

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Everton Angioletto

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS
PARA PRODUÇÃO DE SIDRA**

Florianópolis

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Everton Angioletto

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS
PARA PRODUÇÃO DE SIDRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi
Coorientador: Prof. Dr. Admir José Giachini

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Angioletto, Everton
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO
DE SIDRA / Everton Angioletto ; orientador, Márcio José
Rossi ; co-orientador, Admir José Giachini. -
Florianópolis, SC, 2013.
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Isolamento. 3.
leveduras. 4. fermentação. 5. sidra. I. José Rossi, Márcio.
II. José Giachini, Admir. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. IV. Título.

Everton Angioletto

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS
PARA PRODUÇÃO DE SIDRA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 26 de Março de 2013

Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof. Dr. Claus Troger Pich
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Malva Isabel Medina Hernández
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico a minha família e a todas as
pessoas que me incentivam.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de estar onde estou, com quem estou, fazer o que faço; viver e aprender muitas lições aqui nesta existência: saber esperar, calar, falar, recuar e lutar nas horas certas. Esse é o real aprendizado, um exercício de paciência e merecimento.

A minha companheira e namorada Bibiana de Moraes Arns, pelo carinho diário, acreditar no meu potencial, pela convivência, amor e, acima de tudo, me inspirar a fazer sempre algo novo a cada dia.

Aos meus pais Elidio e Marisa, meus familiares e a família de Moraes Arns, pelo carinho e por me apoiar sempre, pelos conselhos e preces.

Aos meus orientadores professores Marcio e Admir pela confiança, paciência, orientações, crescimento intelectual e humano.

Aos professores Cláudio Soares, Rafael de Armas, Margarida de Mendonça e Vetúria L. Oliveira pelos conselhos, ajudas e aprendizados em laboratório.

Ao professor Artur Smânia Jr., pelas contribuições acerca do parecer do trabalho e acréscimo de conceitos importantes.

Ao professor da UNESC, Claus Troger Pich pelos equipamentos de molecular cedidos gentilmente.

A bolsista de iniciação científica Thais dos Santos Martins, que me ajudou primorosamente no processo e finalização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, em especial: Carla Camellini, Alceu Azambuja e Emanuela Pille pela parceria no laboratório em uma época saudável e também aos colegas que partiram.

Aos amigos de Criciúma, que mesmo separados pela distância, mentalizaram meu sucesso e felicidade.

A todos do laboratório de Protozoologia e Virologia da UFSC, que me acompanharam no desenvolvimento deste trabalho, pelos equipamentos utilizados e pelos conselhos, em especial: Profs. Edmundo Grisard e Patrícia Hermes Stoco e mestrandas Elisa Prestes, Carolina Coelho, Gisllaine Fongaro e Ninna Granucci.

A todos os professores que depositaram sua confiança nas cartas de recomendação que foram solicitadas na inscrição do programa, em especial os doutores: Emílio Luiz Streck, Felipe Dal Pizzol, Jamil Assreuy, Márcio Antônio Fiori, Marcos Marques da Silva Paula e Tatiana Barichello.

A CAPES, pela bolsa de mestrado cedida ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC, e a FAPESC pelo apoio financeiro que permitiu a realização do projeto.

RESUMO

A maior parte do plantio nacional de maçãs é feita nos estados da região sul. Devido a eventos que comprometem a qualidade dos frutos, observam-se perdas anuais significativas na produção. A perspectiva dessas perdas pressiona o setor agroindustrial na busca por alternativas que agreguem mais valor aos frutos não destinados ao consumo *in natura*. Além da utilização destes na produção de suco, a obtenção de produtos diferenciados como a sidra mostra-se como uma das alternativas. A sidra é uma bebida alcoólica feita a partir do suco fermentado de maçãs, por um processo semelhante ao da produção de espumantes a partir de uvas, mas resultando num produto com menores teores de álcool. Vários fatores podem interferir na qualidade das sidras, sendo que as leveduras utilizadas e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam as características finais dessa bebida. Nesse contexto, este trabalho trata do isolamento de leveduras e de estudos visando agrupar e caracterizar isolados para essa finalidade. Os estudos foram de caráter preliminar, visando a criação de recursos para estabelecimento dessa linha de pesquisa. Embora tenha sido isolado mais de 200 leveduras, principalmente oriundas de atividades de maleicultura, neste trabalho apresentam-se os resultados obtidos de um grupo de 81 leveduras. A busca e caracterização de linhagens de leveduras iniciadoras para diferentes resultados enológicos e que predominem durante a fase fermentativa poderão permitir melhor controle do processo produtivo, além de estabelecer padrões elevados e duradouros, resultando em sidras de alta qualidade.

Palavras-chave: Isolamento, leveduras, maçã, sidra, fermentação

ABSTRACT

Most of the Brazilian national crop of apples is made in the southern states. Due to events that compromise the quality of the fruits, there are significant annual losses in production. The prospect of such losses presses the agribusiness sector to seek alternatives to add greater value to the fruit not destined for fresh consumption. Besides the use in the production of juice, differentiated products such as cider is shown as an alternative. Cider is an alcoholic beverage made from fermented apple juice, through a process similar to the production of sparkling wine from grapes, but resulting in a product with lower alcohol levels. Several factors can interfere with the quality of ciders, and the yeasts and fermentation conditions have been identified as the factors that most influence the final characteristics of this drink. In this context, this work had the objective of isolating yeasts and developing studies to determine and characterize the best candidates for the production of cider. The studies were preliminary in nature in order to create resources for the establishment of this line of research. While we have isolated over 200 yeasts, primarily from apple orchards and processing facilities, in this work we present the results obtained for only 81 of them. The search and characterization of potential yeast strains for different starting and oenological properties that prevail during the fermentation phase, may allow better control of the production process, and establish high standards for the obtainment of high quality ciders.

Keywords: Isolation, yeasts, apple, cider, fermentation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização dos municípios catarinenses produtores de maçã.	31
Figura 2 - Evolução da área cultivada, produção e produtividade da cultura da maçã no Brasil; dados de 2001 a 2011	32
Figura 3 - Exemplos de reprodução assexuada por fissão (A) e brotamento (B)	38
Figura 4 - Tipos de superfícies e bordas de colônias de leveduras comuns no processo de isolamento	39
Figura 5 - Tipos de formas de células de leveduras	40
Figura 6 - Diagrama mostrando a localização da região ITS ancorada entre as regiões codificadoras das subunidades maior (25S rDNA) e menor (18S rDNA) dos ribossomos. As setas menores indicam a posição aproximada da ancoragem dos iniciadores (<i>primers</i>) pITS1-F e pITS4 enquanto a seta maior indica o fragmento de amplificação da porção representada pelo ITS.	42
Figura 7 - Efeitos do estresse osmótico na célula de levedura	52
Figura 9 - Áreas de coleta das amostras de maçãs e suas localizações.	58
Figura 10 - Teste de produção de sulfeto de hidrogênio. Colônias a esquerda são H ₂ S negativa e a direita H ₂ S positiva.	64
Figura 11. Morfologia macro (superior) e microscópica (inferior) de sete isolados de leveduras obtidos e analisados neste estudo: 1 (A e A1), 12 (B e B1), 13 (C e C1), 71 (D e D1), 68 (E e E1), 99 (F e F1) e 3 (G e G1)	69
Figura 12 - Dendrograma referente às características morfológicas macroscópicas e microscópicas de 84 isolados leveduriformes avaliados.	70
Figura 13 - Dendrograma referente aos perfis filogenéticos obtidos via clivagem enzimática obtidos pela análise de 84 isolados leveduriformes.	73
Figura 14 - Crescimento celular em função da temperatura de incubação.....	78
Figura 15 - Isolados crescendo em meio de glicose 50% (1000 g L ⁻¹).	83
Figura 16 - Teste de produção da proteína <i>killer</i> (esquerda) e exemplo do halo de inibição (direita).	84
Figura 17 - Número de isolados com resultado positivo para diferentes condições testadas, em relação ao total de isolados analisados.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de Leveduras Isoladas Após a Coleta.	67
Tabela 2 - Produção de gás (+) por isolados de leveduras em diferentes valores de pH.....	76
Tabela 3 - Fermentação de diferentes açúcares (+) pelos isolados de leveduras.	80
Tabela 4 - Capacidade (+) de formar flocos, expressar proteínas <i>killer</i> e tolerar altas pressões osmóticas dos isolados de leveduras.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celcius
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Força G
<i>HAEIII</i>	Endonuclease obtida de <i>Haemophilus aegypticus</i>
<i>HINFI</i>	Endonuclease obtida de <i>Haemophilus influenzae</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PA	Padrão analítico
pb	Pares de bases
<i>PFGE</i>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
<i>pH</i>	Potencial Hidrogeniônico
<i>RFLP</i>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RSAI</i>	Endonuclease obtida de <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
ton	Tonelada
ton/ha	Tonelada por hectare
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
YEPG	<i>Yeast Extract, Peptone, Glucose</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 OBJETIVO GERAL	29
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 O MERCADO DA MAÇÃ EM SANTA CATARINA	31
2.2 A IMPORTÂNCIA DAS LEVEDURAS NA INDÚSTRIA	35
2.3 REPRODUÇÃO E MORFOLOGIA DAS LEVEDURAS	36
2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	39
2.4.1 CARACTERES MORFO-FISIOLÓGICOS	39
2.4.2 CARACTERES MOLECULARES	41
2.5 A SIDRA DE MAÇÃ	43
2.5.1 COMPOSTOS AROMÁTICOS DA SIDRA	44
2.6 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE SIDRA	45
2.6.1 INFLUÊNCIA DO SULFETO DE HIDROGÊNIO	45
2.6.2 INFLUÊNCIA DO ETANOL	46
2.6.3 INFLUÊNCIA DO PH	47
2.6.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	48
2.6.5 OSMOTOLERÂNCIA	51
2.6.6 FLOCULAÇÃO	53
2.7 TOXINAS <i>KILLER</i>	54
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 MEIOS DE CULTURA	57
3.2 COLETA E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	57
3.3 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS	60
3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	60
3.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS	61
3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ISOLADOS	63
3.6.1 PRODUÇÃO DE H₂S	63
3.6.2 CAPACIDADE FERMENTATIVA	64
3.6.3 TOLERÂNCIA A BAIXO PH	64
3.6.4 TOLERÂNCIA À BAIXA TEMPERATURA	65
3.6.5 OSMOTOLERÂNCIA	65
3.6.6 CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO	65
3.7 EXPRESSÃO E SENSIBILIDADE AO FATOR <i>KILLER</i>	65

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS	67
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	68
4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	72
4.4 PRODUÇÃO DE H ₂ S	75
4.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	75
4.5.1 TOLERÂNCIA A BAIXO PH	76
4.5.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	77
4.5.3 CAPACIDADE FERMENTATIVA	79
4.5.4 CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO	81
4.5.5 OSMOTOLERÂNCIA	82
4.6 EXPRESSÃO E SENSIBILIDADE A FATOR KILLER	83
5 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A - CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROSCÓPICAS DOS ISOLADOS AVALIADOS	99
APÊNDICE B - ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE H₂S	100
APÊNDICE C - AMOSTRAS ISOLADAS E LOCAIS DE COLETA COM SEUS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO E FRAGMENTOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>HAE III</i>, <i>RSA I</i> E <i>HINF I</i>	101
APÊNDICE D - GÉIS DE AGAROSE COM PADRÕES DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA <i>HAEIII</i> DOS 84 ISOLADOS (M: DNA LADDER)	103
APÊNDICE D - GÉIS DE AGAROSE COM PADRÕES DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA <i>HINF I</i> DOS 84 ISOLADOS (M: DNA LADDER) (<i>CONT.</i>)	105

1 INTRODUÇÃO

A maior parte do plantio nacional de maçãs é feita nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Devido a eventos climáticos, que comprometem a qualidade dos frutos, observam-se perdas anuais significativas na produção nacional de maçãs, chegando a inviabilizar até 30 % da comercialização *in natura* dos frutos (IBGE, 2012).

A perspectiva dessas perdas pressiona o setor agroindustrial a buscar alternativas para agregar maior valor aos frutos não destinados ao consumo *in natura*, além da diminuição daqueles que são completamente descartados. Além da utilização destes na produção de suco, a obtenção de produtos diferenciados, como a sidra, mostra-se como uma alternativa potencialmente vantajosa. A sidra verdadeira, diferentemente daquela produzida no Brasil, é uma bebida alcoólica feita somente a partir da fermentação do suco de maçãs (BRASIL, 2009).

O teor de etanol sempre foi sinônimo de qualidade das bebidas e foi progressivamente aumentando nas mais consumidas como vinhos e cervejas. Porém, nos últimos anos, uma tendência tem marcado o mercado nacional de alimentos e bebidas: a do produto saudável e conveniente. Parte dos consumidores de bebidas fermentadas busca produtos alternativos, motivados pela redução de calorias ou pela moderação dos efeitos prejudiciais do álcool, como no caso da sidra.

Durante as condições de fermentação, as leveduras utilizadas têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam para a característica final dessa bebida, pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos responsáveis pelo aroma é formada. A busca e caracterização de linhagens de leveduras iniciadoras adequadas, e que predominem durante a fase fermentativa, poderão permitir melhor controle do processo produtivo, além de estabelecer padrões de qualidade elevados e duradouros, permitindo a obtenção de sidras de alto valor agregado (CARVALHO et al., 2010).

No Brasil, o consumo da sidra é concentrado em épocas festivas, competindo com os espumantes, que é um produto com maior qualidade e preço mais elevado. Um dos principais fatores responsáveis pelo baixo consumo dessa sidra, mesmo considerando seu baixo custo, é a baixa qualidade, principalmente quando comparada a produtos industrializados de regiões tipicamente produtoras de sidras em outros países (NOGUEIRA et al., 2006).

O emprego de leveduras selecionadas, com características próprias, oferece uma série de vantagens como a fermentação regular e completa, produção de álcoois desejados, produção controlada de acidez volátil, possibilidade de uma clarificação mais rápida e melhoria da estabilidade biológica (NOGUEIRA et al., 2003).

Em 2010, com iniciativa da Epagri de Videira e apoio financeiro da Fapesc, iniciaram-se estudos visando a elaboração de sidras de alta qualidade. Os trabalhos foram divididos em três temas de mestrado abordando diferentes aspectos da tecnologia de produção de sidras. Um tema tratou de avaliar a influência de variedades de maçãs na qualidade sensorial, utilizando o processo de fermentação em que a segunda etapa fermentativa ocorre dentro da garrafa. Outro tema tratou de desenvolver todo o processo em uma única etapa em fermentadores com condições controladas e conduzindo o processo pressurizado. Para isso desenvolveu-se equipamentos de fermentação e envase para escala de bancada e estudou-se o encapsulamento de leveduras. Nesses dois trabalhos foram utilizadas leveduras comerciais que originalmente foram selecionadas para a produção de vinhos e espumantes.

Nesse contexto, a proposta deste trabalho, que é um dos três estudos relacionados a esse projeto, foi de proceder à identificação de leveduras com potencial para o desenvolvimento de sidras verdadeiras, que são aquelas produzidas somente com suco de maçãs. Este trabalho, como também foram os demais, é uma iniciativa de se estabelecer uma linha de pesquisa nessa área no Dept. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC. Dessa forma, foi necessária a implementação da estrutura de laboratório e de metodologias que ainda precisam ser aperfeiçoadas e ampliadas. Assim, o resultado tem um caráter preliminar de identificação e caracterização de leveduras, cujas informações poderão servir de aporte para estudos e projetos adicionais, explorando aspectos como o processo fermentativo, a estabilidade do produto, dentre outros, utilizando leveduras com características diferenciadas isoladas da própria maçã. Num contexto mais amplo também tem o objetivo de estimular o mercado de sidras verdadeiras na região do ciclo da maçã em Santa Catarina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Isolar linhagens de leveduras de regiões de cultivo e processamento de maçãs e analisar sua diversidade visando sua seleção para a produção de sidras.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Obter isolados de leveduras em regiões de plantio, estocagem e processamento de maçãs;
- b) Caracterizar os isolados morfológicamente usando caracteres macromorfológicos e micromorfológicos;
- c) Caracterizar os isolados através da técnica molecular ARDRA, visando agrupar os isolados considerando as características que mais os definirem como semelhantes;
- d) Caracterizar os grupos formados por meio de análises físico-químicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O MERCADO DA MAÇÃ EM SANTA CATARINA

Nos últimos anos o mercado brasileiro tem processado mais de 1 milhão de toneladas de maçãs por ano. Dados revelam que o estado de Santa Catarina produz atualmente aproximadamente 50 % da produção brasileira de maçãs (672 mil ton), seguido pelo Rio Grande do Sul que produz 46 % da produção nacional (634 mil ton) e do estado do Paraná, com 4.2 % (57 mil ton) (IBGE, 2012).

Em Santa Catarina, o estímulo para o plantio de macieiras surgiu da necessidade de diminuir os elevados gastos com a importação de maçãs e a necessidade de criar novas alternativas econômicas para os agricultores do planalto, o que levou o Governo do Estado de Santa Catarina, através da Lei nº 4.263, de 31/12/1968, a criar o “Projeto de Fruticultura de Clima Temperado para o Estado de Santa Catarina” - PROFIT (BONETI et al., 2002).

Com o desenvolvimento do PROFIT, a predominância da maior parte dos produtores de maçã da região catarinense concentrou-se nas regiões de serra e meio oeste, onde a temperatura e as horas de frio são adequadas para o crescimento da fruta, destacando-se as cidades de São Joaquim, Urubici, Fraiburgo e Videira, conforme pode ser visualizado na Figura 1.

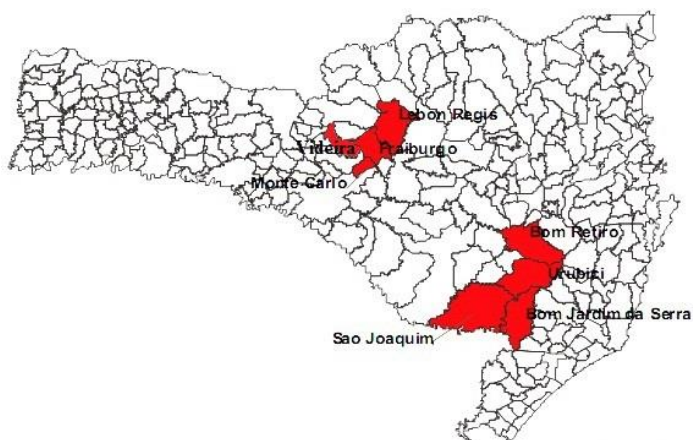


Figura 1. Localização dos municípios catarinenses produtores de maçã. Modificado de (PEREIRA et al., 2010).

Das maçãs produzidas nessas regiões estima-se que cerca de 58 % pertençam à variedade Gala, 37 % à variedade Fuji e ainda 5 % a outras variedades como Black-jon, Golden Delicious, Imperial Gala, Imperatriz, Starking, dentre outras.

Nos últimos 11 anos a produção nacional de maçã passou de 716.030 para 1.364.953 ton, ou seja, cresceu cerca de 9,0 % ao ano (FIORAVANÇO et al., 2012). Além disso, o maior crescimento da produção em relação à área cultivada foi proporcionado, obviamente, por um aumento substancial da produtividade dos pomares. No período analisado, ela passou de 23,14 para 36,13 ton/ha, indicando uma elevação média anual ao redor de 5,61 %, conforme Figura 2. A colheita sazonal dessas maçãs se restringe principalmente aos meses de fevereiro, março e abril até meados de maio.

Apesar das altas produtividades, muitos aspectos podem diminuir a produção anual de maçãs. Dentre eles observa-se que os fatores climáticos influenciam diretamente na produtividade, já que os danos associados a chuvas e granizo chegam a reduzir cerca de 30 % da produção – em torno de 275 mil ton ano (IBGE, 2012).

Como forma de reduzir as perdas da produção, muitas maçãs são destinadas à fabricação de alimentos processados que geralmente tem baixo valor agregado.

