



## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DE CALDO DE CANA DE UMA INDÚSTRIA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NO NORDESTE BRASILEIRO

Suzana Claudia Silveira Martins<sup>1</sup>, Renata Felix de Lima<sup>2</sup>, Claudia Miranda Martins<sup>1</sup>

1 Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará ([suzana220@gmail.com](mailto:suzana220@gmail.com)) Fortaleza-Brasil

2 Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro ([refelix07@hotmail.com](mailto:refelix07@hotmail.com))

Recebido em: 08/09/2015 – Aprovado em: 14/11/2015 – Publicado em: 01/12/2015

DOI: [http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia\\_Biosfera\\_2015\\_020](http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_020)

### RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi por muito tempo a principal matéria-prima para a produção de açúcar e álcool. A desvalorização do açúcar e o crescente esgotamento dos combustíveis fósseis contribuíram para a gradativa substituição dos engenhos por usinas para a produção de bioetanol, um combustível alternativo com preço competitivo e de baixo impacto ambiental. A *Saccharomyces cerevisiae* é o principal agente fermentador desse processo, mas outras leveduras da microbiota do caldo de cana podem competir pelo substrato e reduzir a eficiência do processo. Por outro lado, essas leveduras podem representar um potencial ainda inexplorado para produção de etanol por fermentação de outros substratos. Nessa perspectiva, o presente estudo teve por objetivo isolar e caracterizar leveduras do caldo de cana, inclusive quanto ao fenótipo killer, ferramenta auxiliar na tipificação de cepas de leveduras de fermentação alcoólica. Foram isoladas 69 colônias que foram classificadas em nove grupos de acordo com as características culturais. A presença de ascósporos foi evidenciada em 44 cepas enquanto blastoconídios isolados e em pseudomicélio foram observados em 25 cepas. Nenhuma das cepas foi capaz de hidrolisar uréia e apenas uma foi hábil para reduzir o nitrato. A presença de ascósporos aliada as características bioquímicas foram sugestivas dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia* e *Hansenula* enquanto a evidência de blastoconídios e pseudomicélio foi sugestiva do gênero *Candida*. Nenhuma das cepas avaliadas foi sensível as cepas killer padrão e somente cepa identificada como *Pichia* CE025 apresentou fenótipo killer em relação às cepas sensível padrão.

**PALAVRAS-CHAVE:** bioetanol, fungos, morfologia,

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF YEASTS FROM SUGAR CANE JUICE

#### ABSTRACT

The sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) has long been the main raw material for the production of sugar and alcohol. The devaluation of the sugar and the growing depletion of fossil fuels contributed to the gradual replacement of the mills by plants

for the production of bioethanol, an alternative fuel with competitive price and low environmental impact. *Saccharomyces cerevisiae* is the main agent fermenter of this process, but other yeasts of sugarcane juice microbiota can compete for the substrate and reduce the process efficiency. Moreover, these yeasts can represent an untapped potential for production of ethanol by fermentation of other substrates. From this perspective, this study aimed to isolate and characterize yeasts from sugarcane juice, including phenotype killer, important tool to typing strains of alcoholic fermentation. Sixty nine colonies were isolated and classified into nine groups according to the cultural characteristics. The presence of ascospores was observed in 47 strains blastoconidia isolated and as pseudomycelium were observed in 23 strains. None of the strains was able to hydrolyze urea and gelatin and only one was able to reduce nitrate. The presence of ascospores combined with the biochemical characteristics was suggestive of the *Saccharomyces*, *Pichia* and *Hansenula* while blastoconidia and pseudomycelium was suggestive of the *Candida* genus. No strains were sensitive to standard killer strains and only strain identified as *Pichia* CE025 presented phenotype killer over the default sensitive strains.

**KEYWORDS:** Fungi, morphology, bioethanol

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de álcool de cana de açúcar (AMORIM et al., 2011). Esse combustível pode ser produzido através da fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço por cepas selecionadas de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Em geral, essas cepas são oriundas de indústrias do Estado de São Paulo, e, portanto adaptadas para as condições climáticas dessa região (BATISTOTE et al., 2010). Essa adaptação é crucial para o sucesso do processo, uma vez que, as condições meteorológicas podem causar estresse das cepas de leveduras comerciais e interferir no desempenho da fermentação (SILVA et al., 2011).

