilizada como inóculo (isolada da safra anterior no laboratório da destilaria, equivocadamente como predominante no lugar da levedura de perfil P1) apresentou excelente capacidade para se instalar no processo, com dominância em todas as coletas, e 97,4% de frequência no período de safra (Figuras 14 e 15). Estes resultados estão de acordo com os divulgados por Andrietta *et al.* (1995), que não recomendam a utilização de linhagens que não foram isoladas do próprio processo, mesmo que esta apresente potencial fermentativo excelente. Isto porque existe a tendência de que a linhagem introduzida seja substituída pela linhagem nativa adaptada ao processo. Outra característica relevante desta safra foi a injeção de 416,6 mil litros mensais de fermento de partida com perfil do tipo P18 (Tabela 7). Apesar de ser apenas 6,7% superior, equivalente a 27,9 mil litros de fermento mensais com relação à safra anterior, a diferença está na injeção de uma linhagem selecionada do próprio processo com características de predominância, ao contrário da linhagem IA-1238 de perfil P18A introduzida na safra anterior que não se apresentou competitiva, aparecendo apenas na 1ª e 14ª coletas, sendo portanto suplantada pelas linhagens nativas de *S. cerevisiae* (Figura 11).

Outras duas linhagens com perfis genéticos (GTG)₅ do tipo P5 e P6 também foram detectados a partir de 10% de frequência, entretanto, não se apresentaram competitivas com relação à linhagem inóculo de perfil P18. A Tabela 7 mostra também que o rendimento de 87,5 litros de álcool por tonelada de cana foi 6,1% maior que o da safra anterior, o que representa 5,3 litros por tonelada, equivalente a 2,7 milhões de litros de álcool a mais numa safra de 510,9 mil toneladas de cana.

5.5. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Japungu – Safra 2002/2003

A safra 2002/2003 também foi iniciada com a linhagem de perfil P18 em razão do seu bom desempenho na safra anterior. Entretanto, apesar de dominar em seis das oito coletas

(75%), leveduras selvagens de perfil (GTG)₅ distinto dos perfis encontrados para *S. cerevisiae* se instalaram no processo a partir da 5ª coleta com 124 dias de safra, aparecendo com 80% de frequência na 6ª coleta com 153 dias, provocando a substituição do fermento devido ao baixo desempenho fermentativo. A injeção de 187,5 mil litros mensais de fermento foi menos do que a metade do volume utilizado na safra anterior, como pode ser observado na Tabela 7, contribuindo de forma decisiva para queda do rendimento de 3,9%, apesar de se apresentarem as mesmas médias anuais de ART e teor alcoólico.

As leveduras selvagens com baixa capacidade de fermentação estão sempre presentes no processo fermentativo em concentrações que não trazem problemas de operação e conseqüentemente de rendimento. Dentre estas, podemos destacar espécies dos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Issatchenkia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Cryptococcus* e *Dekkera* (OLIVEIRA, 1994; CABRINI & GALLO 1999; CECCATO-ANTONINI & SILVA 2000; ALENCAR, 2001). A instalação dessas leveduras no processo se faz de forma progressiva, quando a população da levedura de processo cai por não apresentar capacidade de competir, ou por motivos operacionais como por exemplo: perdas excessivas de fermento pela centrífuga em razão de desgastes e regulagem dos bicos, tratamento ácido frequentes com valores de pH muito baixos por longo período para controle de bactérias, e principalmente, pela não manutenção de injeções constantes da levedura inóculo isolada do próprio processo, levando à troca de fermento como aconteceu nesta safra.

Após a troca de fermento o perfil P18 voltou a dominar nas duas últimas coletas, porque se trata de uma levedura já adaptada ao processo. A levedura de perfil P1 observada na safra 2000/2001 com elevada frequência de aparecimento, foi detectada nas últimas três coletas, e a levedura de perfil P24 catalogado pela primeira vez apresentou 20% de frequência com 186 dias de safra. O fato de se reinocular uma levedura adaptada realmente trouxe vantagem ao restabelecimento do processo, como preconizado por Andrietta *et al.* (1995), o que pode ser observado pela comparação entre a troca de fermento na safra 2002/2003 ilustrada nas coletas sete e oito da Figura 17. Verificou-se que a linhagem adaptada de perfil P18 voltou a dominar, ao contrário do que aconteceu com as injeções da linhagem IA-1238 de perfil 18A realizadas na safra 2000/2001, que não foram suficientes para o seu estabelecimento no processo, não sendo detectada mesmo em níveis de detecção abaixo de 10% na população (Figura 11).