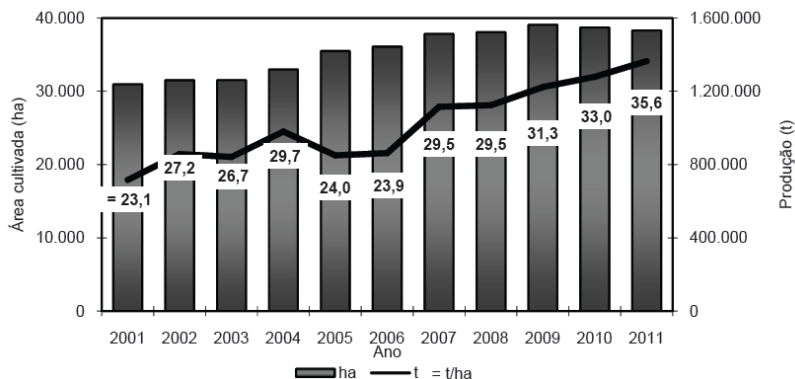


Figura 2. Evolução da área cultivada, produção e produtividade da cultura da maçã no Brasil; dados de 2001 a 2011 (FIORAVANÇO et al., 2012).

Na maleicultura os frutos de baixa qualidade utilizados para obtenção desses produtos alternativos são nomeados tecnicamente por “CAT 3”, os quais normalmente apresentam formato e coloração

desuniformes, tamanho pequeno, cicatrizes provenientes de insetos, pássaros ou granizo, ou fermentos resultantes de tratamentos culturais e transporte inadequados, além de sintomas de doenças e problemas fisiológicos (PAGININI et al., 2004). Essa categoria ou qualidade de fruto chega a ser vendida a R\$ 0,08 o quilo no período de colheita, segundo relato dos próprios produtores, sendo destinados primordialmente para a produção de sucos.

Além dos fatores climáticos desfavoráveis, existe ainda a necessidade de armazenamento refrigerado em câmaras com adição de gases especiais por longos períodos de tempo após a colheita. Isso por si só representa investimentos e gastos com produtos que tem um valor comercial extremamente baixo. Ademais, é necessário salientar que a estocagem no mercado brasileiro atual já apresenta déficit para toda a produção catarinense, sendo a mesma capaz de estocar um volume máximo próximo a 512 mil ton (IBGE, 2012).

Como consequência desta deficiência de armazenagem pode-se afirmar que, no caso da maçã, ocorre uma redução de lucratividade, pois os ganhos de comercialização são resultados de funções como transporte, armazenagem, manuseio, embalagem e distribuição. Sem dúvida, dado a natureza perecível da fruta, o custo de armazenagem em câmaras frias é o mais expressivo (PEREIRA et al., 2010).

O excedente da produção catarinense, que não é absorvida pelas empresas e cooperativas do estado, é vendido pelos pequenos e médios produtores para empresas de outros estados, principalmente do Rio Grande do Sul. A falta de estrutura de armazenagem provoca o deslocamento de boa parte da produção e proporciona a outros estados os ganhos obtidos no processo de beneficiamento da maçã e no valor agregado que a fruta recebe até chegar aos centros de distribuição (CÁRIO et al., 2010).

Além dos problemas de armazenagem e transporte, o mercado consumidor, cada vez mais consciente, vem impondo exigências quanto à necessidade de produtos isentos de resíduos de agrotóxicos. No desenvolvimento das plantações de maçãs, constata-se que estas passam por constantes tratamentos de manutenção contra pragas, como a utilização de fungicidas e herbicidas. Na sua grande maioria essa classe de compostos químicos é aplicada com intuito de prevenir a infecção por parasitas, sendo que no processamento da maçã para a produção de sidra pode afetar o crescimento das leveduras durante o processo fermentativo (CABRAS, 2000).

As maçãs industriais disponíveis no país são atípicas se comparadas às de outros países tradicionalmente processadores de sucos e/ou bebidas fermentadas. Para a exportação, a matéria-prima deve ser

sadia e de elevada qualidade, sem qualquer traço de contaminação com microrganismos. Na maioria dos casos é verificada a presença de micotoxinas como a patulina, que tem por características ser termorresistente, cancerígena e letal, sendo produzida por alguns fungos. Esse problema apresenta-se minimizado em produtos fermentados, pois as leveduras diminuem ou até eliminam a presença de patulina, mesmo quando tenha sido intencionalmente adicionada em ensaios experimentais (CELLI, 2006).

A exemplo do que ocorre com os investimentos catarinenses no campo das fermentações de produtos típicos como a cerveja e o vinho, a produção de sidras de qualidade é uma alternativa viável de diversificação e aproveitamento das frutas que são descartadas no processo de classificação, aumentando assim a lucratividade dos produtores.

Um bom exemplo pode ser extraído das Astúrias, ao norte da Espanha, onde a sidra foi originada e é, de acordo com a literatura, uma excelente fonte de renda para a região (ESCANOLA, 2011). Essa região espanhola tem como característica a presença de pequenos agricultores, e a combinação de atividades pecuárias com a maleicultura. A produção de sidra é a principal característica socioeconômica do meio rural, permitindo que estes produtores obtenham receitas complementares dentro da exploração agrícola familiar, o que, por outro lado, contribui para evitar o êxodo rural, gerando uma atividade que protege o ambiente e fixa a população, além de gerar a chamada “Rota da Sidra” na região. Além disso, as instalações de produção de sidra nas Astúrias estão concentradas em lugares próximos de infraestrutura adequada e com serviços eficientes para estimular o turismo (ESCANOLA, 2011).

No Brasil, por outro lado, especificamente no estado de Santa Catarina, não existe relato que o mesmo apresente projeto implantado ou suporte financeiro investido para adequar a produção anual com o desenvolvimento de uma cultura sidrícola, visto que a maior demanda de incentivos fiscais se destaca a outras bebidas fermentadas, nas festas típicas alemãs e regiões para plantio de uva de altitude no oeste catarinense.

A elaboração de uma sidra de alta qualidade poderá gerar não somente ganho direto com a utilização dessa matéria prima, como também pode proporcionar ganhos indiretos pela geração de empregos e desenvolvimento, além de contribuir como atrativo cultural típico desta região catarinense, potencializando a atração turística para o setor.

2.2 A IMPORTÂNCIA DAS LEVEDURAS NA INDÚSTRIA

As leveduras, fundamentais para os processos fermentativos, são classicamente descritas como organismos unicelulares de rápido crescimento e de ampla utilização biotecnológica (MOREIRA et al., 2010). A ordem *Saccharomycetales* engloba cerca de 800 espécies distribuídas em 107 gêneros com diversas atividades e capacidades metabólicas. Muitas destas têm sido utilizadas na alimentação e são culturalmente e legalmente aceitas no Brasil para o consumo humano na forma de nutracêuticos (BOZE et al., 1992; WALKER, 1998).

Nas últimas três décadas, a importância industrial das leveduras se estendeu a diversos setores como a produção de bebidas alcoólicas, a biomassa (como na panificação e alimentos funcionais), e vários produtos metabólicos. Em outro setor, atendem a demanda de produtos como enzimas, vitaminas, polissacarídeos capsulares, carotenóides, álcoois poli-hídricos, lipídios, glicolipídios, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono, e compostos sintetizados pela introdução de DNA recombinante em leveduras. Alguns destes produtos são produzidos comercialmente, enquanto outros são potencialmente valiosos para a biotecnologia (ROSA et al., 2006).

Atualmente, as leveduras são produtoras dos quatro principais produtos da fermentação em termos de ton/ano em todo o mundo. Com relação a sua utilização na produção das bebidas fermentadas como a cerveja (60 milhões), o vinho (30 milhões) e na forma de biomassa seca como em proteínas unicelulares e rações (800 mil), e ainda como fermento de panificação (600 mil) (ROSA et al., 2006).

Dentre os múltiplos setores para o melhoramento de determinados produtos fermentados, há o reconhecimento da importância da seleção e estudo de diversidade de leveduras como um agente imprescindível para a obtenção de características organolépticas mais específicas. Nesta pesquisa biotecnológica existe a necessidade de selecionar as mais adequadas propriedades metabólicas e genéticas das leveduras empregadas nos processos fermentativos, assim como de desenvolver sistemas analíticos capazes de distinguir características entre as diferentes leveduras, tanto das desejáveis para o bioprocessamento quanto daquelas contaminantes.

O emprego de leveduras selecionadas no campo biotecnológico, com características próprias para a produção de fermentados alcoólicos e até mesmo a sidra, oferece uma série de vantagens, tais como: fermentação completa e regular, produção adequada de álcool, produção controlada de acidez volátil, possibilidade de uma clarificação mais rápida do mosto e melhoria da sua estabilidade biológica e obtenção de

aromas particulares. Com leveduras selecionadas torna-se possível a obtenção, de ano para ano, de produtos mais uniformes (NOGUEIRA et al., 2003).

As linhagens de leveduras iniciadoras (inoculadas) conhecidas por “starters” são hoje largamente utilizadas, uma vez que possuem boa capacidade fermentativa e enológica, contribuindo para a padronização do processo de fermentação e aumento da qualidade dos produtos fermentados (NOGUEIRA et al., 2003). O processo de fermentação com linhagens selecionadas tem como vantagem acelerar o início do processo, evitar os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea, possibilitar velocidade de fermentação mais uniforme e rápida, diminuir a competição por nutrientes essenciais e aumentar o rendimento e qualidade do produto, além de diminuir as variações no *flavor* da bebida (SANNI; LONNER, 1993).

Utilizando do conhecimento prévio das linhagens iniciadoras, pesquisas têm sido desenvolvidas em várias partes do mundo a fim de desenvolver tecnologias para atingir, cada vez mais, produtos de alta qualidade para atender as exigências do mercado consumidor (VALERO et al., 2006). Além disso, os resultados dessas pesquisas têm demonstrado que a qualidade das bebidas está relacionada com a ecologia microbiana presente no mosto fermentado, já que as diferentes espécies e suas populações determinam os tipos e as concentrações das várias substâncias.

2.3 REPRODUÇÃO E MORFOLOGIA DAS LEVEDURAS

As leveduras possuem características típicas dos fungos como presença de parede celular rígida e núcleo organizado com membrana nuclear. Além disso, são aclorofilados, tem nutrição heterotrófica através de absorção dos nutrientes, sua reprodução sexuada se dá através de células especializadas denominadas ascósporos ou basidiósporos e a assexuada por brotamento ou fissão. Adicionalmente, não apresentam motilidade celular (FUENTEFRIA, 2007). Com relação aos ciclos de vida, esses envolvem fases haplóides e diplóides, separados por pareamentos e eventos da meiose e esporulação.

Os microrganismos considerados leveduras são encontrados nos filos Ascomycota e Basidiomycota. Geralmente são encontrados em folhas, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares, mas também podem ser isolados do ar, do solo, de águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações com insetos (KURTZMAN; FELL, 1998).

Como comentado, a reprodução assexuada pode ocorrer por brotamento ou por fissão (Figura 3). As leveduras de fissão são alongadas e se reproduzem por divisão transversal. A célula-mãe se alonga, divide o núcleo, com uma parede transversal (septo) próximo a uma região celular mediana, separando a célula mãe em duas células-filhas uninucleadas. Este septo é formado por um crescimento anular começando na parede e continuando até a divisão. A nova parede se espessa antes da separação das células-filhas (SRIPROMRAK, 2006).

Nas leveduras que se reproduzem por brotamento, o protoplasma celular é coberto por uma fina membrana, que é empurrado para fora da parede celular na forma de um novo broto, gerando uma célula filha. O broto aumenta até que é separado por uma constrição na base da célula mãe. Sob algumas condições, os brotos não se separaram da célula-mãe o que forma uma cadeia ramificada denominada pseudomicélio. Durante o processo de brotamento, o núcleo se divide, sendo que um núcleo da célula filha passa para o broto, e a parte restante para a célula mãe. As leveduras mais conhecidas que se reproduzem por brotamento são as da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (GLAZER; NIKIDO, 1995).

Já na reprodução sexuada, a união sexual realiza-se entre duas células somáticas ou entre dois ascósporos que assumem a função de gametângios, unindo-se e formando uma célula zigoto. Eventualmente forma-se um asco, que contém ascósporos, e seu número é dependente do número de divisões nucleares que ocorrem e resultam no desenvolvimento dos núcleos. Quatro ou oito ascósporos por asco são os números usuais, mas outras contagens também podem ser encontradas (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Com relação ao tamanho da célula, este é variado, mas em uma cultura jovem o tamanho da célula pode ser bem uniforme em algumas espécies ou extremamente heterogêneo em outras. De uma maneira geral as leveduras industriais variam consideravelmente no que se refere às suas dimensões, com limites desde 1 a 5 μm de largura e 5 a 30 μm de comprimento (PELCZAR Jr. et al., 2005).

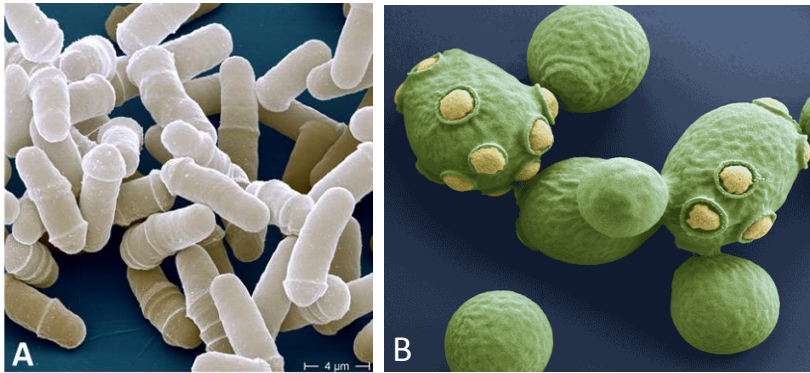


Figura 3. Exemplos de reprodução assexuada por fissão (A) e brotamento (B) (A extraída de www.mpg.de, B extraída de www.microbiologyonline.org.uk).

Com relação às diferenciações na análise da morfologia macroscópica das colônias pode-se observar diferenças quanto a forma, sendo essas circulares ou irregulares. Estas formas irregulares possuem uma peculiaridade, pois apresentam bordas não definidas e onduladas. A segunda característica é com relação ao tamanho das colônias, podendo ser grandes com até 5 mm, médias, de 2 a 5 mm, ou pequenas, com até 2 mm. Já com relação a superfície essas podem ser de quatro tipos: com estrias concêntricas, estrias radiais, vales radiais ou com aspecto granuloso como indicado na Figura 4 (MOREIRA et al., 2010).

Cada uma dessas apresenta-se diretamente ligadas ao formato da borda da colônia sendo que estes podem ser apresentados como borda lisa, franjeada, ondulada, pregueada, cremada, lobulada e filamentosa (Figura 4).

Seguindo com as diferenciações, outra condição é a forma celular (MOREIRA et al., 2010). Salienta-se que se uma determinada forma de célula é característica de uma dada espécie ou gênero. Isto não significa que todas as células apresentarão aquela forma em uma população de leveduras, mas pelo menos em um determinado período do desenvolvimento. Em certos cultivos essas formas podem ser consideradas contaminações, pois as células de leveduras podem ser elipsoides, globosas, cilíndricas, apiculadas, ou até triangulares (Figura 5).

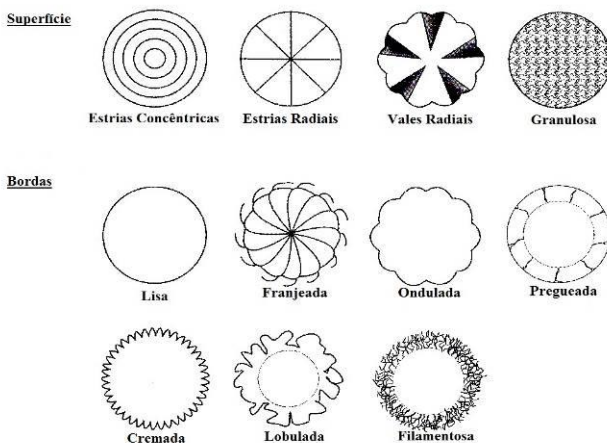


Figura 4. Tipos de superfícies e bordas de colônias de leveduras comuns no processo de isolamento (MOREIRA et al., 2010).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

2.4.1 Caracteres morfo-fisiológicos

O primeiro modelo de classificação taxonômica das leveduras descrito foi baseado nas suas características sexuais (Ascomicetos ou Basidiomicetos) ou a falta da fase sexuada no ciclo vital (antigo grupo dos Deuteromicetos). As subdivisões taxonômicas (classe, ordem, família, gênero e espécie) são baseadas em vários critérios morfológicos, fisiológicos e genéticos (PRETORIUS et al., 1999).

Com relação a esse modelo, a evolução da classificação de espécies para o gênero *Saccharomyces* mudou muitas vezes desde o início dos estudos taxonômicos. Atualmente, as espécies de *Saccharomyces* são divididas em três grupos. O primeiro grupo, *Saccharomyces sensu stricto*, é formado por *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus*. O segundo grupo, *Saccharomyces sensu lato*, é composto pelas espécies *S. exiguus*, *S. castelli*, *S. servazzii* e *S. unisporus*. O terceiro grupo inclui apenas a espécie *S. kluyveri*. Apenas o primeiro grupo é composto por espécies com interesse enológico, sendo elas *S. cerevisiae* e *S. bayanus* (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000).

Os métodos convencionais de identificação e caracterização de leveduras, baseados em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, continuam a ser utilizados taxonomicamente. As características morfológicas relacionam-se com a reprodução sexuada e

vegetativa, e com o crescimento micro e macroscópico. Quanto às fisiológicas, incluem a fermentação de açúcares, a assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, necessidades vitamínicas, temperatura máxima de crescimento, resistência à cicloheximida, entre outras. Porém, os métodos convencionais para a identificação das leveduras requerem uma avaliação de aproximadamente 80-100 testes, resultando num processo complexo, muito laborioso e um excessivo consumo de tempo. Além disso, a fragilidade da classificação de leveduras baseada exclusivamente nestes testes tem sido posta em evidência há algum tempo (TEIXEIRA, 2011).



Figura 5. Tipos de formas de células de leveduras (MOREIRA et al., 2010).

Já quando a classificação é feita através das vias bioquímicas, essas podem ser reguladas em vários níveis podendo incluir-se a síntese enzimática (indução e repressão de genes), a atividade enzimática (ativação alostérica e inibição de isoenzimas) e a distribuição celular (localização na mitocôndria das enzimas respiratórias) nas leveduras (WALKER, 1998).

Durante o processo fermentativo, as leveduras podem ser divididas em três grupos de acordo com as suas capacidades de fermentação de açúcares. O primeiro grupo é das leveduras com um metabolismo fermentativo dominante (fermentativas obrigatórias), que são espécies que fermentam monossacarídeos como a glicose e dificilmente toleram substratos não-fermentativos. O segundo grupo, são as leveduras com metabolismo misto (fermentativas facultativas). Essas, por sua vez, podem ser divididas em dois sub-grupos: leveduras sensíveis à glicose (Crabtree positivas), como é o caso da levedura *S. cerevisiae* e leveduras não sensíveis à glicose (Crabtree negativas), como é o caso de *Candida utilis* e *Kluyveromyces marxianus*. Enfim, o terceiro grupo que engloba as leveduras oxidativas (não fermentativas).

Algumas leveduras, como é o caso de linhagens de *Rhodotorula*, não são capazes de realizar a fermentação alcoólica devido à incapacidade de sintetizar enzimas indispensáveis na via fermentativa (PINHEIRO, 2004).

Além dessas classificações usuais salienta-se que novas outras ferramentas são utilizadas para tal função, como a análise de perfis de DNA e o sequenciamento do material genético das leveduras, que geram grupos taxonômicos específicos. Todas essas condições de divisão taxonômica, tanto por características morfofisiológicas, capacidades bioquímicas e biomoleculares, influenciam na seleção de um microrganismo para a fermentação.

2.4.2 Caracteres moleculares

Atualmente, além dos testes fisiológicos e microbiológicos, técnicas de análise molecular como cariotipagem, análises de DNA ribossômico (rDNA) e mitocondrial têm sido utilizadas com o objetivo de estreitar o conhecimento acerca da identificação e separação de linhagens de leveduras. Esses métodos permitem uma distinção mais precisa, uma vez que a sistemática baseada em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos provou nem sempre ser adequada para a caracterização de espécies, principalmente em grupos de leveduras de perfil nutricional restrito, como é o caso do gênero *Saccharomyces* (COTTRELL et al., 1986).