A fermentação do caldo de cana permite a obtenção do etanol em baixas concentrações, a separação do etanol do mosto é feita por destilação. Se o teor de álcool, após referida operação, variar de 80% a 97,2% v/v, o líquido é chamado de álcool hidratado e pode ser usado como combustível. Se apresentar em torno de 38-48% v/v de etanol o líquido é denominado aguardente, que, em geral, é utilizado como bebida. Neste caso, a destilação do mosto ocorre em alambiques, que não apresentam coluna de destilação fracionada, portanto, um processo de separação menos eficiente (PEIXOTO et al., 2012).

Apesar do uso de cepas selecionadas, a condição não estéril dos substratos torna o processo fermentativo susceptível a contaminação pela microbiota nativa do caldo de cana. Bactérias e leveduras, genética e fisiologicamente adaptadas às condições ambientais, podem causar sérios problemas na fermentação (SILVA-FILHO et al., 2005; CUNHA et al., 2006). A redução da viabilidade celular devido a produção e secreção de substâncias tóxicas pela microbiota contaminante é um dos principais interferentes na redução do rendimento industrial (ANDRIETTA et al., 2007).

Leveduras contaminantes podem predominar no processo fermentativo, devido à fatores como melhor adaptação na competição por nutrientes, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e proporção inicial significativa (TAVARES, 1992; FREITA et al., 2014). Assim, o controle desses contaminantes se constitui um dos principais objetivos da indústria sucroalcooleira.

Cumprir destacar que algumas das cepas de leveduras naturais também podem apresentar características desejáveis para a eficiência do processo (ANTONANGELO, 2012). Nessa perspectiva, o conhecimento da microbiota de leveduras do caldo de cana, uma das principais matérias primas para produção de bioetanol, é importante para combater os contaminantes bem como, para a seleção de cepas promissoras para aumentar a eficiência do processo. Ressalte-se, que as pesquisas sobre contaminantes da fermentação alcoólica são concentradas, preferencialmente, em problemas relativos às contaminações bacterianas.

Embora, a caracterização morfológica apresente inconvenientes como tempo para obtenção de resultados e dificuldade de diferenciação entre espécies, referidas características são ferramentas úteis para selecionar e diferenciar a nível de gênero leveduras de processos fermentativos (REIS et al., 2013).

Ressalte-se ainda, que como a maior produção de cana de açúcar, e, em consequência usinas de álcool, estão na região Centro-Sul do Brasil (594,1 milhões de toneladas em 2013/2014), a maioria dos estudos sobre a microbiota contaminante do caldo de cana são realizados em amostras procedentes de indústrias dessas regiões. No entanto, na região Norte-Nordeste do Brasil, o cultivo da cana de açúcar é bastante tradicional, possivelmente, pela extensa área territorial, com clima e solo propício para o cultivo da referida planta. Assim, a produção embora 10 vezes menor, em relação a região Centro-Sul, (57,92 milhões), apresentou um aumento de 3,6% em relação ao ano anterior, 2012/2013 (CONAB, 2013).

Tendo em vista o potencial da região Nordeste para produção de bioetanol, aliado ao fato das cepas de leveduras estarem adaptadas às condições ambientais adversas da referida região, esse trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar por métodos tradicionais a microbiota de leveduras do caldo de cana proveniente de dornas de uma indústria de fermentação etanólica na região do Nordeste Brasileiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostragem**

Amostras de caldo de cana primário foram coletadas de quatro dornas de uma indústria de fermentação etanólica localizada no município de Maranguape-CE, Latitude: 03° 53' 27" S; Longitude: 38° 41' 08" W na região Nordeste do Brasil, no período de quatro meses. Foram realizadas quatro coletas equivalentes a uma por mês. Em cada dorna foram coletadas em pontos aleatórios duas amostras de 250 mL totalizando 500 mL de caldo de cana por dorna e 2000 mL por coleta. As duas subamostras de cada dorna representaram uma amostra, totalizando quatro amostras por coleta. As amostras de caldo de cana em frascos de vidro estéreis foram etiquetadas, conservadas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### **Preparação das amostras**

As amostras de caldo de cana foram homogêneas e 25 mL foram adicionados a 225 mL de solução salina a 0,85% (diluição  $10^{-1}$ ), a partir da qual foram preparadas diluições decimais seriadas até  $10^{-5}$ .