5.6. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Miriri – Safra 2002/2003

A destilaria Miriri iniciou o processo com a levedura JP1-P18 adquirida da destilaria Japungu. Como pode ser observado na Figura 21, este perfil esteve presente em todas as coletas ao longo do período, mas não apresentou a mesma dominância encontrada na destilaria Japungu nas safras 2001/2002 e 2002/2003. Outras leveduras com menor frequência de aparecimento foram encontradas ao longo do período. Este é o caso daquelas com perfil do tipo P4, que foi um dos perfis que mais apareceram na destilaria Japungu na safra 2000/2001, inclusive dominando em algumas coletas (Figura 11), e do perfil do tipo P6, que apareceu em seis das 11 coletas, em algumas delas dominando o processo como ilustrado na Figura 21. A presença de leveduras selvagens de baixa capacidade fermentativa com perfil distinto daqueles observados para *S. cerevisiae*, trouxe problemas operacionais nos primeiros 15 dias de safra e pôde ser detectada na 2ª coleta com frequência de 10% na população (Figuras 21), concentração suficiente para se optar pelo descarte do fermento naquele momento. Após o reinóculo com a levedura JP1- P18 e injeções mensais de 400 mil litros de fermento (Tabela 7) não se detectou mais leveduras selvagens que não fossem *Saccharomyces cerevisiae*, confirmando os resultados obtidos por Andrietta *et al.* (1997) quando utilizaram injeções maciças de linhagens adaptadas para reinocular processos que haviam sido dominados por leveduras selvagens de baixa capacidade fermentativa. Entretanto, apesar das injeções de fermento se aproximarem em volume daquelas praticadas na destilaria Japungu na safra 2001/2002, não se observou a mesma dominância e nem o mesmo rendimento obtidos. A Tabela 7 mostra que o rendimento da destilaria Miriri se aproximou mais dos rendimentos das safras 2000/2001 e 2002/2003 da destilaria Japungu, e foi bastante superior aos rendimentos das destilarias Giasa e JB, que utilizaram os menores volumes na injeção de fermento. A levedura de perfil P1 encontrada em todo período de safra e dominando as três últimas coletas, demonstrou ser uma linhagem com características de permanência no processo como já observado para a destilaria Japungu e portanto, forte candidata à linhagem iniciadora em safras seguintes, seja como linhagem isolada ou em conjunto com outras que apresentem características desejáveis. A diferença no desempenho da linhagem de perfil P18 com relação à frequência e dominância, observada entre as destilarias Japungu nas safras 2001/2002 e 2002/2003, e Miriri 2002/2003, pode ser decorrente da melhor adaptação desta levedura ao processo da destilaria Japungu, o que

sinaliza na direção de que cada destilaria precisa trabalhar com linhagens adaptadas isoladas do próprio processo, como já recomendado por Andrietta *et al.* (1995; 1997).

5.7. Tipagem e Frequências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria Giasa – Safra 2002/2003

A Destilaria Giasa iniciou o processo com a linhagem PE-2 produzida e comercializada pela Lallemand Co., apresentando perfil (GTG)₅ do tipo P1A. Como pode ser observado na Figura 25, esta linhagem dominou o processo nos primeiros 31 dias de safra, mas esteve presente com frequência de apenas 20% na 4ª, 6ª e 8ª coletas. O processo fermentativo desta destilaria foi compartilhado com outros perfis, que em algumas coletas apresentaram-se dominando a população, como no caso do perfil do tipo P5 na 5ª coleta e P6 nas três últimas coletas. O perfil P18 que apareceu apenas na 5ª coleta com frequência de 20% por ocasião da única injeção de fermento importado da Destilaria Japungu, não se instalou, reforçando a necessidade da prática de injeção contínua de fermento para que uma linhagem alcance a concentração necessária para dominar o processo.

Esta destilaria, apesar de trabalhar com médias de ART e viabilidade celular mais altas do que as outras e média de acidez no mosto fermentado abaixo de 3,0 g/L, apresentou rendimento médio significativamente inferior às destilarias Japungu e Miriri (Tabela 7). A falta de dominância desta linhagem ao longo do período pode estar ligada a vários fatores, como a falta de adaptação às características como variedades de canas cultivadas naquela região, competição com as linhagens de *S. cerevisiae* nativas e condições operacionais do processo como assepsia, tratamento ácido e principalmente à prática de injeção de fermento.