Dentre as técnicas moleculares mais empregadas para a caracterização de espécies leveduriformes, aquelas que se baseiam na restrição enzimática do DNA genômico têm se destacado entre as mais eficientes. Dentre elas, as técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) estão entre as mais difundidas uma vez que são de fácil utilização e apresentam resultados confiáveis (MOREIRA et al., 2010). Um exemplo do emprego desta técnica para estudos dessa natureza é a ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Essa técnica é baseada em padrões de restrição enzimática usando enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do rRNA que reflete padrões filogenéticos (SUÁREZ et al., 2008). Essa metodologia tem sido muito empregada uma vez que é útil para uma rápida análise da diversidade genética de populações. Estes métodos fornecem *fingerprints* distintos dependentes da composição das espécies das comunidades estudadas e

permitem análises comparativas entre as populações (MOREIRA et al., 2010).

Segundo Vicenti (2007), essas técnicas têm sido empregadas tanto no meio acadêmico como na indústria, tendo como objetivo central identificar indivíduos associados a processos fermentativos diferenciados. Sua detecção, normalmente, pode ser feita através de técnicas como as de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Neste contexto, procedimentos como esses têm sido utilizados para caracterizar e estudar a diversidade específica de leveduras fermentativas, como aquelas empregadas na produção de sidras (VICENTI, 2007).

Regiões como as do RNA ribossômico 5S, 5.8S, 18S e 25 S e as regiões não codificadoras IGS (*Intergenic Spacer*) e ITS (*Internal Transcribed Spacers*) são particularmente úteis para a detecção e caracterização de células leveduriformes (TOSTA, 2004). As regiões ITS são importantes, pois até onde se conhece, apesar de serem transcritas não são processadas, e sofrem mutações constantes durante o processo evolutivo, servindo, dessa forma, como estrutura informativa para a classificação intraespecífica de indivíduos de uma população ou comunidade (FUNGARO, 2000).

O fato das regiões ITS serem relativamente curtas, entre 500 a 800 pb, e aparecerem em grande número de cópias no genoma de um indivíduo, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com certa facilidade, possibilitando seu emprego nos estudos que avaliam a diversidade de espécies de uma determinada população. Um modelo representativo dessa região pode ser visto na Figura 6.

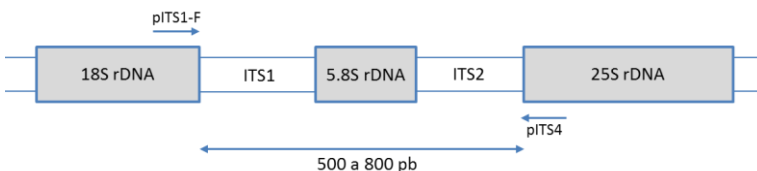


Figura 6. Diagrama mostrando a localização da região ITS ancorada entre as regiões codificadoras das subunidades maior (25S rDNA) e menor (18S rDNA) dos ribossomos. As setas menores indicam a posição aproximada da ancoragem dos iniciadores (*primers*) pITS1-F e pITS4 enquanto a seta maior indica o fragmento de amplificação da porção representada pelo ITS.

Análise destas regiões espaçadoras do rDNA e estudos comparativos de seqüências de nucleotídeos de genes do rDNA, através da técnica como a ARDRA, têm sido utilizados para avaliar diferenças

entre grupos filogenéticos, efetuando avaliações em vários níveis de classificação, até mesmo em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (JIMENEZ-CLEMENTE et al., 2004).

Outros métodos moleculares mais refinados envolvem o sequenciamento completo do rDNA do microrganismo de interesse. Entretanto, este processo é constitutivamente mais oneroso, especialmente quando uma grande quantidade de linhagens é avaliada, o que muitas vezes inviabiliza o processo (SUÁREZ et al., 2008).

Dessa forma, a utilização de ferramentas moleculares para a detecção e identificação de leveduras e outros microrganismos é essencial, uma vez que avaliar aspectos como dispersão e sobrevivência de comunidades específicas torna-se extremamente difícil quando se aplicam técnicas menos informativas (MOREIRA et al., 2010).

2.5 A SIDRA DE MAÇÃ

A fermentação do suco de maçãs para a produção de sidra é uma das formas mais antigas e tradicionais de produção de bebidas. De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2009), sidra é a bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã, podendo ser adicionada de suco de pera, em proporção máxima de trinta por cento, e sacarose não superior aos açúcares da fruta.

Sua produção é um processo complexo, no qual ocorrem dois estágios consecutivos: primeiramente o consumo do açúcar pelas leveduras gerando etanol e CO₂ e, na sequência, a descarboxilação do ácido málico em ácido lático e CO₂, evento mediado por bactérias maloláticas. O método tradicional de produção consiste na fermentação natural do suco de maçã efetuado por leveduras e por bactérias autóctones, ou seja, associadas às frutas ou aos equipamentos do processamento. Essa fermentação é um processo imprevisível no que diz respeito à formação de compostos desejáveis responsáveis pelo *flavor* da sidra (HASHIZUME, 1993).

A microbiota descrita como naturalmente associada ao processo de produção de sidras é representada por linhagens de leveduras como *Hanseniaspora valbyensis*, *Hansenula* spp., *Metschnikowia pulcherrina*, *Pichia* spp., *S. cerevisiae* (var. *uvarum*) e *Torulopsis* spp., além de bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus* spp., *Oenococcus oeni* e *Pediococcus* spp. Além dessas, ainda podem participar certas espécies bacterianas designadas como bactérias ácido-acéticas, tais como

Acetobacter aceti, *A. pasteurianus*, *A. schützembachii*, *A. xylinum* e *Gluconobacter oxydans* (BEECH; CARR, 1977).

Todas essas linhagens contribuem em diferentes etapas da fermentação. O perfil organoléptico da sidra após a fermentação espontânea é muito variável e depende de fatores como a população relativa de cada espécie microbiana associada à fruta e aos equipamentos, das condições de colheita da maçã, do pré-tratamento do suco de maçã (adição de sulfito, clarificação com enzimas pectinolíticas, etc) e da temperatura do suco no início da fermentação (FLEET et al., 1984).

2.5.1 Compostos aromáticos da sidra

O *flavor* ou aroma da sidra é gerado por uma série de compostos aromáticos e voláteis reconhecidos pelos seus caracteres organolépticos únicos. Esses podem ser constituídos de moléculas orgânicas de baixo peso molecular (inferiores a 400 Daltons), geralmente formado por aldeídos, álcoois superiores, ésteres, terpenos, ácidos e compostos fenólicos que promovem aromas “frutados e florais”, produzidos pela fermentação realizada por leveduras selvagens. Esse é um atributo desejado e procurado pelos consumidores, por conferir sensações agradáveis como o amargor e a adstringência do produto. Tais características distinguem essa bebida, reconhecida mundialmente como um dos melhores produtos oriundos do processo fermentativo (CARVALHO et al., 2010).

Semelhante à produção de vinho, algumas sidras são caracterizadas a partir da acidez e adstringência ocasionada pela mistura de determinadas variedades de maçãs. Entretanto, a maioria decorre do processo de fermentação e suas concentrações são essencialmente dependentes das leveduras que predominam durante a fermentação e as condições em que a fermentação se realiza. A temperatura da fermentação desempenha um papel particularmente importante, uma vez que sidras mais aromáticas são produzidas quando o processo é realizado a temperaturas próximas ou abaixo de 15 °C (BAUER; PRETORIUS, 2000).

A característica dos diferentes aromas da sidra tem relação direta com o inóculo utilizado. A inoculação de leveduras isoladas em habitat natural confere características distintas ao produto que àquelas obtidas a partir de leveduras comerciais do suco da maçã. A quantidade produzida de compostos fenólicos é variável, o que muitas vezes não atende às

necessidades de empresas para a criação de sidras com aromas particulares (CHIQUETTO, 2004).

Os principais grupos de compostos aromáticos derivados de metabolismo de leveduras são os ácidos orgânicos, álcoois superiores, ésteres, e, em menor extensão, aldeídos. Alguns dos compostos resultantes de metabolismo têm uma contribuição negativa, como é o caso do acetaldeído, do ácido acético, acetato de etila e alguns álcoois superiores, quando presentes em concentrações elevadas e, em particular, compostos reduzidos de enxofre, sulfatos orgânicos e tióis (RAPP; VERSINI, 1991).

Os aromas voláteis como os hidrocarbonetos, aldeídos e alcoóis são interessantes por seu aroma floral, a maioria associado com a qualidade da sidra. Além disso, outras análises como o do ponto de maturação da maçã permite definir o melhor processo de fermentação da sidra para sua máxima valorização.

Com isto, cada vez mais a aceitação e consolidação de uma bebida fermentada está diretamente vinculada ao seu sabor. O sabor, por sua vez, é a resposta integrada ao gosto (doce, salgado, amargo, ácido) e ao aroma, dada pela presença de numerosos compostos voláteis (GARRUTI, 2001).

2.6 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE SIDRA

2.6.1 Influência do sulfeto de hidrogênio

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é uma substância corrosiva, venenosa e gasosa no seu estado natural. Quando em solução aquosa é chamada de ácido sulfídrico. Tem sido descrito como uma ocorrência comum na produção de bebidas fermentadas sendo que nas condições de produção da sidra, a produção de sulfeto de hidrogênio devem ser uma das primeiras características a ser observadas nas leveduras isoladas, uma vez que sua presença a desqualifica para uso na produção de bebidas, pois agrega odor e sabor desagradáveis (GUIMARÃES, 2006).

A via metabólica de produção de H_2S nas leveduras é a da redução do sulfato, o qual gera sulfureto de hidrogênio que também produz muitos intermediários tóxicos. Ao mesmo tempo, os produtos finais dessa via são essenciais para a tolerância ao etanol e na manutenção do estado redox da célula, que são dois problemas críticos de estresse na levedura durante as fermentações (LINDERHOLM et al., 2005).

Na fermentação alcoólica das bebidas, certos fatores nutricionais têm sido associados com a produção de compostos voláteis de enxofre, tais como níveis de enxofre elementar, presença de dióxido de enxofre, compostos orgânicos contendo enxofre, limitação de nitrogênio, e deficiência de vitamina no mosto. No entanto, o efeito destas variáveis é dependente das condições de crescimento (NICKERSON, 1953).

Dentro dessas condições de crescimento, existem relatos que os níveis de produção de H_2S variam drasticamente em certas linhagens e que ainda sugerem diferenças nas regulações das enzimas internas e concomitante aumento de produção de H_2S . Com as flutuações nos níveis de H_2S torna-se mais difícil aprimorar recomendações e garantias para prevenção na sua produção (NICKERSON, 1953).

Entre os muitos métodos propostos para a análise da capacidade de produção do H_2S , utiliza-se com frequência o método proposto por Nickerson (1953) para detecção de redução de sulfito em *Candida*. Esse método foi utilizado por Zambonelli (2003) para identificação de linhagens de *S. cerevisiae* deficientes na atividade da enzima sulfito redutase e mais tarde foi validado como uma metodologia rápida para a seleção de linhagens para uso vinícola (JIRANEK et al., 1995). O método consiste na transferência das linhagens através de estrias para meio BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) seguindo-se de incubação por 48 horas a 28°C. Após este período, as estrias das colônias são observadas quanto à coloração. As estrias que resultam na cor branca são identificadas como sendo de linhagens H_2S negativas e as estrias enegrecidas, de linhagens H_2S positivas (GUIMARÃES, 2006). Metais presentes no meio combinam-se com o H_2S formando sulfuretos insolúveis e escuros.

2.6.2 Influência do etanol

O acúmulo de etanol no ambiente fermentativo representa uma das formas de estresse químico de grande importância e vários estudos relatam a membrana plasmática como o alvo fundamental da sua ação nestas situações (DORTA, 2006). Além disso, a tolerância ao etanol em leveduras tem sido relacionada à capacidade das células em modificar sua composição lipídica para responder ao efeito provocado por esta substância (PINA et al., 2004). Vários parâmetros fisiológicos permitem que o gênero *Saccharomyces* domine a fermentação de suco de maçãs, mas a tolerância a alta concentração de etanol é a principal característica que permite sua sobrevivência neste ambiente específico.

Como o etanol é o principal produto metabólico convertido durante a fermentação de açúcares por leveduras, algumas linhagens podem permanecer viáveis e metabolicamente ativas em meio com até mais de 18 % (V/V). Por outro lado, em fermentações de certas bebidas, o aumento nas concentrações desse metabólito podem inicialmente ser inibitórios e, posteriormente, letais para as leveduras, podendo afetar a viabilidade celular e os parâmetros da fermentação (GUIMARÃES, 2006).

As alterações na permeabilidade da membrana plasmática também causam um maior influxo de prótons na célula que dissipa a força próton-motriz usada para o transporte de aminoácidos para dentro da célula. Para regular o pH citoplasmático as bombas de prótons via ATPase das células fazem a introdução simultânea dos aminoácidos e prótons (HALLSWORTH, 1998). Essa perda na funcionalidade dos sistemas de transporte em última análise contribui para uma diminuição da viabilidade celular.

2.6.3 Influência do pH

Baixos valores de pH na fermentação podem ser interessantes para o controle microbiológico de contaminantes. No suco de maçã restituído a partir do suco concentrado, o pH encontra-se entre 3,4 a 3,8, condição essa que se diminuída pode ser adversa para a adaptação de crescimento da levedura.

Os agentes contaminantes como as bactérias são menos resistentes ao pH baixo e tem menor velocidade de crescimento que as leveduras em tal situação. Enquanto que para as bactérias lácticas o pH ideal é na faixa de 6,0, a levedura *S. cerevisiae* apresenta um bom rendimento na produção alcoólica em pH acima de 3,8 (DORTA, 2006).

No processo fisiológico relacionado a tal característica, a enzima H⁺-ATPase da membrana plasmática é controlada através da bomba de prótons. Tal enzima regula o pH intracelular e promove a força proto-motora. Uma característica marcante dessa enzima é o fato de ser ativada em presença de glicose, o que causa a acidificação interna aumentando o nível de sua atividade em células de leveduras. Para evitar que seu pH se torne muito ácido, a levedura libera H⁺ para o meio externo através da ativação de H⁺-ATPase, além de absorver K⁺ e aminoácidos básicos, excretar ácidos orgânicos e liberar gás carbônico (DORTA, 2006).

A H⁺-ATPase citoplasmática sofre alterações conformacionais em função de H⁺, assim, em pH igual a 4,0 triplica sua atividade,

dobrando a afinidade por ATP, sem porém, causar mudanças no pH ótimo. Quando o pH diminui de 6 para 3, existe um aumento da sensibilidade da levedura ao etanol, dissipando a força próton-motiva da membrana. Quando a célula sofre um dano metabólico a H⁺-ATPase presumivelmente a ajuda ativando a força proton-motora através da membrana plasmática com o gasto de ATP (DORTA, 2006).

Já a concentração de íons de hidrogênio tem uma influência significativa nas fermentações industriais devido tanto a sua importância no controle da contaminação bacteriana, quanto ao efeito sobre o crescimento das leveduras, nas velocidades de fermentação e formação de subprodutos. O melhor rendimento em etanol é geralmente obtido em pH 4,5-4,7. Em pH mais elevado, mais glicerol e ácidos orgânicos são formados a custa de etanol (WAYMAN; PAREKH, 1990). Quando a diferença entre o pH extracelular e intracelular aumenta, maior estresse é colocado sobre as células e mais energia é gasta para manter o pH intracelular dentro do intervalo que permite o crescimento e sobrevivência da levedura.

Uma quantidade maior de glicose é convertida a etanol se o pH do meio for ajustado a 4,5. Se o pH é ajustado para 7 ou acima, o ácido acético é produzido a partir de acetaldeído, devido ao aumento da atividade da aldeído desidrogenase devido à produção de glicerol que inibe a fermentação etanólica (WANG et al., 2001).

No processo com reutilização da levedura, nos mostos industriais, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante uma a duas horas, visando à redução da carga microbiana. Dessa forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (PACHECO, 2010). Além disso, em alguns trabalhos com fermentações em baixos pH, cita-se a diminuição da expressão de fatores proteicos denominados “fatores *killers*” (WOODS et al., 1968), os quais seriam importantes para leveduras iniciadoras.

2.6.4 Influência da temperatura

Dentre as qualidades físico-químicas, a temperatura é um dos parâmetros mais importantes e discutidos durante o crescimento e comportamento das leveduras ao longo da fermentação alcoólica, influenciando diretamente o desenvolvimento de diferentes espécies, a duração de fermentação e os produtos de seu metabolismo, como a formação de metabolitos secundários (glicerol, ácido acético e ácido succínico) (TORIJA et al., 2003).

Embora a maioria de trabalhos demonstrem ênfase e interesse industrial pela termotolerância em condições de elevada temperatura de crescimento (30 a 55 °C), muito pouco é descrito no que diz respeito a condições de fermentações em baixa temperatura (10 a 15 °C), e a influência na composição final de bebidas alcoólicas como a sidra, embora muitos outros demonstrem tal influência na produção de vinhos.

Como as leveduras são organismos mesófilos, a fermentação pode ocorrer dentro de uma faixa de 10 até 35 °C. Neste intervalo, quanto maior a temperatura maior será a velocidade do processo fermentativo, sendo também maior a formação, transformação e degradação de produtos secundários (MASSAGUER, 2005).

Quando resfriada a temperaturas inferiores a 20 °C, a célula experimenta uma resposta de estresse específica em grandeza e duração. Essa resposta ao frio não é tão conservada como a resposta de choque de calor e também mal caracterizada para leveduras (AGUILERA et al., 2006).

O efeito da temperatura, assim como o do etanol e pH, é principalmente sobre a membrana plasmática. A exposição a altas temperaturas resulta no aumento na permeabilidade da membrana, enquanto temperaturas mais baixas resultam em diminuição da permeabilidade da membrana (FAIRBAIRN, 2012). Consequentemente, células fermentando a baixas temperaturas são menos suscetíveis a exposição ao etanol do que aquelas em fermentação em altas temperaturas.

No entanto, com a permeabilidade da membrana reduzida, esta também dificulta o transporte de nutrientes essenciais por proteínas transmembranares para a célula. Estudos têm demonstrado que a baixa temperatura aumenta a duração da fermentação devido a um declínio na atividade metabólica e, consequentemente, uma redução da produção de biomassa de levedura (HAZEL, 1995; LLAURADÓ, 2002).

O principal mecanismo de tolerância a baixas temperaturas pode ser compreendido pela adaptação das células que tentam manter um nível constante de fluidez da membrana. Nos estágios iniciais dessa adaptação, a célula estabiliza a membrana, aumentando o grau de insaturação de ácidos graxos e aumentando a permeabilidade, diminuindo o comprimento das cadeias de ácidos graxos (FAIRBAIRN, 2012). Além disso, a baixa temperatura provoca a formação de estruturas secundárias nas moléculas de RNA, reduzindo a eficiência da tradução. A célula reconhece isso aumentando a expressão de genes envolvidos em proteínas ribossômicas, de transcrição e tradução do RNA (AGUILERA et al., 2006).

Um estudo comparando os padrões de expressão durante o curso de fermentações conduzidas entre 13 e 25 °C relata o aumento da expressão de genes associados com a permeabilidade da membrana em 13 °C em relação a 25 °C durante as fases iniciais da fermentação. Por outro lado, durante os últimos estágios da fermentação, o nível de expressão dos genes associados com a permeabilidade da membrana foi maior em 25 °C que em 13 °C (BELTRAN et al., 2008).

Em temperaturas elevadas (termotolerantes), a resposta se caracteriza pela maior capacidade de síntese de proteínas de choque térmico (HSPs), que atuam como chaperonas na tentativa de sequestro e remoção de proteínas danificadas ou incorretamente conformadas nas células de leveduras (LINDQUIST; KIM, 1996).

No que diz respeito às criotolerantes, além das proteínas HSPs, esta adaptação também pode ser adquirida através de vários mecanismos fisiológicos como a produção de trealose, água intracelular não congelável, retenção do ciclo de divisão celular na fase G, fosforilação independente de AMP cíclico e atividade da H⁺-ATPase membranar (COOTE et al., 1991). A tolerância a baixa temperatura caracteriza-se também pela síntese de trealose e fosfolípidios, indução de resposta ao estresse oxidativo e síntese de manoproteínas na parede celular durante os últimos estágios de choque ao frio (SCHADE et al., 2004).

Na produção da sidra, em temperaturas entre 7 °C a 15 °C, as fermentações são mais longas, permitindo a formação de aromas mais frutados e sua maior retenção, além de formação de pequenas e desejáveis bolhas denominadas tecnicamente de *perlage* (NOGUEIRA et al., 2003).