## Isolamento das colônias

As amostras diluídas foram inoculadas em triplicata em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Oxoid) com adição de 0,2 g L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Merck, Darmstadt, Germany) para inibir o crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 28 °C e examinadas diariamente por sete dias (CHATTERJEE et al., 2011). Três a cinco colônias com características diferentes foram selecionadas em cada diluição e reisoladas em placas contendo SDA. As colônias selecionadas foram codificadas como CE001, CE002, CE003 respectivamente e mantidas em meio YEPD (Levedura Extrato Peptona Dextrose) inclinado coberto com óleo mineral a 4 °C no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

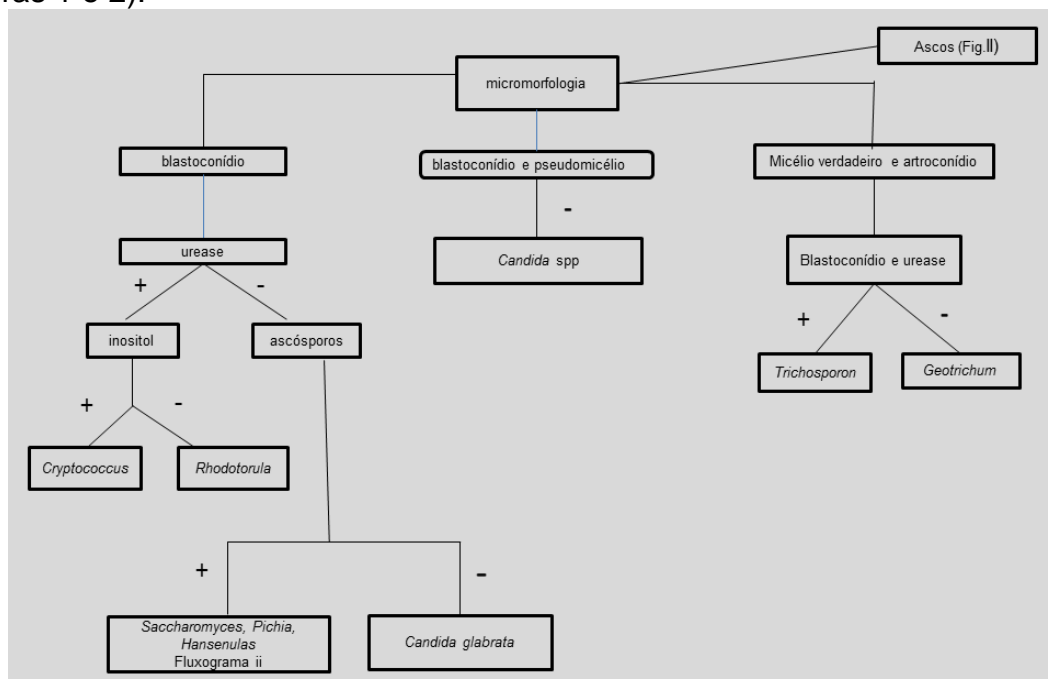
## Caracterização macromorfológica

### Aspectos das colônias

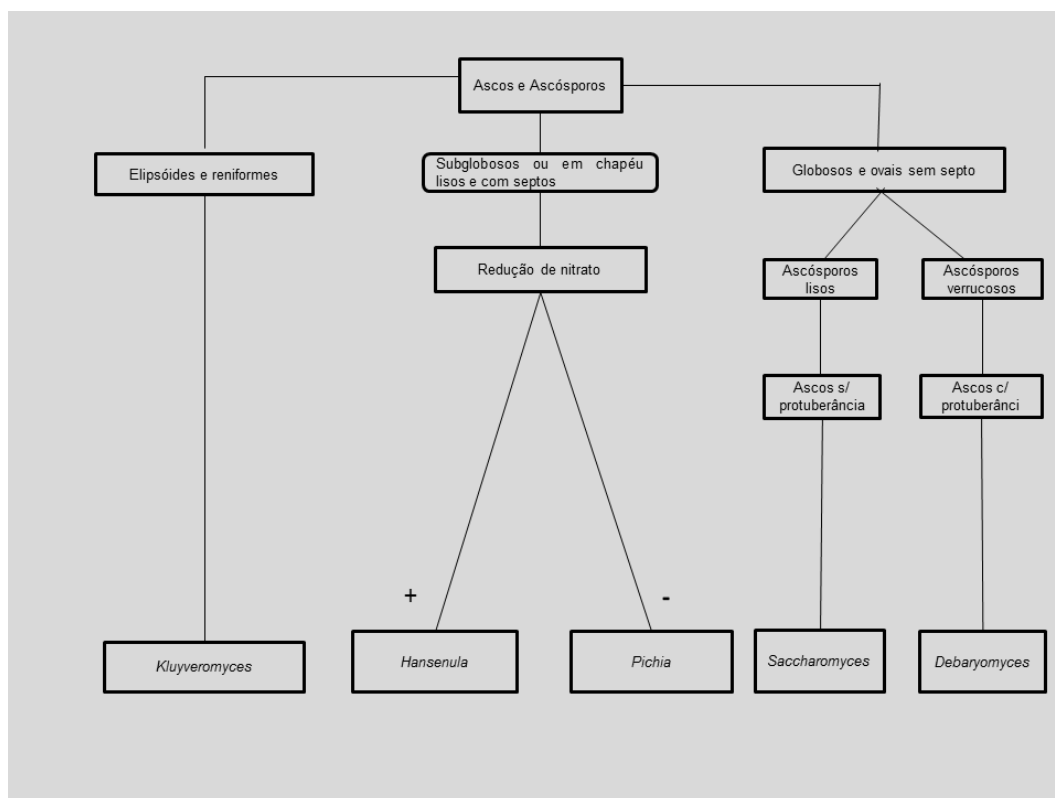
As colônias das leveduras selecionadas foram avaliadas quanto a cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, etc), ao brilho (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou fusiforme), superfície (lisa ou rugosa) e elevação (plana, convexa, umbonada) (YARROW, 1998).