A injeção média de apenas 26,6 mil litros mensais de fermento (Tabela 7) ao longo da safra pode ter sido a principal razão para a não predominância da PE-2, acarretando o descarte e a troca de fermento no último mês de safra, em função dos problemas operacionais provocados pela tomada do processo por leveduras selvagens de perfil distinto daqueles observados para as linhagens de *S. cerevisiae*. Isto pode ter contribuído para um rendimento médio abaixo daqueles observados para as destilarias Japungu e Miriri que adotaram a injeção de fermento como uma prática necessária para se alcançar rendimentos mais elevados.

A reinoculação foi realizada através de fermento com perfil do tipo P1 importado da Usina Estivas pertencente ao mesmo grupo industrial, permanecendo no processo até o final

da safra. É interessante assinalar que o perfil P1 esteve presente em sete das nove coletas realizadas no período, com 77,7% de aparecimento, porém dominando apenas na 4ª coleta com 44 dias de safra, o que mostra ser um perfil bastante freqüente como já observado para as destilarias Japungu e Miriri, mas que precisaria ser injetado para que atingisse uma concentração adequada para dominar o processo. O descarte do fermento com baixa capacidade fermentativa e o reinóculo com o fermento adaptado do tipo P1 proveniente da Usina Estivas, reforçou as recomendações de Andrietta *et al.* (1997) com relação ao sucesso da substituição, utilizando sempre um fermento adaptado de uma destilaria mais próxima.

5.8. Tipagem e Freqüências dos Perfis (GTG)₅ das Leveduras da Destilaria JB – Safra 2002/2003

A destilaria JB iniciou o processo fermentativo com a levedura de panificação produzida pela Fleischmann S/A, de perfil (GTG)₅ do tipo P6. A Figura 29 demonstra a substituição quase total dessa levedura a partir da 2ª coleta com 13 dias de safra, onde a freqüência da mesma caiu para 10% na população, tendo início a instalação de leveduras selvagens de forma crescente como pode ser observado na 3ª e 4ª coletas. Na 5ª coleta, com 60 dias de safra foi inoculado 30 mil litros de fermento PE-2 importado de outra destilaria, para tentar impedir o avanço das leveduras selvagens com perfil (GTG)₅ do tipo S3, S6 e S7 (Figura 27) de baixa capacidade fermentativa que já causavam transtornos operacionais ao processo, o que no momento foi conseguido juntamente com outras leveduras de perfis do tipo *S.cerevisae* P1, P4, e P5 (Figura 29).

A tentativa de restabelecer as condições fermentativas do processo sem uma contínua injeção de fermento através de uma linhagem de boa capacidade de fermentação adaptada ao processo, não foi bem sucedida. Isto porque houve o reaparecimento desses contaminantes na 6ª coleta, dominando o período de 75 a 105 dias, através de uma levedura selvagem com perfil (GTG)₅ do tipo S8, que resultou no descarte do fermento no final de dezembro e início de janeiro, e nova partida do processo a partir de 60 mil litros de fermento Fleischmann. Juntamente com o perfil P18, estas linhagens restabeleceram as condições de fermentação até o final da safra.

Estes resultados mais uma vez demonstraram a necessidade de não apenas injetar fermento, mas em volume suficiente para manter a população da levedura escolhida numa freqüência que não permita a instalação de leveduras contaminantes indesejáveis. Andrietta

et al. (1997) recomendaram este procedimento baseando-se nos resultados que demonstraram a capacidade que as leveduras selvagens indesejáveis apresentaram de retomarem, dominando o processo rapidamente, logo após uma troca ou injeção de fermento em volumes inadequados. Segundos estes autores, problemas deste tipo só foram resolvidos quando o volume de fermento injetado foi de aproximadamente 25% da massa total de fermento em processo.

A Figura 28 ilustrando a tipagem das leveduras isoladas pela amplificação da região ITS do rDNA, mostrou que os perfis do tipo *S. cerevisiae* foram confirmados pela amplificação da banda de 880pb, enquanto seis perfis (GTG)₅ para leveduras selvagens diferentes de *Saccharomyces* foram representadas por fragmentos de tamanhos distintos, sendo um com aproximadamente 520pb para os perfis S1, S3, S4, S6, S7, provavelmente linhagens da mesma espécie, e o outro com aproximadamente 650pb para o perfil S8, demonstrando a diversidade de leveduras selvagens indesejáveis que foram detectadas ao nível mínimo de 10% no processo fermentativo. A Tabela 7 demonstra que a destilaria JB foi a que menos utilizou injeção de fermento, e a que mais apresentou problemas com leveduras selvagens de baixa capacidade fermentativa, acarretando expressivas quedas de rendimento como pode ser observado quando se compara o seu rendimento médio com o das outras destilarias. Comparando com o menor rendimento médio de 82,3 L/TC obtido na destilaria Japungu na safra 2000/2001, a diferença foi de 11,8 L/TC o que pode significar 5,85 milhões de litros de álcool a menos, em uma safra de 500 mil toneladas de cana.