As temperaturas baixas de 10 °C até 15 °C podem ser usadas em fermentação alcoólica para aumentar a produção e retenção dos constituintes do aroma, porém, essas temperaturas não são comumente usadas em fermentações vinícolas devido aos rígidos efeitos sobre o crescimento e a atividade das leveduras e conseqüente aumento no tempo de processo bem como ao custo dos equipamentos com controle de temperatura (MASSAGUER, 2005).

O efeito da temperatura em relação aos parâmetros analíticos de produção de etanol, ácido acético e glicerol e em relação à viabilidade das leveduras, demonstra que as fermentações em baixas temperaturas podem induzir uma finalização demorada do processo e parada nas fermentações (*stuck fermentation*) com grandes quantidades de açúcares residuais (GUIMARÃES, 2006). A fermentação pode retornar posteriormente com efeitos indesejáveis.

2.6.5 Osmotolerância

De uma maneira geral as leveduras se encontram em condições de crescimento desfavoráveis para sobrevivência quando essa passa a ser analisada pela sua capacidade de suportar pressões osmóticas elevadas. O estresse osmótico provoca respostas celulares complexas que vão desde o ajuste da ativação celular, a proliferação de cascatas de sinalização, o aumento dinâmico de localização de proteínas intracelulares, modificações do citoesqueleto, controle da morfogênese, acondicionamento do programa de expressão de genes ao nível da transcrição e tradução, até um amplo ajuste no metabolismo celular (HOHMANN et al., 1997).

O estresse osmótico é uma condição desfavorável para as células, ocorrendo no início da fermentação, devido à alta concentração de açúcares do mosto. Quando as leveduras são expostas a choque hiperosmótico, a perda de água citoplasmática ocorre e diversos mecanismos são iniciados para contrapor-se a desidratação da célula, protegendo as estruturas celulares.

Especificamente nas fermentações que ocorrem tanto em frutas no campo e ao longo do processo de fermentação alcoólica nas bebidas, existem duas formas de "resposta" que podem ser aplicadas para qualquer espécie de levedura após a exposição ao estresse osmótico: a osmo-tolerância e a osmorregulação.

A osmotolerância pode ser definida como a resistência inata em resposta à pressão ambiental hiperosmótica, e representa o mecanismo pelo qual as células mantêm a viabilidade na presença de altas concentrações de compostos inorgânicos. A osmotolerância intrínseca de linhagens de leveduras de sidra tem recebido pouca atenção, apesar do reconhecimento dessa forma de estresse dentro do processo (GIBSON et al., 2007).

Já a osmorregulação é dependente da capacidade desses organismos de detectar os estímulos externos e gerar alterações na fisiologia, bioquímica e outras funções celulares para suas necessidades. No geral, representa os processos pelos quais as células ajustam a sua fisiologia normal, a fim de sobreviver (e não proliferar) em condições de níveis baixos de umidade e água (POOLMAN; GLAASKER, 1998).

Em muitos casos, tanto na osmotolerância quanto na osmorregulação, está envolvida o acúmulo de um ou mais tipos de molécula osmoprotetora no interior da célula, a fim de aumentar o potencial osmótico intracelular, impedindo a perda de água celular. Como componente fundamental, o glicerol é o composto secundário formado na mesma via de síntese do etanol, competindo com esse,

motivo pelo qual sua produção é inversamente proporcional à do etanol, causando redução na eficiência fermentativa quando o objetivo é a produção de álcool. A formação de glicerol é dependente de diversos fatores como o tipo de levedura, a pressão osmótica do meio, a formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) e a velocidade de crescimento da levedura. O tipo da levedura influencia a produção de glicerol, na medida em que esta é uma característica genética (GUIMARÃES, 2005). A espécie *Debaryomyces hansenii*, por exemplo, acumula o glicerol que produz, enquanto que *S. cerevisiae* acumula, mas também o excreta. A quantidade de açúcar desviado para a formação de glicerol varia até mesmo em nível de linhagens (HOHMANN et al., 1997).

Na condição de redução hídrica, muitas leveduras têm capacidade, de reter e ou induzir a síntese de glicerol, a fim de controlar o potencial intracelular do meio e, assim, controlar o efeito deletério da desidratação da célula (Figura 7). As mudanças na pressão osmótica externa da célula induzem mudanças correspondentes na expressão de certos genes, os quais estão envolvidos no controle dos níveis de solutos como o glicerol (GUIMARÃES, 2006).

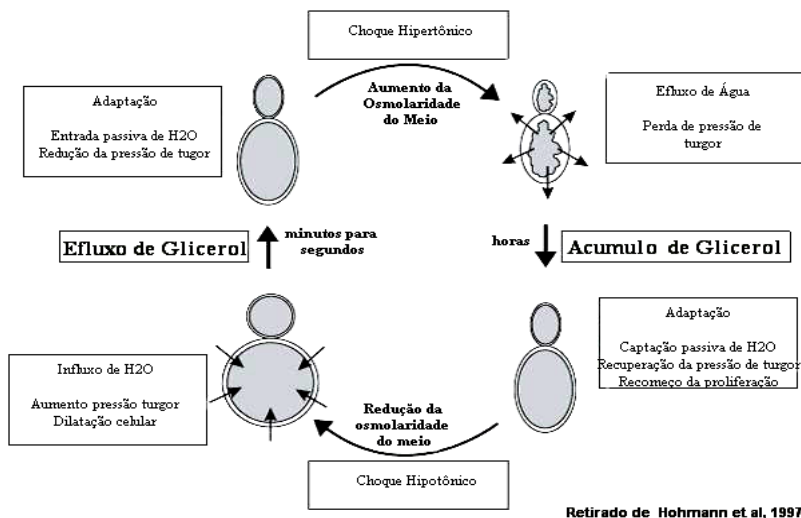


Figura 7. Efeitos do estresse osmótico na célula de levedura (modificado de HOHMANN et al., 1997).

Com relação ao efeito do estresse salino na resistência ao etanol, em *S. cerevisiae*, existem relatos que as células crescidas sob condições

hipersalinas apresentam um aumento na concentração de trealose. Isso pode contribuir para a sobrevivência das células sob condições estressantes e, assim, potencializar a capacidade das leveduras de resistir a concentrações tóxicas de etanol (PINHEIRO, 2004).

Em condições de laboratório a condição de estresse osmótico pode ser simulada pela adição de NaCl ou sorbitol ao meio de crescimento. Cabe ressaltar que o Na⁺ causa toxicidade, além do estresse osmótico. Existem também meios de cultura que desestabilizam o efluxo hídrico e agregam a condição de estresse (PINHEIRO, 2004).

2.6.6 Floculação

Com o objetivo de melhorar o desempenho das fermentações, aumentando a densidade celular no interior dos fermentadores e diminuir os custos de produção, grupos de pesquisa conseguiram selecionar linhagens de leveduras que desempenham papel diferenciado no processo de fermentação do álcool. Essas são ditas “leveduras floculantes” e têm a habilidade de se agregarem espontaneamente e formar flocos. Em processos de produção de álcool, após transformar os açúcares presentes no caldo da cana, as leveduras podem se agregar em forma de flocos e se concentrar no fundo do reator (PACHECO, 2010).

Segundo Alves e colaboradores (2011), a floculação de leveduras é um fenômeno que se caracteriza pela adesão entre as células formando aglomerados, finalizando numa sedimentação destes flocos em meios onde anteriormente encontravam-se em suspensão. Esse fenômeno acontece normalmente com as leveduras em condições de estresse, que afeta a composição e morfologia da parede celular. Alguns fatores de estresse promotores de floculação incluem a diminuição da quantidade de nutrientes e condições de temperatura, pH e oxigênio não adequados ao crescimento (VERSTREPEN et al., 2003).

Certas linhagens de leveduras utilizadas na produção de bebidas fermentadas como a *S. cerevisiae*, floculam espontaneamente no final da fermentação. Os flocos sedimentam no fundo do fermentador, e a maioria da biomassa pode então ser facilmente removida do mosto fermentado (SATO et al., 2001). A chamada floculação prematura dificulta a completa fermentação do substrato, enquanto que células que não floculam, no final do processo, requerem a utilização de centrifugação ou outras técnicas de separação para sua remoção.

Na tentativa de determinar e quantificar a capacidade floculante das leveduras, quatro parâmetros são tomados como base: a força de interação entre as células, a sua morfologia, a velocidade de

sedimentação e a quantidade de sedimento. Uma estimativa macroscópica do tamanho do floco também pode ser utilizada como um parâmetro de caracterização da floculação.

Um dos principais adjuvantes no processo de floculação é o cálcio. Por isso, a floculação de leveduras é classificada como cálcio dependente. O Ca^{2+} participa das interações entre as proteínas de superfície das células floculantes e os resíduos de açúcar, principalmente a cadeia de manose, na superfície de outras células, ajudando a manter a estabilidade das proteínas envolvidas na floculação (SATO et al., 2001).

Os métodos de avaliação qualitativa da floculação podem ser divididos em três grupos: sedimentação (HELMs *test*), observação direta da formação dos flocos no meio de cultura, e fermentação estática. Resumidamente, no primeiro modelo a cultura em análise é lavada com cloreto de cálcio e este mensurado em tubo de ensaio ou proveta, dependendo do volume. No segundo modelo, uma pequena quantidade de inóculo é colocada em 15 mL de meio de cultura, incubado a 25 °C e, após 72 horas, é observado a formação de flocos suspensos no meio após agitação. O terceiro método é feito durante o processo fermentativo, observando a formação dos flocos (RUSSEL; STEWART, 1998).

Em geral, a análise da floculação torna-se importante na seleção de leveduras para pesquisas relacionadas à fabricação de sidra e outros tipos de bebidas fermentadas, no que diz respeito à separação econômica das células do produto no final.

2.7 TOXINAS *KILLER*

As toxinas *killer* são proteínas ou glicoproteínas de baixa massa molar, que atuam sobre as células sensíveis de outros microrganismos sem o contato direto célula-célula, através de um mecanismo específico de ação, incluindo receptores de parede e membrana celular das leveduras sensíveis. Apesar dessas toxinas possuírem a capacidade de inibir outros microrganismos além das leveduras, não há ainda uma correta compreensão dos mecanismos de interação com procariotos ou outros eucariotos (FUENTEFRÍA, 2007).

O fenótipo *killer* foi observado pela primeira vez no ano de 1963 quando foi proposto que determinadas linhagens de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em um dos três fenótipos a seguir: *killer*, sensível e neutro. As linhagens *killer* tanto produzem o fator *killer* quanto resistem a ele. As linhagens neutras são insensíveis a um ou mais

fatores *killer* e não os produzem. As linhagens sensíveis são totalmente suscetíveis a essas toxinas, as quais causam inibição da síntese de macromoléculas e rompimento celular, provocando a morte da célula (TOSTA, 2004).

Embora o seu papel em ambientes naturais não esteja bem elucidado, essa toxina pode conferir uma grande vantagem competitiva com relação a leveduras sensíveis, podendo causar a eliminação de indivíduos ou populações sensíveis (FUENTEFRIA, 2007).

Quando presentes em condições industriais e seu crescimento não for controlado, certas espécies de leveduras fermentativas que têm um perfil estreito de assimilação de açúcares serão substituídas após alguns dias pelas leveduras *killers*, pois essas utilizam uma maior variedade de substratos, causando aumento na velocidade de fermentação, podendo diminuir a concentração de aromas (TOSTA, 2004).

Em seu ambiente natural as leveduras são afetadas pelo seu próprio metabolismo, que pode alterar vários fatores, incluindo nutrientes, pH, temperatura, produtos, e expressão de toxinas *killer*. Além do que já foi apresentado, a condição do pH do meio de cultura também afeta as proteínas *killer*. A atividade *killer* é expressa sob condições ácidas, usualmente pH 3 a 6, possuindo maior atividade em pH 4,5 (FUENTEFRIA, 2006).

É importante salientar que os mecanismos de produção e transferência (passagem da proteína de uma célula para outra) das toxinas *killer* são complexos por envolverem mecanismos de expressão gênica. Com relação a esses mecanismos, basicamente são conhecidas duas possibilidades para sua expressão. Uma delas está relacionada exclusivamente a genes cromossômicos, por exemplo, genes presentes nos cromossomos V e IX de algumas linhagens de *S. cerevisiae*. A outra possibilidade, de ocorrência mais frequente, envolve a combinação tanto de genes cromossômicos, como a de plasmídios citoplasmáticos, formados por fitas duplas de RNA ou dsRNA (*double strand RNA*) encapsulados, também denominados VLPs (*virus-like particles*) (TOSTA, 2004).

Como citado anteriormente, trabalhos evidenciaram que a atividade *killer* está relacionada diretamente com a presença de glucanas como receptores de membrana para essas toxinas, as quais são processadas e clivadas para a produção de um dímero α / β , que é a forma ativa da toxina, que é liberado no meio ambiente e captado por esses receptores (BRITES, 2003). A Figura 8 representa um esquema de transferência da toxina *killer* para estes receptores tipo glucana e seus agentes de expressão conhecidos como VLPs e genes MAK.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MEIOS DE CULTURA

Para o isolamento inicial e manutenção das culturas utilizou-se o meio de cultura YEPG (5 g de extrato de levedura, 10 g de peptona de soja, 20 g de glicose, 15 g de ágar, por litro) (MOREIRA et al., 2010).

Com a finalidade de isolamento e purificação das leveduras, inibindo o crescimento de bactérias, foi utilizada uma solução de cloranfenicol a 1% em água destilada estéril, sendo esta adicionada ao meio YEPG para obter a concentração final de 0,3 g L⁻¹. Este antibiótico é termorresistente e pode ser autoclavado junto com o meio (MOREIRA et al., 2010).

Para os testes preliminares da produção de sulfeto de hidrogênio, utilizou-se o meio LA (40 g de glicose, 5 g de extrato de levedura, 3 g de peptona, 0,2 g de sulfato de amônio, 1 g de acetato de chumbo, 20 g de ágar, por litro) (GUIMARÃES, 2005). Para a análise de osmotolerância, utilizou-se o meio Glicose 50% (500 g de glicose, 2,5 g de extrato de levedura, 13 g de ágar para 500 mL de água destilada).

Para a análise da presença de proteínas *killer* foi utilizado o meio formulado com tampão citrato-YEPG acrescido de solução de azul de metileno (BRITES, 2003). Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Meios prontos já em placas foram colocados em sacos plásticos e armazenados sob refrigeração (8 °C) até o momento do uso.

3.2 COLETA E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Foram visitados locais de plantio e estocagem das maçãs bem como áreas de seleção, lavagem e processamento e coletadas amostras de maçãs e folhas de macieiras durante o mês de Abril de 2011. As variedades de maçãs coletadas eram distintas de acordo com as seis diferentes propriedades de cultivo, localizadas entre as cidades de Urubici e São Joaquim, na rodovia SC-430, no estado de Santa Catarina (Figura 9).

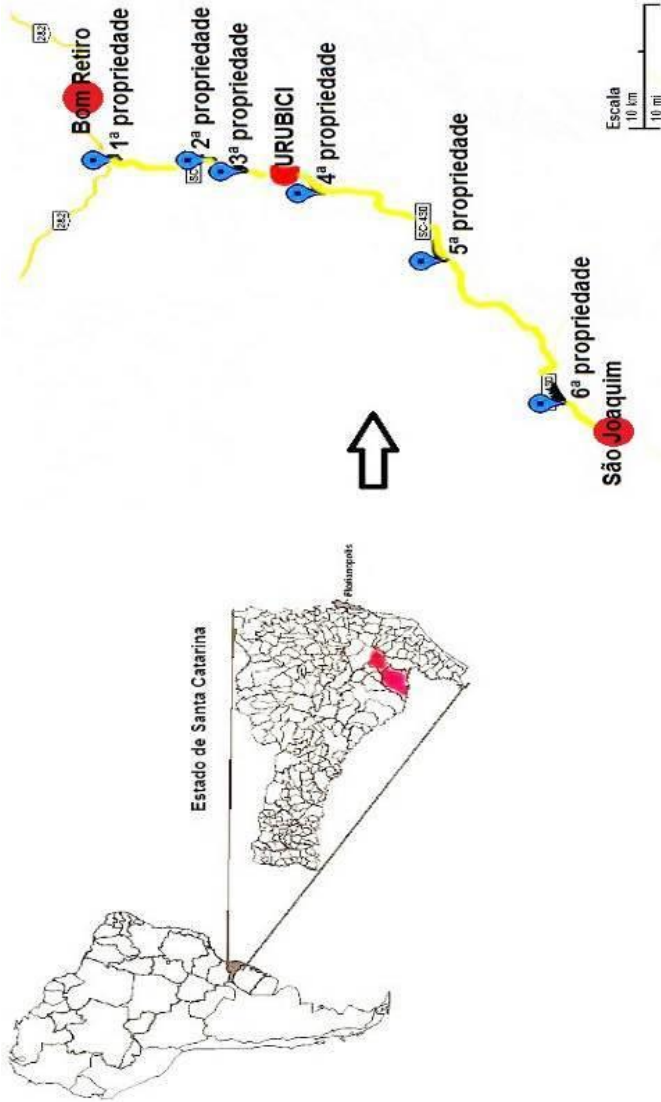


Figura 8. Áreas de coleta das amostras para isolamento de leveduras.

Figura 9. Áreas de coleta das amostras para isolamento de leveduras

A primeira propriedade foi a Frutícula Ipê Ltda (Grupo Agropel), localizada a 11 Km de distância da cidade de Bom Retiro, próximo à estrada de acesso à cidade de Urubici (SC-430) situada na coordenada geográfica (-27.838488, -49.569476). Essa propriedade produz as variedades Gala e Imperatriz, onde as macieiras possuíam onze anos de idade e passavam por tratamento de herbicida duas vezes ao ano. A segunda propriedade também localizada na SC-430 (-27.926265, -49.568574) faz parte de uma pousada ecológica da região (Kiriri-ete), onde se produzia a variedade Gala e as macieiras possuíam treze anos de idade. Nessa propriedade nenhum herbicida ou agrotóxico era utilizado para manutenção das plantas. A terceira propriedade (-27.957069, -49.583863) estava localizada em uma fazenda próxima à estrada de acesso à cidade de Urubici, onde essa produzia as variedades Gala e Fuji. A quarta propriedade visitada, localizada ao sul da cidade de Urubici (-28.028207, -49.61238), situava-se em um local ao lado de uma região turística de inscrições rupestres, sendo que eram produzidas as variedades Gala e Fuji. A quinta propriedade, localizada no distrito de Lajeado Liso ainda na SC-430 (-28.149503, -49.394531), foi a Frutícola Meyer, onde eram produzidas as variedades Gala, Fuji, Gold, Black-jon, Stark, dentre outras. Sob supervisão técnica as macieiras passavam por tratamento com fungicidas uma vez por semana e utilização de herbicida de quatro a cinco vezes por safra. Com relação à produção, a mesma era acondicionada e mantida em câmaras frias. Por fim, a sexta e última propriedade visitada foi a frutícola Pantera Ltda., localizada em São Joaquim (-28.252074, -49.890976), onde especificamente trabalhava-se com a lavagem, classificação, seleção e processamento das maçãs recebidas de produtores locais. Nessa unidade são processadas de cinco a seis mil toneladas ao ano, das variedades Gala e Fuji, e os danos ocasionados nas caixas que acondicionam as maçãs (*beds*) representam de 3 a 8 % por safra.

Após a coleta, folhas e frutos foram separados e macerados em solução salina estéril (0,85 % NaCl), e uma alíquota da solução semeada em placas de Petri com o meio de cultura YEPG (MOREIRA et al., 2010) e incubadas a 28 °C por 72 horas. Em seguida, colônias de leveduras escolhidas ao acaso eram confirmadas ao microscópio e posteriormente transferidas para novo meio para fim de isolamento. A transferência para meio novo foi realizada tantas vezes quanto necessário para se obter a cultura pura, fazendo uso de antibiótico cloranfenicol quando necessário. Não houve interesse em relacionar o isolado com a variedade da maçã ou folhas. Além desses, 19 outros

isolados foram fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI) de Videira – SC.

Com a finalidade de aumentar o número de leveduras para estudo, também foram isoladas leveduras a partir de maçãs adquiridas em distribuidoras de frutas em Florianópolis.