### Caracterização micromorfológica

Foram preparadas lâminas a fresco a partir do crescimento de culturas em Ágar YEPD com, no máximo, uma semana de incubação a 25 °C e a observação foi feita em microscópio óptico com aumento de 40x a 100x. Os caracteres morfológicos celulares observados foram: forma da célula, presença de pseudomicélio e tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) (KURTZMAN & FELL, 1998; BARNETT et al., 2000). Neste estudo, foi adaptado o sistema de classificação simplificado proposto por SIDRIM & MONTEIRO (1999) para leveduras clínicas (Figuras 1 e 2).



**FIGURA 1** - Fluxograma I: Identificação de Leveduras. Adaptado de SIDRIM & MONTEIRO (1999).



**FIGURA 2-** Fluxograma II: Identificação de leveduras ascósporas. Fonte: SIDRIM & MONTEIRO (1999)

### Microcultivo em lâmina

O microcultivo (cultivo em lâmina) foi a técnica escolhida para observação de pseudohifa ou de hifa verdadeira. Dentro de uma placa de Petri, foram colocados dois palitos, uma lâmina de microscopia (sobre os palitos), uma lamínula e um chumaço de algodão. Após esterilização do material foram colocados assepticamente 1-2 mL do meio de cultura SDA (Difco), sobre a lâmina de microscopia. Após solidificação do meio, as cepas de leveduras foram inoculadas por estriamento com agulha de inoculação sobre o meio de cultivo. A lamínula foi colocada sobre o inóculo e adicionada água destilada estéril sobre o algodão. Essas placas foram incubadas a 25 °C e observadas diariamente por até sete dias ao microscópio óptico Zeiss Axioplan em aumento de 40x (BARNETT et al., 2000).