6. CONCLUSÕES

§ A amplificação de seqüências simples entre repetições (ISSR) com o iniciador (GTG)₅ gerou perfis com polimorfismo no padrão de bandas que permitiu a discriminação de espécies de leveduras contaminantes diferentes de *Saccharomyces*, e de linhagens nativas de *S. cerevisiae* em amostras de mosto fermentado coletadas em doma de fermentação industrial;

§ A caracterização genética dos isolados de leveduras do mosto fermentado evidenciou linhagens nativas de *S. cerevisiae* com frequências variáveis ao longo do período de safra, mais adaptadas ao processo com maior persistência e dominância, além da presença de leveduras contaminantes indesejáveis;

§ As linhagens nativas de *S. cerevisiae* adaptadas precisam estar presentes em altas concentrações para se estabelecerem no processo, sendo necessário, injeções constantes dessa em todo período de safra;

§ Leveduras utilizadas como inóculo de partida isoladas como dominantes em safras anteriores apresentaram maior capacidade de se instalar e dominar o processo do que as de origem comercial que foram introduzidas;

§ As destilarias com maiores médias de rendimento em etanol foram aquelas com maiores médias de volume de injeção de fermento e menor incidência de leveduras contaminantes de baixa capacidade fermentativa;

§ As leveduras isoladas com perfil do tipo *S. cerevisiae*, com exceção do perfil P22, foram boas fermentadoras em ensaios de laboratório nas condições de temperatura, concentração de células e de açúcares, semelhantes àquelas encontradas nas dornas;

§ O (GTG)₅ mostrou-se eficiente como marcador molecular no acompanhamento de populações em fermentações industriais, podendo ser utilizado como ferramenta no controle microbiológico do processo, no acompanhamento de leveduras inoculadas e na seleção de leveduras nativas com maior poder de dominância.

§ Leveduras de perfis (GTG)₅ do tipo P1 e P18 apresentaram características de frequência, dominância e bom desempenho fermentativo, sendo portanto linhagens adequadas para serem utilizadas como inóculo em processos fermentativos industriais para produção de álcool combustível, como também para receberem genes de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

ALCOOL: o álcool combustível. **Única**, São Paulo, jul. 2003. Disponível em: <http://www.única.com.br/pages/alcool_combustivel.asp>. Acesso em: 14 out. 2003.

ALENCAR, E.M.B. **Leveduras isoladas de mosto de cana-de-açúcar usado para a produção de álcool carburante**. 2001. 84f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB**, v.13, n.4 p.22-25. 1995.

_____; ANDRIETTA, M.G.S.; SERRA, G.E. Leveduras não fermentativas – processo de instalação e forma de detecção e eliminação. **STAB**, v.15, n.6, p.35, 1997.

_____; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB**, v.17, n.5, p. 54-59. 1999.

BALEIRAS COUTO, M.M.; HARTOG, B.J.; HUIS IN'T VELD, J.H.J.; HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSSEN, J.M.B.M. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. **Food Microbiology**, v.13, p.59-67, 1996b.

_____, EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS IN'T VELD, J.H.J.; VAN DER VOSSSEN, J.M.B.M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. p.41-46. 1996a.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W. & YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2. ed. Cambridge, Cambridge University Press. 1990. 1002p.

BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**. p.4514-4520. 1996.

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

BRASILEIRO, B.T.R. V. **Variabilidade genética em isolados de *Fusarium solani* detectada com a utilização de marcadores moleculares**. 2003. 91f. Tese (Doutorado em Biologia de fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Currents Genetics**. v.22, p. 1-7, 1992.

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.

BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. Associação Brasileira de Estatística. 105p. 1990.

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

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

CLARK-WALKER, G.D. Evolution of mitochondrial genomes in fungi. **International Revisions in Cytology**. v.14, p. 89-127 . 1992.

CODON, A.C.; BENITEZ, T.; COROLA, M. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 49, n.2, p.154-163, fev. 1998.