3.3 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

As culturas puras foram mantidas sob refrigeração (8 °C) em tubos Eppendorf, em triplicata, com meio YEPG. Além disso, também foram criopreservadas. Para isso, fez-se o crescimento com 1 mL de meio YEPG por 72 horas a 28 °C em agitador orbital, sendo na sequência centrifugados a 150 g, separando a biomassa do meio e adicionado 1 mL de glicerol a 15 % (V/V), identificados e mantidos em refrigerador a -20 °C e -80 °C (GUIMARÃES, 2005). Repiques para verificação de viabilidade foram realizados semestralmente e a pureza das culturas determinada através da coloração de Gram.

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Para análise morfológica as leveduras foram caracterizadas tomando-se como base os trabalhos de Moreira et al. (2010). Para tal, após o repique em meio YEPG pela técnica de esgotamento em estrias, as características celulares foram observadas pela análise do crescimento das UFC com o auxílio de lupa estereomicroscópica com aumento de até 30 X. Com relação às características macroscópicas as linhagens foram avaliadas em quatro aspectos: (i) forma da colônia, podendo ser esta circular ou irregular; (ii) tamanho e diâmetro da colônia, sendo este classificado em pequeno (2 mm), médio (2-5 mm) e grande (5mm ou maior); (iii) superfície celular das colônias, podendo ser com estrias concêntricas, estrias radiais, vales radiais ou granuladas; e (iv) bordas das colônias, sendo essas lisas, franjeadas, onduladas, pregueadas, cremadas, lobuladas e filamentosas.

Já com relação à análise das características microscópicas, as linhagens foram avaliadas com a confecção de lâminas a fresco das leveduras, observadas em microscópio óptico no aumento de 400 x e caracterizadas de acordo com a terminologia comumente referenciada às células leveduriformes, tais como: forma elipsoide, globosa, cilíndrica, apiculada, triangular, taloide, globular com hifas, globular com pseudo-hifas e formas variadas como ascósporos.

Após a confirmação destas características morfológicas, todas as linhagens foram transferidas para tubos Eppendorf com o intuito de dar continuidade a sua classificação por meio da caracterização molecular.

3.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS

Para comparação do perfil genômico dos isolados obtidos neste estudo foram utilizadas as linhagens comerciais Fermol Arome Plus® (*Saccharomyces cerevisiae*), Fermol Charnat® (*S. bayanus*) e Fermol Cryoaromae® (*S. uvarum*), adquiridas da empresa AEBgroup (São José dos Pinhais, Brasil).

Para a extração do rDNA, as linhagens isoladas foram submetidas ao método adaptado descrito por Sambrook et al. (1989). Para tal, efetuou-se o crescimento celular a partir de uma alçada da cultura matriz isolada em placa em 1 mL de meio YEPG em tubo Eppendorf, mantido sob agitação em agitador orbital a 2 g a 28° C por 72 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 151 g, descartando-se o meio de cultura e ressuspensando-se as células em 500 µL de água MilliQ.

Na sequência as amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos e centrifugadas à velocidade máxima por 5 min (13148 g). A água do Eppendorf foi descartada ficando somente com o precipitado celular, sendo a ele adicionados 500 µL do tampão de lise modificado (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA).

Essa mistura foi submetida a vortex durante 1 min, seguida da incubação em banho maria a 65 °C por 1 h. Em seguida ocorreu nova agitação em vortex durante mais 1 min com posterior centrifugação durante 5 min a 11337 g à temperatura ambiente. Na sequência uma alíquota de 500 µL da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) gelado foi adicionada a cada amostra. Após essa adição ocorreu agitação branda do material em vortex, com posterior centrifugação por 5 min a 11.337 g, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi transferido para novo tubo Eppendorf, e a ele adicionou-se 40 µL de NaCl 5M e 1000 µL de etanol P.A 96 % (-20 °C), sendo misturados por inversão (três vezes). Em seguida foram incubadas a -20 °C durante 60 minutos para precipitação do DNA. As amostras foram então centrifugadas durante 5 min a 11337 g (4 °C), e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 % (-20 °C) descartando-se o álcool após cada centrifugação (5 min, 11337 g, 4 °C). O rDNA foi seco sob papel toalha limpo, e quando seco ressuspensado

em 100 μL de água milliQ estéril sendo então armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a padronização da massa do rDNA obtida nas extrações, as amostras foram quantificadas pela técnica de Nanodrop. Para tanto, 2 μL da amostra foram utilizadas, sendo obtida uma razão média de 100 ng de DNA após diluições com água MilliQ.

As amostras foram amplificadas por PCR analisando seu rDNA total utilizando os iniciadores (primers) específicos para a espécie *S. cerevisiae* descritos por Sabaté et al. (2000). A região amplificada foi a ITS, através do emprego dos primers ITS 1-F (CTTGGTCATTTACAG GAAGTAA) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). As ampliações do DNA foram realizadas seguindo metodologia descrita por Jimenez-Clemente et al. (2004), obtendo um volume de reação final de 25 μL , contendo: 1 μL do DNA genômico das leveduras (5-25 ng), 1 μM de cada iniciador a 10 pmol μL^{-1} , 1 μM de Taq-polimerase com 1 U, 1 μL de dNTPs com 0,5 μM , 1 μL de MgCl_2 com 1,5 mM, sendo o volume final ajustado com água Milli-Q. Foram feitos controles negativos para cada grupo de 20 amostras.

As ampliações foram procedidas em termociclador Eppendorf *Master Cycler* observando-se as seguintes condições: desnaturação inicial por $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, seguido de 30 segundos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ para anelamento, um ciclo de 1 minuto a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ para síntese, repetido para 30 ciclos e um ciclo de 10 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ para extensão final segundo descrito por Jimenez-Clemente et al. (2004). Os produtos de amplificação foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para obtenção dos perfis genômicos, um volume de 5 μL dos produtos amplificados foi separado por eletroforese em gel de agarose (1%) (m/v) com tampão TAE, à voltagem constante de 60 V por 1 hora, marcados com *Sybergreen* e fotodocumentados com luz ultravioleta.

Para análise dos perfis de restrição, os produtos de PCR foram separados em alíquotas de 5 μL , e subsequentemente submetidos a digestão empregando-se 1 U das enzimas de restrição purificadas em 15 μL de volume final, seguindo as recomendações do fabricante. Foram usadas as enzimas de restrição HaeIII (Fermentas®), RsaI (Fermentas®) e HinfI (BioLabs®). Os produtos oriundos da ARDRA foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1,5 % (m/V). O marcador de massa molecular 100 bp DNA *ladder* Norgen® (Thorold, Canadá) foi usado como padrão. Todas as eletroforeses foram conduzidas em cuba HU-10 Mini-Plus horizontal (10 x 11.5 cm com 16 poços; Scie-plas, Inglaterra) a 60 V por 1,3 horas. Após a eletroforese o gel foi fotodocumentado em transluminador de luz UV.

As análises filogenéticas dos padrões de banda das restrições foram feitas utilizando o software JMP 10.0.0, o qual gerou

dendrogramas resultantes de análises de cluster no modelo WARD após concatenamento dos dados das linhagens restringidas utilizando os coeficientes de similaridade de Jaccard (LATHAR et al., 2010).

3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ISOLADOS

Para a realização das análises físico-químicas foi utilizado um número menor que o número total de isolados. Isso decorre do fato que diferentes isolados podem corresponder geneticamente ao mesmo indivíduo, já que foram isolados ao acaso. Os agrupamentos resultantes da análise filogenética, por exemplo, podem definir um número menor de isolados para submeter à caracterização físico-química.

Assim, a partir da escolha dos isolados representantes da diversidade encontrada, os mesmos foram separados, repicados em 10 mL de meio YEPG e, após crescimento, a determinação da concentração foi determinada ao microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer. A contagem permitiu calcular o volume de inóculo necessário para uma concentração inicial de células de 10^6 UFC/mL. Procedeu-se então os ensaios descritos a seguir, realizados todos em duplicata.

3.6.1 Produção de H₂S

A produção de sulfeto de hidrogênio foi a primeira característica a ser observada nos isolados, já que leveduras utilizadas para produção de bebidas não podem produzir esse composto. Para isso, os isolados foram inoculados em meio LA em placas, as quais foram incubadas por 10 dias a 28 °C (GUIMARÃES, 2005). Após esse período, o aparecimento de colônias enegrecidas foi indicativo da produção do sulfeto de hidrogênio conforme exemplo na Figura 10.



Figura 10. Teste de produção de sulfeto de hidrogênio. Colônias a esquerda são H_2S negativa e a direita H_2S positiva.

3.6.2 Capacidade fermentativa

Para a verificação da capacidade fermentativa de cada levedura, um volume de inóculo foi transferido a um tubo de ensaio contendo 10 mL do meio YEPG resultando na concentração 10^6 UFC/mL. Além da glicose, também foram testados separadamente sacarose e frutose. Os tubos continham em seu interior tubos de Durham, e as culturas foram mantidas a 25 °C por 7 dias. Após esse período, foi observado o crescimento por turvação do meio e acúmulo de gás no interior dos tubos de Durham (KURTZMAN; FELL, 1998).

3.6.3 Tolerância a baixo pH

Para análise da tolerância das leveduras a um baixo pH foram realizadas fermentações de 10 mL de meio YEPG em tubo de ensaio com capacidade de 15 mL de volume com tubo de Durham invertido, onde o pH do meio utilizado foi ajustado em 2,6 e 3,8 com solução tampão de ácido clorídrico 1,0 M (DORTA, 2006). Após inoculação de 10^6 UFC/mL os tubos foram agitados e colocados em estufa a 25 °C, por 7 dias. Ao término, foi procedida a leitura qualitativa do crescimento das leveduras nos tubos, observando a formação de gás como sendo positivo para o crescimento das leveduras.

3.6.4 Tolerância à baixa temperatura

Para a análise do crescimento em baixa temperatura foram realizadas fermentações em tubos de 15 mL de capacidade contendo 10 mL de meio YEPG com tubo de Durhan invertido. As leveduras foram inoculadas na concentração 10^6 UFC/mL, e colocados em estufa BOD nas temperaturas de 10 °C, 15 °C e 25 °C por 7 dias. Após esse período o crescimento celular foi quantificado através da contagem em câmara de Neubauer. O resultado obtido foi a diferença entre a contagem final e a que foi inoculada (MOREIRA et al, 2010).

3.6.5 Osmotolerância

A capacidade de tolerar condições de alta concentração de açúcares foi determinada criando-se uma condição de alta pressão osmótica no meio de cultura, onde os isolados foram avaliados em meio Glicose 50 % (MOREIRA et al., 2010). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 110 °C por 10 minutos, para evitar caramelização do açúcar. As leveduras foram padronizadas na concentração 10^6 UFC/mL e inoculadas pontualmente em placas contendo o meio modificado. Foram realizadas leituras diárias por até 20 dias, onde os resultados qualitativos foram expressos como + (positivo), D (positivo lento) ou - (negativo).

3.6.6 Capacidade de floculação

Para a análise da floculação foram inoculadas 10^6 UFC/mL de células em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YEPG e incubados a 25 °C por 72 horas. Após o período de incubação, a cultura depositada no fundo do tubo foi agitada suavemente em *vortex* por 15 segundos. A avaliação consistiu na visualização de flocos suspensos no meio de cultura, assim como proposto por Guimarães (2005). Foram realizadas leituras diárias, onde os resultados qualitativos foram expressos como positivo para a presença de flocos.

3.7 EXPRESSÃO E SENSIBILIDADE AO FATOR *KILLER*

O objetivo desse teste foi verificar se os isolados apresentavam a expressão de fator *killer* e, também, se os mesmos apresentavam

sensibilidade a esse fator. Foram utilizados dois referenciais positivos para expressão de proteínas *killer*, representado pelas leveduras *Pichia anomala* (CCT 2369; fator K4) e *S. cerevisiae* (CCT 0761, fator K2). Como referencial sensível a essas proteínas foi utilizado a levedura *S. cerevisiae* (CCT 0765). Essas leveduras utilizadas como referencial foram adquiridas do banco de culturas da Fundação André Tosello-Campinas-SP.

Para verificar a expressão de proteínas *killer* dos isolados, um volume de 100 μL de inóculo da levedura sensível (CCT 0765) na concentração de 10^6 UFC/mL foi espalhado com alça de Drigalsky sobre meio YEPG com azul de metileno em placas de Petri. Em seguida foram feitos sete poços de 7 mm de diâmetro no meio de cultura com auxílio de um furador de aço inox esterilizado. Em cada placa foram adicionadas as leveduras *killer* K2 e K4 e mais 5 leveduras a serem testadas, em poços diferentes. Foram adicionados 100 μL de inóculo na concentração também de 10^6 UFC/mL. Depois, para verificar a sensibilidade das leveduras em estudo, procedeu-se o contrário, espalhando-se sobre as placas os isolados a serem testados e nos poços apenas as leveduras *killer* K2 e K4. As placas foram incubadas por até 10 dias a 25 °C e a leitura foi realizada observando-se a formação de halos claros ao redor dos poços, indicando ausência de crescimento da levedura sensível padrão ou daquelas em análise, além de um círculo azul escuro entre o halo e a região de crescimento da levedura sensível, indicando a morte das leveduras em função da difusão das proteínas para a área de crescimento (TOSTA, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

Ao final do processo de isolamento obteve-se um total de 92 isolados, sendo 63 obtidos nas amostras das propriedades visitadas na região de Urubici e São Joaquim, 29 de maçãs adquiridas no comércio local de Florianópolis e outras 30 cedidas pela EPAGRI (Tabela 1). Desses, 8 isolados, embora estejam preservados, não foram analisados neste trabalho em função de que não foi possível a amplificação do seu rDNA.

Tabela 1. Número de Leveduras Isoladas Após a Coleta.

Local de Origem	Isolados
AEBGroup C (comercial)	3
Florianópolis (F)	25
Urubici (1P – propriedade 1)	8
Urubici (2P – propriedade 2)	2
Urubici (3P – propriedade 3)	4
Urubici (4P – propriedade 4)	4
Lajeado Liso (5P – propriedade 5)	17
São Joaquim (6P – propriedade 6)	2
EPAGRI (E)	30
Total	92

Diferente de estudos como de Guimarães (2005) que priorizou o isolamento de *S. cerevisiae*, neste trabalho procurou-se isolar vários tipos de leveduras, pois leveduras oxidativas também são importantes na produção de sidras, sendo responsáveis pela formação de vários aromas (NOGUEIRA et al, 2003).

Os isolados foram enumerados sequencialmente a partir do grupo referência (3 leveduras comerciais), sendo que as isoladas de frutas do mercado local receberam a numeração de 4 a 32 e as da região de Urubici e São Joaquim, e aquelas provenientes da Epagri com numeração entre 33 e 117 (APÊNDICE C), totalizando 84 isolados efetivamente analisados.

Além de serem mantidos sob refrigeração para os estudos descritos neste trabalho, os isolados também foram criopreservados. Na

manutenção dos isolados, tanto no processo de repique semestral, quanto nos repiques mais periódicos necessários aos estudos, observou-se que todas as 84 leveduras apresentaram boa capacidade de multiplicação, tanto as mantidas sob refrigeração quanto aquelas criopreservadas. Embora os isolados congelados tenham sido repicados a cada seis meses durante o projeto, a literatura descreve que a criopreservação mantém a viabilidade das leveduras por pelo menos 12 meses (RUSSELL; STEWART, 1998).

É oportuno relatar que durante a realização deste trabalho foi visitada outra região produtora de maçãs, no oeste catarinense, onde foi coletado material que permitiu o isolamento de cerca de outras 120 leveduras. Esses isolados estão armazenados e serão oportunamente estudados. Como mencionado na introdução, este estudo tem um caráter preliminar, sendo base experimental para definição de novos métodos de análise, tanto substitutivos aos realizados, quanto complementares, visando uma caracterização mais abrangente com cerca de 200 leveduras que agora dispomos para estudos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Analisando os dados referentes aos aspectos de macromorfologia, dos 84 isolados (APÊNDICE A), 66 possuem forma circular regular, enquanto 18 tem forma irregular. Com relação ao tamanho, 25 são grandes, possuindo diâmetro das colônias igual ou superior a 5 mm, 42 tem tamanho médio (2 a 5 mm), enquanto 17 tem tamanho pequeno (2 mm). Já quanto à superfície, 16 dos isolados possuem estrias concêntricas, 15 tem vales radiais e 53 tem superfície granulosa. Nenhum representante com estrias radiais foi identificado neste estudo. Com relação às bordas, 66 dos isolados tem bordas lisas, 9 deles tem bordas onduladas, 7 tem bordas lobuladas e 2 tem bordas cremadas. Não foram encontrados representantes com bordas pregueadas, franjeadas e filamentosas.

Verificando-se os dados referentes à análise microscópica, observa-se que 47 dos isolados estudados apresentam forma globosa, 13 forma apiculada, 11 forma cilíndrica, 10 forma elipsoide, 2 forma globular com hifas e 1 último com forma globular com pseudo-hifas. Nenhum representante foi encontrado com morfologia microscópica triangular e taloide.

Com relação à coloração, as colônias apresentaram variação desde cinza, passando por bege, branco, até laranja avermelhado, como exemplificado na Figura 11. A exemplo de outros caracteres morfológicos, a utilização da cor na caracterização dos isolados foi feita com o intuito de segregar grupos que pudessem identificar possíveis agrupamentos biofisiológicos.

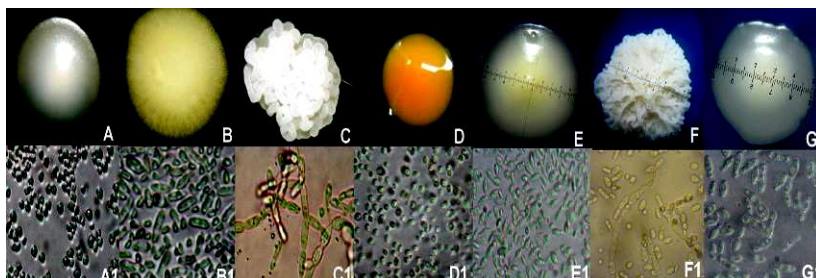


Figura 11. Morfologia macro (superior) e microscópica (inferior) de sete isolados de leveduras obtidos e analisados neste estudo: 1 (A e A1), 12 (B e B1), 13 (C e C1), 71 (D e D1), 68 (E e E1), 99 (F e F1) e 3 (G e G1).

Segundo Casalone et al. (2005), algumas variações morfológicas entre as colônias durante o processo de isolamento estão diretamente associadas à constituição do meio de cultura. Como exemplo desse fenômeno, colônias retiradas de suas condições ambientais de origem apresentaram características microscópicas na forma de pseudo-hifas (Figura 11 C e C1). Contudo, quando sujeitas a repicagens sucessivas, perderam suas características originais de pseudo-hifas e passaram a se comportar como colônias e células elipsoides, semelhante às imagens A e A1 da Figura 11. Nas outras imagens B e B1, D e D1, E e E1, F e F1 e G e G1 é possível observar as diferentes colônias e unidades celulares encontradas durante o processo de isolamento.

Com o objetivo de agrupar os isolados com características morfológicas semelhantes, e também confrontar com as características moleculares estudadas num segundo momento, os dados morfológicos referentes aos caracteres discutidos acima foram transformadas em uma matriz binária. Esses dados, quando submetidos à análise estatística pelo método de mínima variância (Ward) e índice de similaridade (Jaccard), produziram nove agrupamentos distintos conforme apresentado na Figura 12. Essa figura mostra o dendrograma obtido após a análise dos dados morfológicos agrupados com um coeficiente de similaridade de 65 %.

A análise dos resultados obtidos pelo dendrograma apresentado na Figura 12 revelou algumas peculiaridades em relação à classificação destes indivíduos leveduriformes. Dentre as observações possíveis de inferência, pode-se notar que os três isolados comerciais pertencem às espécies *S. cerevisiae* (isolado 1 – grupo I), *S. bayanus* (isolado 2 – grupo VI) e *S. uvarum* (isolado 3 – grupo II), tiveram posicionamento distinto no dendrograma apresentado, com baixa similaridade (40%). Apesar de pouco representativo, pois apenas uma amostra/isolado de cada espécie comercial foi estudada, para esses indivíduos é possível afirmar que as características morfológicas de cada um deles foram suficientes para uma separação classificatória distinta. Esse resultado é importante, pois demonstra haver uma coesa relação entre certos caracteres morfológicos dos isolados e seu posicionamento evolutivo.