### Formação de ascósporas

As cepas de leveduras selecionadas foram inoculadas em placas contendo o meio de cultura Goradkova, com a seguinte composição em g L<sup>-1</sup>: glicose 1, peptona 10, cloreto de sódio 5 e ágar 25. A quantidade reduzida de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascósporas. As placas foram incubadas a temperatura de 25 °C e examinadas diariamente por até 14 dias. As características observadas em microscopia óptica foram: forma, superfície e elevação dos ascósporas (BARNETT et al., 2000). Devido à dificuldade de visualização dos ascósporas em montagens diretas em água de alguns isolados, foi empregado o método de coloração de esporos denominado método de Wirtz que cora os esporos de verde azulado e as células vegetativas de vermelho. No esfregaço da cultura teste, cobriu-se a lâmina com uma solução aquosa de verde malaquita 5%, aquecendo-a até a emissão de vapores por cinco minutos. Lavou-se

e, posteriormente realizou-se a contra-coloração com uma solução aquosa de safranina por 30 segundos. Após lavagem e secagem da lâmina, examinaram-se os ascósporos em objetiva de imersão (CASTRO, 1995).

### **Hidrólise da uréia**

As cepas de leveduras foram inoculadas no caldo uréia de Stuart com a seguinte composição em g L<sup>-1</sup>: extrato de levedura 0,1, fosfato monopotássico 9,1, fosfato dissódico 9,5, uréia 20, vermelho de fenol 0,01, pH ajustado para 6.8. O meio base foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e uma solução estoque de uréia a 20% foi previamente esterilizada por filtros de acetato de celulose de 0,22 µm para posterior adição no meio base. As culturas foram incubadas a 25 °C com observação após duas, quatro e 24 horas. Os tubos negativos foram mantidos na estufa por quatro dias, devido a possíveis reações retardadas. A presença de uma cor vermelha caracterizou a positividade do teste (BARNETT et al., 2000).

### **Redução do nitrato**

As cepas de leveduras foram inoculadas no meio ágar nitrato com a seguinte composição em g L<sup>-1</sup>: extrato de carne 3, peptona 5, nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) livre de nitrito 1, ágar 12. Em seguida, procedeu-se a incubação das culturas a 25 °C por 18-24 horas. Após esse período e antes da leitura, foram adicionados aos tubos inoculados 1 mL do reagente A (5 g de alfa-naftilamina para 1000 mL de ácido acético (5N), 30%) e 1 mL do reagente B (98 g de ácido sulfanílico para 1000 mL de ácido acético (5N), 30%). O desenvolvimento de uma coloração vermelha em 30 segundos indicou a presença de nitrito (reação positiva). Os tubos que não apresentaram nenhuma cor poderiam ser considerados negativos, porém como o reagente revela somente nitritos essa leitura poderia ser falso negativo. Assim, adicionou-se uma pequena quantidade de pó de zinco aos tubos negativos. Os íons de zinco reduzem nitratos a nitrito e o desenvolvimento da cor após a junção desse pó indicou a presença de nitratos residuais e confirmou uma reação negativa verdadeira (BARNETT et al., 2000).

### **Assimilação de fontes de carbono - Auxanograma**

Os carboidratos, manose, celobiose, arabinose e inositol foram adicionados ao meio de cultivo com a seguinte composição (sulfato de amônio 5g, fosfato monopotássico 1g, sulfato de magnésio 0,5g, ágar 15g, água destilada q.s.p.100 mL, autoclavado a 115 °C por 15 min. Alíquotas de 40 mL do meio fundido foram distribuídos em placas de Petri com 2 mL das suspensões das cepas de leveduras isoladas. Com a ponta de uma espátula foram adicionados os distintos carboidratos em diferentes pontos. As placas foram incubadas a 25 °C durante 2-3 dias sendo consideradas positivas todas as cepas que apresentaram uma zona de crescimento macroscópico em torno do local onde foi adicionado o açúcar (BARNETT et al., 2000).