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

COPERSUCAR-COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA. **Fermentação**. São Paulb, 1987, 433 p.

DALLE, F.; FRANCO, N.; LOPEZ, J.; VAGNER, O.; CAILOT, D.; CHAVANET, P.; CUISENIER, B.; AHO, S.; LIZARD, S.; BONNIN, A. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 4554-4559, dec. 2000.

DLAUCHY, D.; TORNAI-LEHOCZKI, J.; PETER, G. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. **Systematic Applied of Microbiology**. v.22, p. 445-453, 1999.

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.

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

EXPORTAÇÃO de álcool é tema de seminário no BNDES. **FPN on-line**: notas e notícias, 2003.Disponível em:
<<http://www.fpnonline.com.br/fpn/notasnoticias/250803agroindustria001.htm>>. Acesso em:
14 set. 2003

FERREIRA, M.E. ; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.

FIELD, D. ; WILLS, C. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. **Proc. Natl.Acad.Sci.** v.95 p. 1647-1652, 1998.

FIERRO, F. ; MARTÍN, J.F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**. v.25, n.1, p. 1-17, 1999.

FOURY, F.; ROGANI, T.; LECRENIER, N.; PURNELLE, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *S. cerevisiae*. **FEBS Letters**. v.440, p. 325-331, 1998.

GALLEGO, F.J.; PEREZ, M.A.; MARTINEZ, I.; HIDALGO, P. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Am. J. Vitic.** V.49, n.3, p. 350-351, 1998.

GARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**. p.454-500, 1999.

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.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENSINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**. v.87, p. 949-956, 1999.

GREEN, S.R.; GRAY, P.P. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. v.13, p. 357-368, 1950.

GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**. v.169, p. 387-392, 1998.

GUTIERREZ, A.R. ; LÓPEZ, R. ; SANTAMARÍA, P. ; SEVILLA, M.J. Characterization of oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular fatty acid and mtDNA restriction polymorphism analysis. **Sciences des Aliments**. v.20, p. 321-330, 2000.

HANNEQUIN, C.; THIERRY, A.; RICHARD, G.F.; LECOINTRE, G.; NGUYEN, H.V.; GAILLARDIN, C.; DUJON, B. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. p.551-559, 2001.

HAYFORD, A.E.; JESPERSEN, L. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and *MAL* genotyping. **Journal of Applied Microbiology**. v.86, p. 284-294, 1999.

HENDERSON, S.T.; PETES, T.D. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**. v.12, p. 2749-2757, 1992.

JEFFREYS, A.J.; NEUMANN, R. Somatic mutation processes at a human minisatellite. **Human Molecular Genetic**. v.6, p. 129-136, 1997.

JESPERSEN, L.; KÜHLE, A. Van der Aa.; 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.

KOKOSKA, R.J.; STEFANOVIC, L.; TRAN, H.T.; RESNICK, M.A.; GORDENIN, D.A.; PETES, T.D. Destabilization of yeast micro- and minisatellite DNA sequences by mutations affecting a nuclease involved in Okazaki fragment processing (*rad27*) and DNA polymerase δ (*pol3-t*). **Molecular and Cellular Biology**. p.2779-2788. 1998.

KOLODNER, R.D.; MARSISCHKY, G.T. Eucaryotic DNA mismatch repair. **Current Opinion in Genetic**. v.9, p. 89-96, 1999.

KURTZMAN, C.P. Yeast systematics – from phenotype to genotype. **Food Technology and Biotechnology**. v.36, n.4, p. 261-266. 1998.

LEVINSON, G. & GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, p. 203-221, 1987.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖRNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**. v.33, p. 413-426. 1993.

LONGO, E.; VEZINHET, F. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. p.322-326, 1993.

LÓPEZ, V.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; BARRIO, E.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**. v.81, p. 63-71. 2003.

LÓPEZ, V.; QUEROL, A. A.; RAMÓN, D.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T. A simple procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. v.68, p. 75-81. 2001.

MARTINS, C.V.B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Characterization of fusion products from protoplasts of yeasts and their segregants by electrophoretic karyotyping and RAPD. **Revista de Microbiologia**. v.30, p. 71-76, 1999.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polimerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**. v.16, p. 1648-1656, 1995.

MIKLOS, I.; VARGA, T.; NAGY, A.; SIPICZKI, M. Genome instability and chromosomal rearrangements in a heterothallic wine yeast. **Journal of Basic Microbiology**. v.37, p. 345-354, 1997.