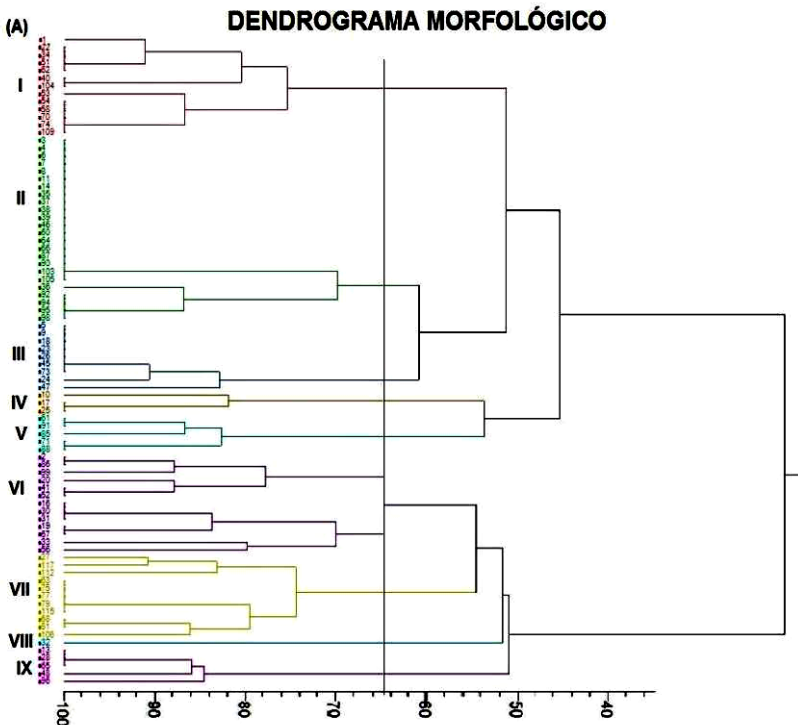


Figura 12. Dendrograma referente às características morfológicas macroscópicas e microscópicas de 84 isolados leveduriformes avaliados.

Não é possível afirmar, no entanto, baseado apenas nestes dados morfológicos, se os demais isolados agrupados naqueles grupos contendo os isolados comerciais, também pertencem àquelas espécies. Contudo, esse resultado serve como ponto de partida para elencar, num segundo momento, caracteres importantes que, quando confirmados por análises mais consistentes e precisas, como aqueles amparados pela biologia molecular, possam agrupar indivíduos de interesse nessas etapas de seleção de características potencialmente desejáveis num processo de obtenção de sidras comerciais.

Ainda com relação à Figura 12, é possível fazer outras inferências classificatórias com relação a certos caracteres morfológicos levantados neste estudo. Dentre esses, aspectos morfológicos macroscópicos, tais como a forma, o aspecto da borda, a superfície e o tamanho (diâmetro) das UFC. Com relação à forma das UFC, pode-se notar que isoladamente ela não representa um caractere homólogo que indica relação evolutiva entre os isolados avaliados. Neste contexto, alguns dos grupos identificados (I, II, III, IV, VII, VIII) contem apenas isolados com a forma circular das UFC. Por outro lado, um segundo aglomerado envolvendo os grupos V, VI e IX apresentou isolados (dentro de cada agrupamento) que tem tanto a forma irregular quanto a forma circular das UFC (Figura 12, APÊNDICE A). Não foram identificados grupos que contivessem isolados exclusivamente com a forma irregular de suas UFC.

Já com relação à borda, ao aspecto da superfície, o tamanho (diâmetro) e a cor das UFC, não foram identificadas quaisquer relações destas com a classificação (dendrograma) obtida pela análise binária (índice de similaridade de Jaccard). Este resultado indica que esses caracteres não são homólogos, ou seja, não tem uma razão evolutiva baseada num ancestral comum e, portanto, não servem como característica informativa em atividades de caracterização de isolados leveduriformes.

O mesmo resultado e conclusão podem ser discutidos para os caracteres microscópicos avaliados neste estudo. Como pode ser observado no APÊNDICE A e na Figura 12, não há qualquer relação entre a classificação morfológica obtida pelas análises de similaridade e o aspecto microscópico das células leveduriformes. Novamente, é possível concluir, portanto, que esta é também uma característica que não tem aplicabilidade nos trabalhos de caracterização dos isolados aqui estudados.

Para trabalhos futuros, o aprofundamento das análises de características microscópicas através do emprego de técnicas como a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é fundamental para revelar

características celulares particularmente mais importantes, que poderão servir de referência no processo de seleção de indivíduos potencialmente viáveis para processos biotecnológicos diversos. Uma avaliação mais aprofundada de dados morfológicos diversos, aliados a análises secundárias de outros parâmetros relevantes (molecular, fisiológica, bioquímica, etc.) poderão proporcionar conclusões mais precisas acerca dos métodos de avaliação e classificação desses indivíduos leveduriformes visando sua aplicação em processos biotecnológicos ou simplesmente como ferramenta de classificação taxonômica.

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

A análise dos produtos de amplificação demonstrou haver linhagens com fragmentos de amplificação de diferentes tamanhos. A exemplo do exposto para os produtos de amplificação, os resultados das análises de restrição também indicaram produtos obtidos de tamanhos diferenciados (APÊNDICE C e D).

Dentre os perfis obtidos constatou-se que a grande maioria dos isolados (28) possui perfil de 800 pares de bases (pb). Um segundo grupo representativo, contendo 17 isolados, possui perfil de 900 pb. Outros 15 isolados tiveram perfil com 600 pb, seguidos de 9 isolados com 700 pb e 8 com 500 pb (APÊNDICE C). Outros perfis menos frequentes também foram identificados para alguns isolados: 3 deles com 650 pb, 2 com 750 pb e outros dois com 850 e 670 pb, respectivamente. Adicionalmente, é possível concluir que os fragmentos de restrição para todas as enzimas variaram de 50 a 900 pb. Especificamente para a enzima *HaeIII* os fragmentos de restrição foram de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 320, 400, 420, 450, 480, 500, 580, 600, 700, 750, 800 e 900 pb. Já para a enzima *Rsa I*, estes foram de 100, 150, 200, 250, 400, 500, 550, 600, 700, 750 e 800. Para a enzima *HinfI*, estes valores foram de 100, 200, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 500, 600 e 700 pb.

Dentre o total dos dados obtidos dos fragmentos de restrição, as bandas menores que 50 pb não foram visualizadas de forma precisa e, portanto, não foram incluídas na listagem geral dos produtos analisados. Para todas as análises efetuadas, quando a soma dos produtos de restrição não atingiu o perfil do fragmento de PCR, considerou-se que houve clivagem ou sobreposição de *contigs* e, portanto, os mesmos não foram detectados nos géis de revelação. Assim, essas porções não foram consideradas, o que não altera, sobremaneira (LATHAR et al., 2010), os resultados de concatenamento na análise estatística realizada.

As análises dos padrões gerados com as enzimas de restrição revelaram um alto polimorfismo genético entre os isolados, independentemente do fragmento de amplificação. Assim, e em função dos diferentes grupos identificados na análise molecular, é possível sugerir que exista uma grande variabilidade genética entre os indivíduos amostrados, indicando comunidades ecológicas e fisiológicas distintas entre os isolados aqui estudados.

Os resultados das análises efetuadas com o emprego das três enzimas de restrição mostrou convergência dos dados formando 20 grupos filogeneticamente distintos (Figura 13) adotando-se um índice de similaridade de 80%. Cada grupo, por sua vez, é formado por um número variado de isolados, sendo o mais representativo formado por 12 isolados enquanto os menores tiveram apenas 1 isolado cada (6 agrupamentos).

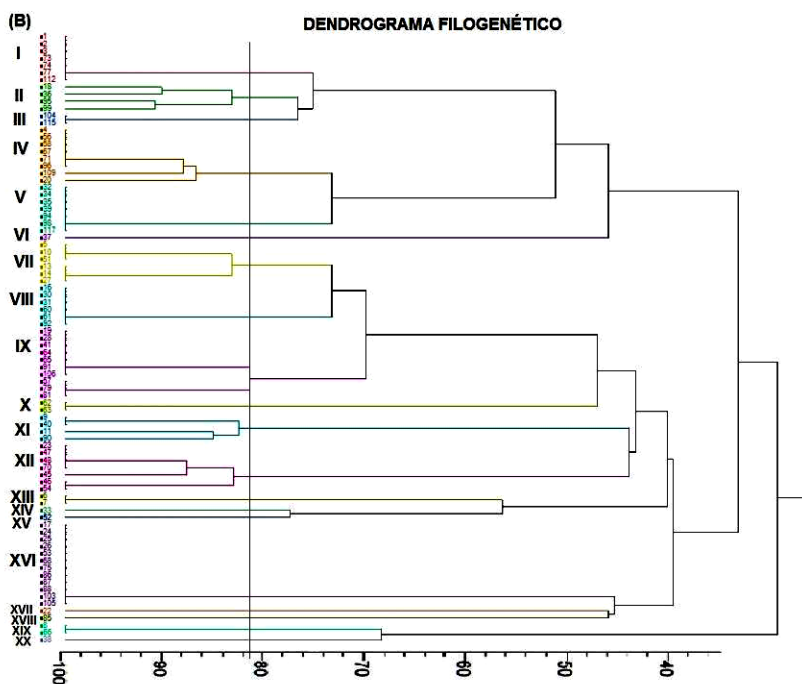


Figura 13. Dendrograma referente aos perfis filogenéticos obtidos via clivagem enzimática obtidos pela análise de 84 isolados leveduriformes.

Quando se comparam os resultados dos dados morfológicos com aqueles da biologia molecular, é possível identificar uma grande divergência entre os padrões classificatórios obtidos. Neste aspecto, enquanto para os dados morfológicos obtiveram-se 9 grupos morfológicamente distintos, para os dados moleculares, essa análise gerou 20 agrupamentos distintos. Nenhuma relação classificatória ou filogenética pode ser identificada quando as terminações mais basais foram analisadas, ou seja, a região alvo para o estudo (ITS) aparentemente não agrupou/diferenciou filogeneticamente indivíduos que morfológicamente poderiam ser iguais ou distintos. Isto pode refletir a inespecificidade dos dados morfológicos para o agrupamento de indivíduos leveduriformes ou a baixa resolução obtida pelo uso da região ITS. É possível que eventos de evolução tenham convergido caracteres outrora distintos numa única classe de dados moleculares, que não são expressos morfológicamente, o que também pode ser uma das explicações para esse evento de dissimilaridade de resultados.

Apesar de mais conclusiva, a análise dos dados moleculares também necessita de aprofundamentos com relação à definição do agrupamento obtido neste estudo. É notória a utilização de padrões de restrição para a separação e classificação de indivíduos microbianos (MOKHTARI et al., 2012). Contudo, análises desta natureza normalmente requerem que os padrões obtidos sejam interpretados ou comparados a outros estudos que identificam indivíduos ou grupos de indivíduos contidos em cada padrão individual de restrição. Alternativamente, e a fim de reduzir os erros ocasionados pelas clivagens inespecíficas ocasionadas pelas enzimas de restrição, sugere-se que análises mais completas, como o sequenciamento do rDNA sejam utilizadas nesses processos de identificação intraespecífica. Entretanto, não foram efetuados sequenciamentos dos isolados aqui estudados em função do curto tempo disponibilizado para esse estudo.

Nenhuma relação efetiva foi verificada entre o local de coleta e o agrupamento dos isolados obtidos, corroborando os dados de Querol et al. (2003), que também não obtiveram um padrão regular de distribuição em função da origem das suas amostras.

A associação da levedura com a propriedade de origem poderia estimular mais pesquisas para definir a influência de cada linhagem sobre a qualidade das sidras produzidas. Além disso, uma relação entre o ambiente natural e suas características intrínsecas facilitaria a seleção de isolados que pudessem apresentar padrões fisiológicos compatíveis com a obtenção de sidras de elevada qualidade.

4.4 PRODUÇÃO DE H₂S

Com relação à análise da produção do sulfeto de hidrogênio nos 84 isolados, constatou-se que 24 deles são produtores, o que representa 28,6 % do total. As três leveduras comerciais representantes do grupo referência (isolados 1, 2 e 3), conforme esperado, não são produtores de H₂S (APÊNDICE 2). Explicações para linhagens de leveduras produzirem H₂S (JIRANEK et al., 1994; JIRANEK et al., 1995) frequentemente associam-se a fatores relacionados com a composição do meio de cultura. Num estudo nesse sentido, também se constatou que do total de cinquenta leveduras, representando doze gêneros, o maior número associado a produção de H₂S⁺ estavam dentro do gênero *Candida* (NICKERSON, 1953). Nossos dados mostram que isolados produtores de H₂S estão distribuídos em 15 dos 20 grupos, embora esses ainda não estejam efetivamente identificados. Apesar do teste não garantir que as leveduras H₂S negativas não produzam esse composto nas diferentes condições de processo para produção de sidras, essa triagem torna-se importante para diminuir o número de ensaios que poderiam ser evitados com isolados notadamente produtores desse composto.

Com base nesse critério de análise, considerou-se 60 isolados (incluindo o grupo referência) na escolha dos representantes dos 20 grupos formados pela análise filogenética para caracterizar através das micro fermentações descritas a seguir.

4.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Dos 20 grupos filogenéticos, seis deles apresentaram apenas um isolado, sendo que os isolados dos grupos VI, XVII e XVIII produziram H₂S, deixando esses grupos sem representantes para essa etapa. Dessa forma, foram escolhidos 31 isolados que, somados a dois isolados do grupo referência, totalizaram 33 isolados que foram caracterizados com relação a alguns parâmetros fermentativos apresentados a seguir. Nenhum parâmetro foi considerado excludente, pois o objetivo era conhecer as características dos isolados a fim de fornecer subsídios para uma seleção visando à produção de diferentes tipos de sidras. Grupos filogenéticos com maior número de isolados tiveram até três indivíduos analisados.

4.5.1 Tolerância a baixo pH

O resultado do pH do meio de cultura no crescimento celular, avaliado pela formação de gás que indicou a capacidade de fermentar naquelas condições, estão apresentados na Tabela 2. O grupo comparativo (isolados 1 e 2) apresentou produção de gás em ambas faixas de pH. No meio mais ácido (pH 2,6) constatou-se que 10 grupos continham um isolado que não cresceu (não produziu gás) e que dos 10 isolados, três (11, 19 e 61) também não cresceram no pH 3,8.

Tabela 2. Produção de gás (+) por isolados de leveduras em diferentes valores de pH.

Grupos	Isolados			Crescimento					
				pH 2,6			pH 3,8		
C	1	2		+	+		+	+	
I	73	77		+	-		+	+	
II	18	95		-	+		+	+	
III	104	115		+	+		+	+	
IV	4	71	109	+	+	-	+	+	+
V	32	117		+	-		+	+	
VII	14	27	51	-	+	+	+	+	+
VIII	30	61		+	-		+	-	
IX	19	81		-	+		-	+	
XI	9	11	40	+	-	+	+	-	+
XII	47	54		-	+		+	+	
XIII	7			+			+		
XIV	33			-			+		
XV	52			+			+		
XVI	17	25	105	+	+	+	+	+	+
XIX	8	66		+	+		+	+	

No início da fermentação da sidra, o mosto encontra-se em condições de pH ácido (2,18 a 3,74), devido às condições de esmagamento completo das maçãs e liberação do mosto. Neste ambiente segundo Gibson et al. (2007) o pH pode ter um impacto significativo sobre a produção de compostos aromáticos produzidos pelas leveduras. Valores baixos de pH em processos fermentativos tem várias vantagens, desde o aroma e paladar da bebida (NOGUEIRA et al., 2006), redução na produção de sulfeto de hidrogênio e redução de bactérias indesejadas no processo (GIBSON et al., 2007). Além disso, processos realizados em condições pressurizadas (SUGUINO, 2012) para retenção de aromas, por exemplo, aumenta a solubilidade do CO₂ com produção de ácido carbônico e consequente abaixamento do pH do fermentado. Com relação ao estresse ocasionado pelas mudanças do pH do meio, segundo Boulton et al., (2001) as leveduras toleram o decréscimo de 1,5 a 2,0 unidades no pH dentro de sua faixa de crescimento, que pode ocorrer naturalmente durante a fermentação devido a produção de outros ácidos.

Considerando essa análise como um critério de seleção, os isolados 11, 19 e 61 seriam inadequados para o desenvolvimento de processos para produção de sidras.

4.5.2 Influência da temperatura

Sabe-se que os processos fermentativos são altamente influenciados pela temperatura e que seu controle é fundamental para se atingir os objetivos desejados. Nesse teste avaliaram-se como as leveduras respondiam a diferentes temperaturas. Foram estabelecidas as temperaturas abaixo de 25 °C porque estão mais relacionados com a qualidade das bebidas. Em temperaturas mais elevadas as fermentações são mais susceptíveis à contaminação (a exemplo de pHs mais elevados), perdendo-se maior quantidade de aromas e álcool (NOGUEIRA et al., 2006).

Através da contagem celular ao término na fermentação de sete dias pode-se estabelecer um quadro comparativo entre os isolados. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 14.

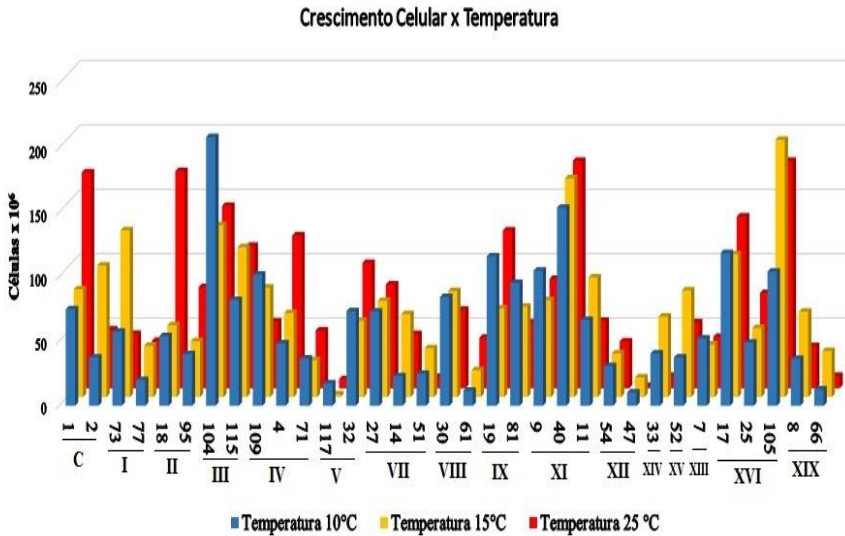


Figura 14. Crescimento celular em função da temperatura de incubação.

Numa análise mais geral, verifica-se que todos os isolados cresceram em todas as temperaturas, embora as diferenças entre os isolados sejam grandes. Entretanto, pode-se observar uma distribuição relativamente equalizada entre os isolados com relação ao maior crescimento e as três temperaturas. Ou seja, embora o maior número de isolados tenha crescimento mais acelerado na temperatura mais alta (25 °C), também teve um número alto de isolados com crescimento mais acelerado na temperatura de 15 °C e um pouco menos na temperatura de 10 °C. Esse resultado é estimulante pela razão de que se deseja encontrar isolados adaptados em temperaturas mais baixas, já que as fermentações em baixas temperaturas favorecem a qualidade das sidras. O resultado é condizente com a região de clima frio onde parte das leveduras foi isolada.

Durante a realização desse teste, observou-se que os isolados 9, 77 e 51 apresentaram formação de flocos no cultivo a 15 °C. Como será apresentado no próximo item que trata da floculação, os isolados 51 e 77 não flocularam na condição do teste, que foi realizado na temperatura de 25 °C. Também, se observarmos os resultados do teste de crescimento em baixos pH, podemos perceber que a maioria dos isolados que não cresceram no pH baixo (2,6) também foram os que cresceram menos nas temperaturas mais baixas, confirmando o que já se sabe dos estudos ecológicos, em que a adaptação a condições extremas pelos

microrganismos estão relacionadas a mais de um fator ambiental (MELO et al., 1998).