MITRAKUL, C.M.; HENICK-KLING, T.; EGLI, C.M. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiology**. v.16, p. 3-14, 1999.

MONTROCHER, R.; VERNER, M-C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.48, p. 295-303, 1998.

NADAL, D.; CARRO, D.; FERNÁNDEZ-LARREA, J.; PIÑA, B. Analysis and Dynamics of the chromosomal complements of wild Sparkling-Wine yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**. p.1688-1695. 1999.

NEWTON, S.M.C. O que é gene. In: **Genética molecular e de microrganismo**. São Paulo. Editora Manole. 1987, p. 80-95

NEWTON, C.R.; GRAHAM, A. **Polymerase chain reation**. 2. ed. 1997. 192p.

OLIVEIRA e SILVA, R.B. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo**: quantificação e identificação. 1994. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita, São Paulo, 1994.

PARAZZI, C.; SILVA, A.R.da; ARAUJO, R.T.de. Avaliação de diferentes linhagens de leveduras selvagens na fermentação alcoólica. **STAB**. v.20, n.3, p. 36-40, Jan./Fev. 2002.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v.89, p. 24-31, 2000.

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

_____; _____; MARTÍNEZ, I.; HIDALGO, P. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. **Letters in Applied Microbiology**. v.33, p.461-466, 2001.

PUIG, SERGI.; QUEROL, A.; BARRIO, E.; PÉREZ-ORTÍN, J.E. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 2057-2061. 2000.

QUESADA, M.P. & CENIS, J.N. 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.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMON, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. **Systematic and Applied Microbiology**. v.15, p. 439-446, 1992.

_____; _____; HUERTA, T.; RAMON, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**. p.2948-2953, 1992.

_____; _____; RAMON, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v.21, p. 315-323. 1994.

ROHLF, F.J. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **Applied Biosstatistics, Inc.** New York, Exeter Publishing, 1998.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.H.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v.239, p. 487-491, 1998.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F. & MANIATS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York, 1989.

SCHUTZ, M. & GAFNER, J. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**. v.75, p. 551-558, 1993.

SIA, E.A.; KOKOSKA, R.J.; DOMINSKA, M.; GREENWELL, P.; PETES, T.D. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. **Molecular and Cellular Biology**. p. 2851-2858, 1997.

SILVA FILHO, E.A. **Fermentação etanólica**: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo, bactérias e leveduras contaminantes. 1993. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita, São Paulo, 1993.

SINDACUCAR, últimas notícias. Disponível em: http://www.sindicucar.com.br/ultima_centro.html. Acesso em: 13 set. 2003.

SIPICZKI, M.; ROMANO, P.; LIPANI, G.; MIKLOS, I.; ANTUNOVICS, Z. Análisis of yeast derived from natural fermentation in a Tokaj winery. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.79, p. 97-105, 2001.

STROPPA, C.T.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; SERRA, G.E. Dinâmica populacional de leveduras em processos de fermentação alcoólica. In: **SINAFERM**, 13., 2000, Teresópolis. **Anais...Teresópolis**, Rio de Janeiro, 7-10 de agosto de 2000. p. 1-5

TECHERA, A.G.; JUBANY, S.; CARRAU, F.M.; GAGGERO, C. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. **Letters in Applied Microbiology**. v.13, p. 71-75, 2001.

THANOS, M.; SCHÖNIAN, G.; MEYER, W.; SCHWEYNOCH, C.; GRÄSER, Y.; MITCHELL, T.G.; PRESBER, W.; TIETZ, H.J. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 615-621, Mar. 1996.

TORNAI-LEHOCZKI, J.; DLAUCHY, D. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**. v.62, p. 37-45, 2000.

TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; SUZZI, G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.75, p. 207-215, 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, L.C. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre, ARTMED, 2000. 827p.

VALENTE, P.; GOUVEIA, F.C.; LEMOS, G.A.; PIMENTEL, D.; ELSAS, JAN D. van.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. **FEMS Microbiology Letters**. v.137, p. 253-256, 1996.

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.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; Van DIJKEN, J.P. Effects of benzoic acids on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**. v.8, p. 501-517, 1992.

VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J.N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.32, p.568-571, 1990.

WEBER, J.L. & WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetic**. v.2, p. 1123-1128, 1993.

WEISING, K.; ATKINSON, R.G.; GARDNER, R.C. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. **PCR Methods and Applications**. p.249-255, 1995.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (ED.), **PCR Protocols, a guide to methods and applications**. New York. Academic Press, 1990. p. 315-322.