Observando-se isolados como os 9, 27, 30, 40, 104 e 115, além de terem um bom crescimento, o fizeram de forma semelhante nas três temperaturas, o que é uma característica interessante com relação ao desenvolvimento das bebidas, já que a eficiência fermentativa poderia ser mantida mesmo em temperaturas diferentes.

Várias espécies de *Candida* crescem mais rapidamente em baixas temperaturas (10 a 15 °C) do que *S. cerevisiae*. Por outro lado, o crescimento de algumas linhagens como *Kloeckera apiculatae* e *Candida* spp. são idênticos aos de *Saccharomyces*, o que poderia dificultar a caracterização microbiológica, onde emprega-se a avaliação da temperatura (LLAURADÓ et al., 2005). Segundo Fleet (1997) a predominância de *Candida* e a sua resistência a baixas temperaturas poderia explicar seu domínio prolongado durante as fermentações.

Em um estudo realizado por Schade et al. (2004), quando sujeitas a baixas temperaturas (10 °C), as células de *S. cerevisiae* demonstram uma velocidade de crescimento mais reduzida. Em culturas que apresentaram tempo de duplicação de 90 minutos, passando de 30 °C para 10 °C constatou-se que o tempo de duplicação aumentou em mais de 20 h. Beltran (2005) aponta para a hipótese que as baixas temperaturas prejudicam a capacidade de absorção de nitrogênio, diminuindo a fluidez da membrana plasmática, o que consideravelmente reduz o movimento intracelular e de proteínas de membrana como os fosfolípidos. Isso só reforça a importância de se buscar fontes onde se possa encontrar leveduras adaptadas aos processos em baixa temperatura.

4.5.3 Capacidade Fermentativa

Na análise de fermentação com diferentes fontes de carbono, foram utilizados os açúcares fermentescíveis glicose, sacarose e frutose. Na verificação dos dados dispostos na Tabela 3, constatou-se que ambas leveduras comerciais são fermentativas para os três tipos de monossacarídeos utilizados. Ainda, 22 dos isolados fermentaram todos os açúcares, preenchendo por completo o tubo de Durham com CO₂. Constatou-se ainda que quatro leveduras (14, 104, 105 e 115) não fermentaram sacarose e frutose, indicando que estas linhagens não são adequadas ao processo de produção de sidra. Percebe-se ainda que outras seis leveduras não fermentam somente a sacarose.

Tabela 3. Fermentação de diferentes açúcares (+) pelos isolados de leveduras.

Grupos	Isolados	Açúcares		
		Glicose	Sacarose	Frutose
C	1	+	+	+
	2	+	+	+
I	73	+	+	+
	77	+	+	+
II	18	+	-	+
	95	+	+	+
III	104	+	-	-
	115	+	-	-
IV	4	+	+	+
	71	+	+	+
V	109	+	+	+
	32	+	+	+
VII	117	+	+	+
	14	+	-	-
VIII	27	+	+	+
	51	+	+	+
IX	30	+	-	+
	61	+	-	+
XI	19	+	-	+
	81	+	+	+
XII	9	+	+	+
	11	+	+	+
XIII	40	+	+	+
	47	+	+	+
XIV	54	+	-	+
	7	+	+	-
XV	33	+	+	+
	52	+	+	+
XVI	17	+	+	+
	25	+	+	+
XIX	105	+	-	-
	8	+	+	+
	66	+	-	+

4.5.4 Capacidade de floculação

Após o período de incubação, as células depositadas no fundo dos tubos foram homogeneizadas para observação de flocos suspensos no meio. Os resultados estão apresentados na Tabela 4. Constatou-se que seis leveduras das isoladas (9, 14, 54, 66, 95 e 117), representando 7,4 % do total apresentaram a formação de grumos característicos da floculação. No teste de crescimento em pH de 2,6, observou-se que o isolado 77 também apresentou floculação.

Tabela 4. Capacidade (+) de formar flocos, expressar proteínas *killer* e tolerar altas pressões osmóticas dos isolados de leveduras.

Grupos	Isolados			Floculação			Fator <i>killer</i>			Osmotolerância		
C	1	2		-	-		+	-		+	-	
I	73	77		-	-		-	-		-	-	
II	18	95		-	+		-	+		-	+	
III	104	115		-	-		-	-		-	-	
IV	4	71	109	-	-	-	-	+	-	-	+	-
V	32	117		-	+		+	+		+	-	
VII	14	27	51	+	-	-	+	-	-	-	+	-
VIII	30	61		-	-		-	-		+	-	
IX	19	81		-	-		-	-		-	-	
XI	9	11	40	+	-	-	-	-	-	+	-	+
XII	47	54		-	+		+	-		-	-	
XIII	7			-			-			-		
XIV	33			-			+			-		
XV	52			-			+			+		
XVI	17	25	105	-	-	-	-	-	-	-	+	-
XIX	8	66		-	+		-	-		+	-	

Embora o estudo de Teixeira et al., (2011), ter caracterizado os níveis de floculação de leveduras, analisando também a superfície celular, eles descrevem que o pH não pode ser considerado um fator determinante de floculação, sendo que o seu efeito se dá devido a uma alteração de cargas da superfície celular. Contudo a floculação das

leveduras, está associada com fenótipos diferentes, como os genes *FLO1* e *NewFLO*, *locus* que se diferem entre si, tanto pela sua expressão e na capacidade de tolerância a mudanças no pH. Segundo Domingues et al. (2000) a temperatura pode influenciar o desenvolvimento de floculação e expressão de genes relacionados, como foi observado no item anterior onde os isolados 51 e 77 formaram flocos quando crescidos a 15 °C. Entretanto, existe uma aparente contradição onde alguns autores observaram desfloculação com o aumento da temperatura, enquanto outros observaram um aumento da floculação (VERSTREPEN et al., 2003; JINA, et al., 1998). Isso deve ser devido ao fato que o processo de floculação é controlado por um complexo conjunto de inter-relações de vários fatores fisiológicos e genéticos, mas também ambientais (BRITES, 2003). Isso quer dizer que mesmo quando outros fatores possam permitir a floculação, sua formação também dependerá de condições ambientais favoráveis.

A fim de considerar os aspectos econômicos da utilização de leveduras floculantes, realizou-se a comparação do desempenho de fermentação que utilizou leveduras floculantes e não floculantes em um biorreator do tipo torre (PACHECO, 2010). Constatou-se, avaliando os níveis de etanol e açúcar residual no mosto, que o tempo médio requerido pela linhagem floculante foi aproximadamente 50 % menor do que a linhagem não floculante, e a produtividade média da fermentação foi o dobro em razão das altas concentrações celulares que foram possíveis no fermentador.

Embora a qualidade das bebidas fermentadas esteja relacionada também com um tempo mais longo de fermentação, sem a velocidade exigida para a produção de etanol combustível, em que a floculação apresenta uma importância muito maior, a produção de sidras também pode ter uma economia considerável com relação a facilidade de clarificação da bebida. Uma levedura que flocule bem nas condições do processo pode permitir a clarificação e estabilização microbiológica das sidras sem a necessidade de investimento em equipamentos de filtração, o que pode ser determinante para pequenos produtores.

4.5.5 Osmotolerância

Como resultados da análise da capacidade de suportar alta pressão osmótica, constatou-se que dez isolados (8, 9, 25, 27, 30, 32, 40, 52, 71 e 95) (Tabela 4) apresentaram crescimento nessa condição, conforme Figura 15.

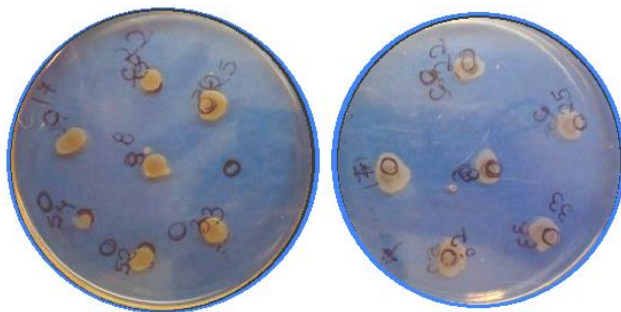


Figura 15. Isolados crescendo em meio de glicose 50% (1000 g L^{-1}).

Em condições naturais de preparos de sucos, as leveduras osmotolerantes fermentam altas concentrações de açúcar (POGORZELSKI et al., 2007). Essas concentrações mais elevadas de açúcares levam a um aumento da pressão osmótica nas células e para o seu crescimento e motilidade, desse modo reduzem de forma significativa a velocidade de fermentação. O crescimento da levedura nestas condições deve ser considerado, pois este pode influenciar a qualidade sensorial da sidra, mudando compostos químicos responsáveis pelo sabor e aroma.

Segundo Hohmann et al. (2002), enquanto que a expressão dos genes importantes para o metabolismo de glicerol, trealose e glicogênio são induzidos nas condições osmóticas desfavoráveis, a via bioquímica de produção de compostos aromáticos e da produção de álcool são interrompidas.

Particularmente, a via de síntese do glicerol vem atraindo cada vez mais a atenção de pesquisas, na busca para tentar explicar os mecanismos de acumulação intracelular (NEVOIGT et al., 1997).

Dentre as espécies associadas a esta característica, assim como sugerido por Sipiczki (2003), salienta-se que a espécie *S. bayanus* é a espécie geralmente associada com a osmotolerância de processos fermentativos de mostos contendo concentrações elevadas de açúcares, frequentemente sucedidas por *S. cerevisiae*, até o término da fermentação.

4.6 EXPRESSÃO E SENSIBILIDADE A FATOR KILLER

Com relação às análises envolvendo o fator *killer*, os resultados apresentados listam apenas a capacidade de produção da proteína *killer* pelos isolados. A sensibilidade dos isolados ainda não foi realizada.

Nesse caso, observou-se claramente o halo de inibição formado pela proteína produzida pelas leveduras de referência K2 e K4 (Figura 16). Verificou-se também o efeito *killer* de oito isolados (14, 32, 33, 47, 52, 71 e 117) (24 % dos isolados; Tabela 4) sobre a levedura sensível CCT 0765. As demais vinte e cinco leveduras, incluindo uma comercial (isolado 2), não apresentaram halo de inibição, indicando que estas são neutras.

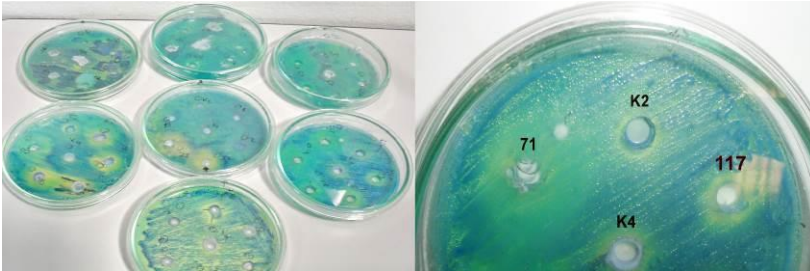


Figura 16. Teste de produção da proteína *killer* (esquerda) e exemplo do halo de inibição (direita).

O fenótipo *killer* está presente em *S. cerevisiae* e em muitos outros gêneros de levedura (MAGLIANI et al., 1997). Nos processos fermentativos o pH ótimo para a produção e estabilidade de todos os tipos de toxina *killer* variam de 4,6 a 4,8. No entanto, a toxina K2, cuja faixa de pH para sua produção é entre 2,9-4,9 (OLIVEIRA, 2009), pode representar uma ameaça nas fermentações de sidra, provocando fermentações prolongadas e com paradas durante o processo.

Segundo Starmer et al. (1992), a distribuição natural de leveduras produtoras das proteínas *killer* e a sensibilidade a essas toxinas foram relacionadas com a filogenia bem como os habitats ecológicos das linhagens. Através destes estudos, o perfil de sensibilidade *killer* permite a discriminação de leveduras de grupos taxonômicos diferentes e sua discriminação entre os isolados de origens diferentes.

O número de isolados *killer* identificados aqui é relativamente menor quando comparado a outros estudos realizados em comunidades de leveduras de processos fermentativos associados ao mosto da cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 2009). Em uma pesquisa realizada por Lima et al. (2007) do montante de 230 isolados de leveduras, foram encontrados apenas 7,0 % de isolados com fenótipo *killer* associados a processos fermentativos para produção de cachaça. Resultados ainda menores foram obtidos por Vaz (2003) que encontrou 4 isolados dentre 207, representando menos de 2 % do total analisado. Já em investigações realizadas em fermentações espontâneas do mosto da uva para produção

de vinho na região da Patagônia, Sangorrín et al. (2001) encontraram 42 % de isolados *killer* de um total de 135 isolados de leveduras testadas.

Quanto a realização de trabalhos futuros, poderia ser considerado que muitas leveduras utilizadas nos inóculos iniciais em fermentações podem ser distinguidas de leveduras contaminantes utilizando esta técnica. Esse tipo de abordagem foi usado com sucesso por Vaughan-Martini et al. (1996) e Buzzini e Martini (2000).

Neste contexto o estudo e caracterização das linhagens *killer* são de uma maneira geral importantes para todos os processos fermentativos, a fim de aumentar a uniformidade e competitividade das linhagens iniciadoras tipo *killer* frente a leveduras contaminantes indesejadas, que prejudicam o processo fermentativo.

A figura 17 mostra o número de isolados que tiveram resultado positivo nas diferentes condições das micro fermentações realizadas, visando uma caracterização físico-química preliminar. Podemos imaginar, embora nenhum teste tenha sido excludente (com exceção da produção de H_2S), que conforme aumentamos o número de características desejadas para uma determinada levedura, menor é a chance de encontrá-la.

A aplicação de inóculos mistos ou mais de um inóculo em diferentes fases do processo de produção deverá permitir atingir um maior nível de qualidade dos fermentados. Além disso, os gostos também variam muito e isso permite ter-se um número grande de isolados para diferentes produtos. Entretanto, algumas características como fator *killer*, floculação e osmotolerância não estão relacionados necessariamente à qualidade da bebida, mas são importantes para a viabilidade do processo, de modo que algumas características são importantes estarem no fenótipo de uma mesma levedura.

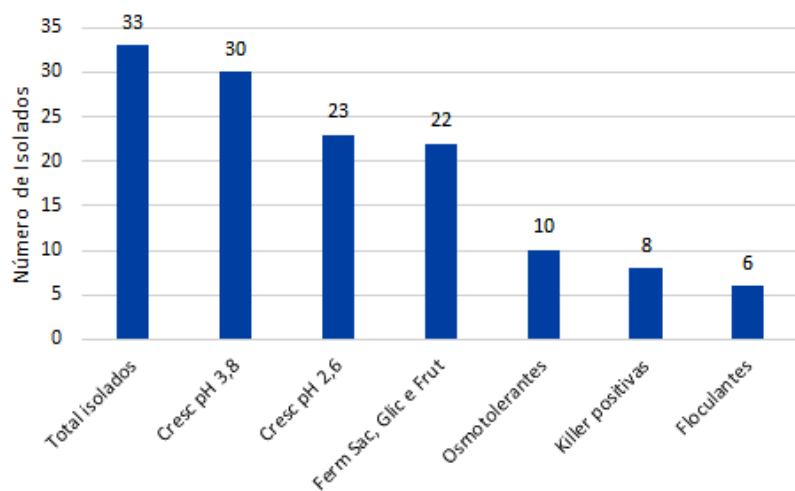


Figura 17. Número de isolados com resultado positivo para diferentes condições testadas, em relação ao total de isolados analisados.

5 CONCLUSÕES

Embora não se possa afirmar qual método é mais adequado, o método molecular representa uma metodologia mais segura para um agrupamento intraespecífico de indivíduos com características fisiológicas distintas.

Os resultados da análise molecular indicam haver uma grande variabilidade genética de indivíduos, identificada pelos 20 agrupamentos obtidos. Embora não se possa conclusivamente identificar ou enumerar as espécies e, portanto, a diversidade de leveduras isoladas, é possível sugerir que, em função da maior robustez representada pelas técnicas de biologia molecular, tenhamos um número considerável de indivíduos que representam grupos genéticos, bioquímicos, ecológicos e fisiológicos distintos, condizente com as grandes variações regionais e sazonais observadas nos locais de origem desses isolados.

As micro fermentações indicam que muitas características desejadas do processo não se encontram no fenótipo de um mesmo indivíduo. Embora um número elevado de isolados possa aumentar a probabilidade de encontrar indivíduos mais aptos, podemos concluir que a utilização de mais de um tipo de levedura num mesmo processo em suas diferentes fases é uma estratégia que merece atenção, visto que isso poderá permitir sidras com um maior número de características relacionadas a qualidade desejada.

Considerando que uma gama maior de isolados já está disponível para análise, incorporando-se os dados obtidos e, pela implementação de técnicas mais específicas de caracterização, espera-se que seja possível identificar uma população diversa e potencialmente expressiva de indivíduos, representando um alto potencial de aplicação em processos fermentativos, visando a produção de sidras.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, F.; PEINADO, R.A.; MILLAN, C.; ORTEGA, J.M.; MAURICIO, J. C. Relationship between ethanol tolerance H⁺-ATPase activity and the lipid composition of plasma membrane in different wine yeast strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 34-42, 2006.
- ALVES, P.C.O.; PINTO, S.S. Comportamento de leveduras selvagens em fermentação no setor sucroalcooleiro. **Revista Cognitio**, v. 2, 2011.
- BAUER, F.; PRETORIUS, I. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 27-51, 2000.
- BEECH, F.W.; CARR, J.G. Cider and perry. In: **Alcoholic Beverages**. ed. A.H.Rose, London UK, p. 39, 1977.
- BELTRAN, G.; NOVO, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A.; ROZÈS, N. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. **International Journal Food Microbiology**, v. 121, p. 169-177, 2008.
- BONETI, J.I.; CESA, J.D.; PETRI, J.L.; BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira. In: **EPAGRI - A cultura da macieira**. Florianópolis, p. 37-57, 2002.
- BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Production of food and fodder yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 65-86, 1992.
- BRASIL. Brasília, Lei nº 6.871, de 04 de Junho de 2009. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União. 2009.
- Brites, A.S.M. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator *Killer*, H₂S⁻ e o caráter floculante**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP. 2003.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Utilization of differential *killer* toxin sensitivity patterns for fingerprinting and clustering yeast strains belonging to different genera. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 450-457, 2000.

- CABRAS, P.; ANGIONI, A. Pesticide residues in grapes, wines, and their processing products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 967-973, 2000.
- CÁRIO, S.A.F; SEABRA, F.; NICOLAU, J.A; SIMIONI, F.J ; BITTENCOURT, C.C. Descompasso entre a estrutura da produção e de armazenamento de maçã em Santa Catarina: implicações e consequências para o produtor não organizado. **SOBER.48º Congresso**. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. 2010.
- CARVALHO, J.R.F; SILVA, K.M; SIMÕES, D.R.S; WOSIACKI, G; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado frísante de maçã com características semelhantes à sidra francesa. **Revista Boletim do CEPPA**, v. 28, n. 01, p. 97-144, 2010.
- CASALONE, E.; BARBERIO, C.; CAPPELLINI, L.; POLSINELLI, M. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 191-200, 2005.
- CELLI, M. G. **Patulina em maçãs e em produtos derivados. Aspectos sanitários e controle empregando *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa - PR. 2006
- CHIQUETTO, N.C.S. **Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições da desalcoolização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2004.
- COOTE, P.J., COLE, M.B.; JONES, M.V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1701-1708, 1991.
- COTTRELL, M.; KOCK; J.L.F.; LATEGAN, P.M.; BRITZ, T.J. Long Chain fatty acid composition as an aid in the classification of the Genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 8, p. 166-168, 1986.
- DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**. 2006. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro - SP. 2006.

ESCANOLA, F.M. **La sidricultura asturiana como incentivación Turística**. Revista de investigación en turismo y desarrollo local. v. 4 nº11.2011. Disponível em <http://www.eumed.net/rev/турыdes/>. Acessado em 17/08/2012.

FAIRBAIRN, S. **Stress, fermentation performance and aroma production by yeast**. 2012. 94 f. Master of Science. Stellenbosch University. Institute of Wine Biotechnology. Faculty of AgriSciences. 2012.

FIORAVANÇO, J.C; LAZZAROTTO, J.J. A cultura da macieira no Brasil. **Informações Econômicas**. São Paulo. n. 4, v. 42, Julho/Agosto, 2012.

FLEET, G.H. Wine. In: Food microbiology fundamentals and frontiers. Washington. **American Society for Microbiology**, p. 671-696, 1997.

FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYONI, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 1034-1038, 1984.

FUENTEFRIA, A.M. **Bioprospeção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2007. 144f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre - RS, 2007.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 14, p. 12-16, 2000.

GARRUTI, D.S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. 2001. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP, 2001.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.R.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 31, p. 535–569, 2007.

GLAZER, A.N.; NIKIDO, H. Microbial diversity. In: **Microbial Biotechnology: Fundamental of Applied Microbiology**. New York: Freeman and Company, p. 76-87, 1995.

GUIMARÃES, D.P. **Avaliação de estresse e do potencial fermentativo de isolados de *Saccharomyces* na microvinificação da jabuticaba.** 2006. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2006.

GUIMARÃES, T.M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho.** 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 2005.

HALLSWORTH, J.E; NOMURA, Y; IWAHARA, M. Ethanol-induced water stress in yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, p. 451-456, 1998.

HASHIZUME, T. Fundamentos de tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**, 1ªed. São Paulo, v. 5, p. 14-43, 1993.

HAZEL, J.R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 19-42, 1995.

HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

HOHMANN, S.; MAGER, W.H. **Yeast Stress Responses.** Chapman & Hall, New York, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro. n. 12, v. 24. 2012.

JIMENEZ-CLEMENTE, J.M.; CAZORLA, L.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, S.; VÁZQUEZ-HERAS, F.J.; VICO-RODRIGUEZ, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v. 21, p. 149-155, 2004.

JINA, Y.L; SPEERSB, A.R. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 31, n. 6, p. 421-440, 1998.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 461-467, 1996.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S- producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 26, n. 2, p. 269-273, 1995.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. **The yeasts - A taxonomic study**. 4th ed. Elsevier Science Publishers. p. 1088, 1998.

LATHAR, P.K; SHARMA, A.; THAKUR, I. Isolation and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of wild yeast species from 17 different fruits. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, p. 146-151, 2010.

LIMA, J.R.; BRUNO, L.M.; SILVA, J.L.A.; CASIMIRO, A.R.S. Potencial de utilização de leveduras *killer* para produção de cachaça. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 4, p. 366-371, 2007.

LINDERHOLM, A.L.; BISSON, L.F. Eliminating formation of hydrogen sulfide by *Saccharomyces*. **Practical winery e wineryard**. Dept. of Viticulture & Enology. University of California, 2005.

LINDQUIST, S.; KIM, G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5301-5306, 1996.

LLAURADÓ, J.; ROZÉS, N.; BOBET, R.; MAS, A.; CONSTANTÍ, M. Low temperature alcoholic fermentations in high sugar concentration grape musts. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 268-273, 2002.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D. POLONELLI, L. Yeast *killer* system. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 369-400, 1997.

MARTINI, A.; VAUGHAN-MARTINI, A. Grape must fermentation: past and present. In: **Yeasts Technology**. Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer, Springer-Verlag, Berlin, p. 105-123, 1990.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo. ed. Varela, 258 p., 2005.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Brasília: EMBRAPA-SP. p. 488, 1998.

MOKHTARI, M.; ETEBARIAN, H.R.; RAZAVI, M.; HEYDARI, A.; MIRHEND, H. Identification of yeasts isolated from varieties of apples and citrus using PCR-fragment size polymorphism and sequencing of its1–5.8s-its2 region. **Food Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 252-265, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais**. 1ª ed. Universidade Federal de Lavras, Lavras. Minas Gerais. 2010.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 231–241, 1997.

NICKERSON, W.J. Reduction of inorganic substances by yeast. I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 43-48, 1953.

NOGUEIRA, A.; SWIECH, B.P.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. **Publicatio. UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 12, n. 3, p. 15-23, 2006.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R.A.; SIMÕES, D.R.S.; DRILLEAU, J.F.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n.2, p. 289-298, 2003.

OLIVEIRA, B.M. Comportamento killer em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana-de-açúcar de produtores de cachaça de alambique da Bahia. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. BA. 2009.

PACHECO, T.F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2010.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando

suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001-2002). *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v. 28, n. 6, 2004.

PELCZAR, M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações** - vol. I e II. 2ª ed. Makron do Brasil, São Paulo. 2005.

PEREIRA, L.B.; SIMIONI, F.J.; CARIO, S.A.F. Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: novas estratégias em busca de maior competitividade. **Ensaios Fundação de Economia e Estatística**. Porto Alegre, v. 31, n. 1, 2010.

PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J.A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 439-447, 2004.

PINHEIRO, R.I.C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia das leveduras**. 2004. 292 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho. Braga. Portugal. 2004.

POGORZELSKI, E.; KOBUS, M.; KOWAL, K.; KORDIALIK-BOGACKA, E.; WILKOWSKA, A.; AMBROZIAK, W. Technological value of osmotolerant yeast isolated from high-sugar pear juices. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 57, n. 1, p. 57-62, 2007.

POOLMAN, B.; GLAASKER, E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 397-407, 1998.

PRETORIUS, I.S.; WESTHUIZEN, T.J.V.D.; AUGUSTYN, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the south Africa industry. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, 1999.

QUEROL, A.; FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; OLMO, M.L.D.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 3-10, 2003.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: International symposium on nitrogen in grapes and wine. **The American Society for Enology and Viticulture**. Washington. p. 156-164, 1991.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of enology: the microbiology of wine and**

vinifications. ed. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England. v. 1, 2000.

ROSA, C.A.; GÁBOR P. **The Yeast Handbook** – Biodiversity and Ecophysiology of Yeast. ed. Springer. Germany. p. 37-58, 2006.

RUSSELL, I.; STEWART, G.G. **An introduction to brewing science and technology**: series III brewer's yeast. London: The Institute of Brewing, p. 66. 1998.

SABATÉ, J.; GUILLAMON, J.M.; CANO, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 193, p. 255-259, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGORRÍN, M.; ZAJONSKOVSKY, I.; LOPES, C.A.; RODRÍGUEZ, M.E.; GIRAUDO, V.B.M.R.; CABALLERO, A.C. *Killer* behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from northwestern Patagonia (Argentina). **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, p. 105-113, 2001.

SANNI, A.I.; LONER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology**. v. 10, p. 517-523, 1993.

SATO M.; WATARI, J., SHINOTSUKA, K. Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, p. 130-134, 2001.

SCHADE, B.; JANSEN, G.; WHITEWAY, M.; ENTIAN, K.D.; THOMAS, D.Y. Cold adaptation in budding yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 5492-5502, 2004.

SIPICZKI, M. Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. In: Ciani, M., **Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts**. Research Signpost, Kerala, p. 53-69, 2003.

SRIPIROMRAK, A. **Isolation and characterization of thermotolerant yeast for ethanol production**. 2006. 119 f. Thesis (Master of Science in Biotechnology) - Suranaree University of Technology. Bangkok, Thailand, 2006.

STARMER, W.T.; GANTER P.F.; ABERDEEN V. Geographic distribution and genetics of *killer* phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 990-997, 1992.

SUÁREZ, V.B.; BEDRIÑANA, P.R.; QUEIPO, L.A, ALONSO, M. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiology**, v. 25, p.690-697, 2008.

SUGUINO, W.A. **Desenvolvimento de tecnologias para estudos da produção de sidras de alta qualidade**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2012.

SUZZI, G., ROMANO, P., ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeast: frequency, differences and stability of the character. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 36-39, 1984.

TEIXEIRA, A.S.F. **Estudos moleculares e enológicos da biota de leveduras de uvas da casta Touriga Nacional**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Nova Lisboa. Lisboa. Portugal. 2011.

TORIJA, M.J.; ROZÉS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 47-53, 2003.

TOSTA, C.D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer**. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

VALERO, D.; SCHULLER, B.C.; CASAL M.; DEQUIN, S. USO DEI LIEVITI SELEZIONATI E BIODIVERSITÀ. **Infowine: revista internet de viticultura e enologia**, v. 3, n. 1, 2006.

VAUGHAN-MARTINI, A.; CARDINALI, G.; MARTINI, A. Differential *killer* sensitivity as a tool for fingerprinting wine-yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 124-127, 1996.

VAZ, F.L. **Isolamento, purificação e caracterização de uma toxina killer de levedura isolada do caldo de cana-de-açúcar**. 2003. 42f.

Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.

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

VICENTI, M.A. **Caracterização molecular e bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação da cachaça de alambique**. 2007. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro preto, Ouro preto, MG, 2007.

WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. ed. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England. 1998.

WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

WAYMAN, M.; PAREKH, S.R. Microbiology of fermentation catalysts. **Biotechnology of Biomass Conversion**. ed. Open university press, p. 75-100, 1990.

WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the *killer* factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Genetic Microbiology**, v. 51, p. 115-126, 1968.

ZAMBONELLI, C. **Microbiologia e biotecnologia dei vini**. 2 edizione. Edagricole. Itália. 2003.

APÊNDICE A - Características macro e microscópicas dos isolados avaliados

COR		MACROMORFOLOGIA											MICROMORFOLOGIA							
BRANCA	AMARELA	Circular	Irregular	grande	media	pequena	inconspicua	elas	radiosa	granulosa	lisa	ondulada	remada	lobulada	elipsoide globosa	alinhada	apiculada	globular com hilo	globular com	
1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
5	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
6	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
7	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
8	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
9	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
10	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
11	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
12	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
13	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
14	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
15	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
16	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
17	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
18	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
19	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
20	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
21	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
22	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
23	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
24	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
25	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
26	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
27	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
28	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
29	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
30	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
31	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
32	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
33	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
35	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
36	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
37	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
38	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
39	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
40	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
41	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
42	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
43	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
44	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
45	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
46	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
47	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
48	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
49	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
50	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
51	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
52	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
53	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
54	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
55	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
56	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
57	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
58	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
59	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
60	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
61	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
62	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
63	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
64	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
65	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
66	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
67	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
68	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
69	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
70	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
71	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
72	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
73	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
74	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
75	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
76	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
77	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
78	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
79	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
80	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
81	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
82	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
83	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
84	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
85	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
86	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
87	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
88	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
89	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
90	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
91	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92																				

APÊNDICE B - Análise da produção de H₂S

Isolado	Produção de H ₂ S	Isolado	Produção de H ₂ S
1	-	52	-
2	-	53	-
3	-	54	-
4	-	56	-
5	+	58	+
6	-	60	-
7	-	61	-
8	-	62	+
9	-	63	+
10	-	64	+
11	-	65	+
13	-	66	-
14	-	67	+
16	+	68	-
17	-	70	-
18	-	71	-
19	-	73	-
20	+	74	+
22	+	75	-
23	+	77	-
24	-	79	-
25	-	81	-
26	-	85	+
27	-	86	-
28	-	87	-
30	-	88	-
31	-	90	+
32	-	91	+
33	-	92	-
34	+	94	-
35	+	95	-
36	+	96	-
37	+	98	-
38	-	99	+
39	+	103	+
40	-	104	-
41	-	105	-
45	-	106	-
46	+	109	-
47	-	112	+
48	-	115	-
51	-	117	-

APÊNDICE C - Amostras isoladas e locais de coleta com seus produtos de amplificação e fragmentos obtidos pela digestão com as enzimas de restrição *Hae III*, *Rsa I* e *Hinf I*

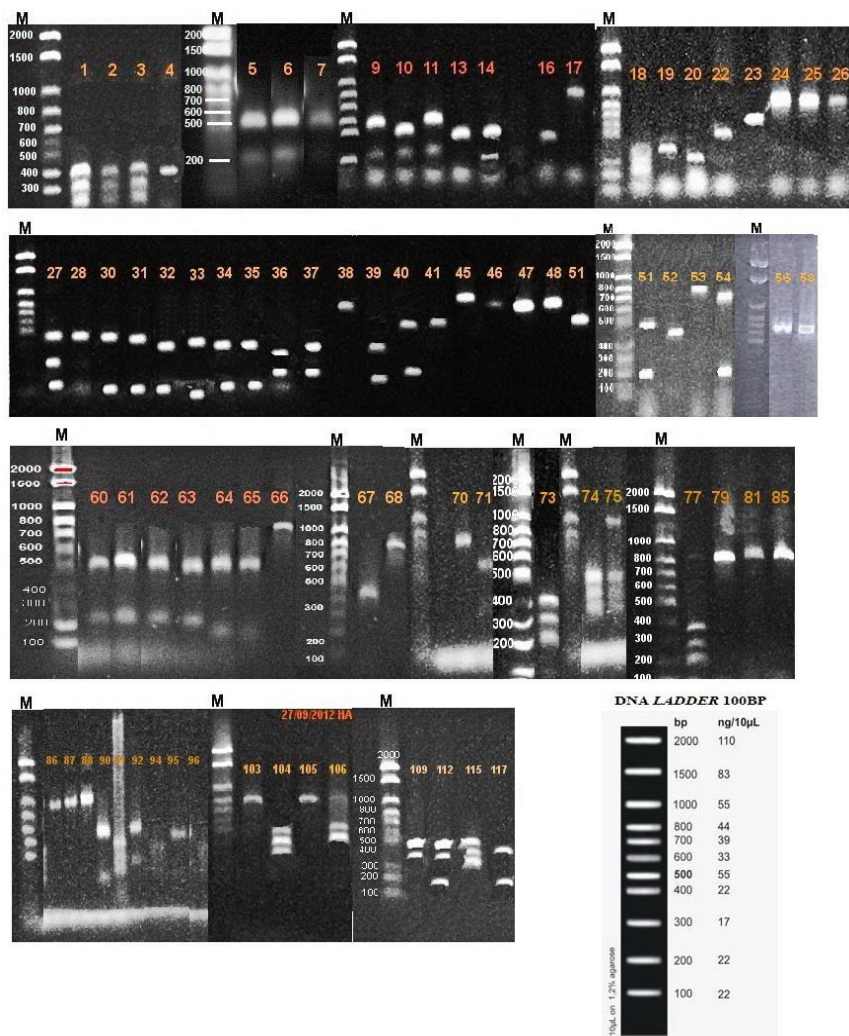
Isolado	Local	Tamanho do produto de PCR (pb)	Tamanho dos fragmentos de restrição (pb)		
			<i>Hae III</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>
1	C	900	400+300+200	750	450+200
2	C	900	400+300+200	700	400+200
3	C	900	400+300+200	700	400+200
4	F	600	400	500	300+200
5	F	700	500+200	500+200	400
6	F	750	500+250	600+200	400
7	F	750	500+250	600	450
8	F	800	750+50	600+200	500
9	F	800	600 + 200	600 + 200	500
10	F	800	500+200	600+200	400
11	F	900	600 + 300	700 + 150	500
13	F	600	500	500+100	400
14	F	800	500+200+100	600+200	400
16	F	600	500+100	600	400
17	F	800	800	800+100	400
18	F	600	300+200+100	600+200	400
19	F	800	500	550	400
20	F	600	400 + 200	550	350
22	F	800	580	600	350
23	F	700	700	600	500
24	F	800	800	700	500
25	F	800	800	500	750
26	F	800	800	700	400
27	F	900	500+200+100	500	400
28	F	700	500	600	400
30	F	800	500+100	500	300
31	F	800	500+100	500	300
32	F	500	400+100	400	300
33	1P	700	450+250	400+200	380
34	1P	500	400+100	400	300
35	1P	500	400+100	400+250	300
36	1P	500	300+200	400	300
37	1P	670	400+270	400	300
38	1P	700	700	600	400+200
39	1P	500	400+100	400	250
40	2P	800	600+200	700	350+250+100
41	2P	600	500	500	300
45	3P	800	700+100	550	350+250
46	3P	800	700+200	800	500
47	3P	700	700	550+200	500
48	3P	700	700	550+200	500
51	4P	700	500+200	600	300
52	4P	600	450	600	300
53	4P	800	800	800	500+400
54	4P	800	700+200	700	500+300
56	5P	500	400	400	300
58	5P	600	400	500	600
60	5P	600	500+100	600	300
61	5P	600	500+100	600	300
62	5P	650	500+150	600	300
63	5P	650	500+150	600	300
64	5P	600	500	550	300

APÊNDICE C - Amostras isoladas e locais de coleta com seus produtos de amplificação e fragmentos obtidos pela digestão com as enzimas de restrição *Hae III*, *Rsa I* e *Hinf I* (cont.)

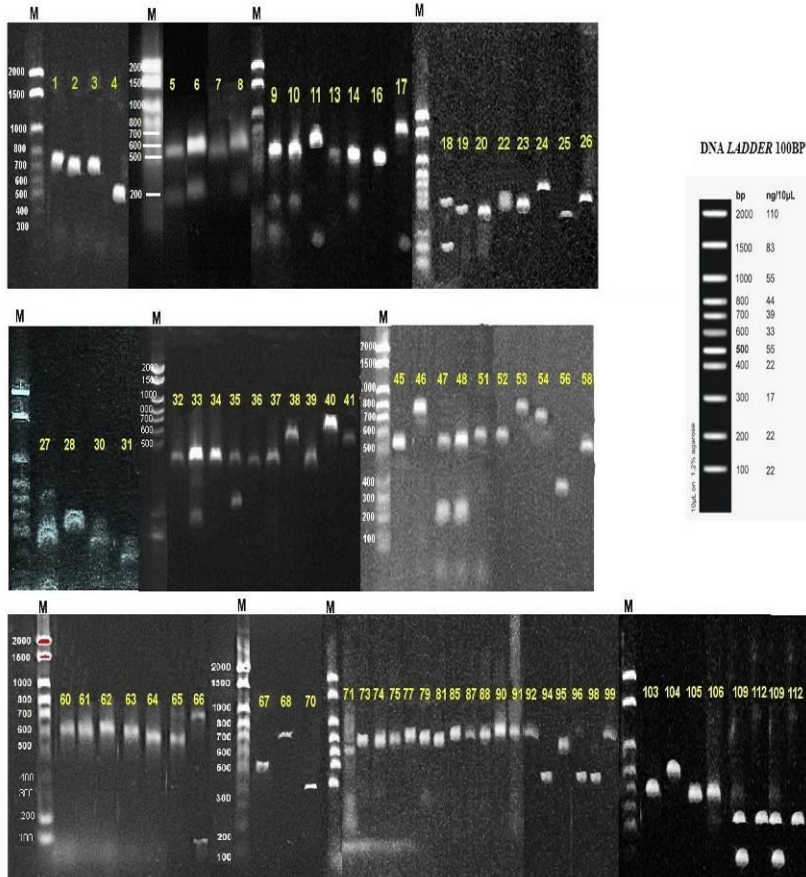
Isolado	Local	Tamanho do produto de PCR (pb)	Tamanho dos fragmentos de restrição (pb)		
			<i>Hae III</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>
65	5P	500	500	550	250
66	5P	800	750+50	700+100	450+250
67	5P	500	400	550	300
68	5P	800	800	700	400
70	5P	800	700	400	300
71	1P	600	400	700	400
73	E	900	400+300+200	800	600
74	E	900	400+300+200	800	600
75	E	900	800	800	700
77	E	900	400+300+200	800	600
79	E	800	800	800	400+300
81	E	900	900	800	800
85	E	900	900	800	500+400
86	E	800	800	800	600
87	E	900	800	800	600
88	E	700	800	800	600
90	E	900	600+100	800	600
91	E	650	500	800	600
92	E	900	500+100	800	600
94	5P	600	400+100	500	400
95	5P	800	400+300+100	700	400
96	5P	600	400	500	300
98	6P	800	400+100	500	400
99	6P	600	300+100	700	400
103	E	800	800	700	500+400
104	E	900	500+400+300	800	800
105	E	850	800	700	800
106	E	800	500	700	700
109	E	800	500+400	600	400+300
112	E	900	400+300+200	800	400
115	5P	900	500+400+300	800	600
117	5P	800	400+100	500	350

Legenda: C – Comercial; F – Florianópolis; 1P – Propriedade 1; 2P – Propriedade 2; 3P – Propriedade 3; 4P – Propriedade 4; 5P – Propriedade 5; 6P – Propriedade 6; E – EPAGRI

APÊNDICE D - Géis de agarose com padrões de restrição da enzima *HAeIII* dos 84 isolados (M: DNA ladder)



APÊNDICE D - Géis de agarose com padrões de restrição da enzima *RSAI* dos 84 isolados (M: DNA ladder) (cont.)



APÊNDICE D - Géis de agarose com padrões de restrição da enzima *HINF* dos 84 isolados (M: DNA ladder) (cont.)