### **Fermentação da galactose**

As cepas de leveduras foram inoculadas num meio base de fermentação (peptona 4,5g, extrato de levedura 2,7g, azul de bromotimol 0,03g, etanol 95% 1,8 mL, e água destilada q.s.p. 600 mL) adicionado de uma solução a 3% do carboidrato galactose previamente esterilizada por filtração. Os tubos foram incubados a 25 °C por um a 15 dias. A formação de gás no tubo de Durham caracterizou a positividade

do teste. A mudança da cor do meio para amarelo foi indicativa da produção de ácido (BARNETT et al., 2000).

### **Crescimento a 37 °C**

As cepas de leveduras foram inoculadas no meio MYPD (peptona, dextrose, extrato de levedura e extrato de malte) e incubadas a 37 °C por 48 horas. A presença de turvação foi indicativa de crescimento (TOSTA, 2004).

### **Determinação do fenótipo killer e sensível**

#### **Micro-organismos**

Foram avaliadas as 69 cepas de leveduras previamente isoladas e caracterizadas a nível de gênero. As cepas de referência padrão de sensibilidade killer, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 (National Culture Yeast Collection) e *Candida glabrata* Y55 ATCC 90525 (American Type Culture Collection) ambas K<sup>-</sup>R<sup>-</sup>, foram utilizadas como controle positivo. As linhagens que sofreram inibição do crescimento pela toxina foram consideradas positivas para a sensibilidade (K<sup>-</sup>). As cepas que não apresentaram formação de halo foram consideradas resistentes ou imunes a cepa killer avaliada. A cepa *Saccharomyces cerevisiae* NCYC232, produtora da toxina K1, e a cepa *Saccharomyces cerevisiae* NCYC732, produtora da toxina K2, ambas (K<sup>+</sup>R<sup>+</sup>) foram utilizadas como levedura killer padrão. Essas cepas foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### **Padronização do inóculo**

As 69 cepas isoladas e as cepas padrão (sensíveis e positivas) foram inoculadas em SDA incubadas por 24 horas a 25 °C. Após esse período foram selecionadas 3-5 colônias de cada cepa que foram suspensas em 5mL de solução salina estéril (salina a 0,85%). As suspensões resultantes foram colocadas em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a absorbância equivalente a uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530nm correspondente a uma suspensão-padrão contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:10 resultando em concentração de  $1,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^5$  células por mL.

#### **Fenótipo killer**

Uma alíquota de 100 µL de cada uma das cepas sensíveis padrão *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Candida glabrata* Y55 foram semeadas com swab na superfície das placas contendo o meio Agar-YEPD-MB (extrato de levedura, peptona, dextrose e azul de metileno), com a seguinte composição (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 2% agar e 0,003% azul de metileno, tamponado a pH 4,5 – 4,7 com ácido cítrico 0,2M e difosfato de potássio 0,2M previamente esterilizado (RODRIGUÉZ et al., 1998). As placas, foram incubadas após 30 minutos a 25 °C. Em seguida, as cepas isoladas (69) foram inoculadas com alça formando pontos na superfície do ágar e as placas incubadas a 25 °C por três a quatro dias. A produção de toxina killer foi indicada pela presença de um halo de inibição de crescimento ao redor do ponto de inoculação, acompanhado de uma

região azul adjacente, que representa as células mortas coradas pelo azul de metileno. Para ser considerada killer, a levedura deve apresentar essa característica contra, pelo menos, uma das cepas sensíveis de referência (OLIVEIRA, 2009; ANTUNES & AGUIAR, 2012). A cepa killer padrão *Saccharomyces cerevisiae* NCYC232, produtora da toxina K1, foi utilizada como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata para cada uma das 69 cepas de leveduras avaliadas.

### **Fenótipo sensível e neutro**

O teste de sensibilidade e neutralidade ao fator killer refere-se a leveduras que, respectivamente, respondem e não respondem à ação da proteína killer. Uma alíquota de 100 µL de cada uma das cepas killer padrão *Saccharomyces cerevisiae* NCYC232 K1 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC732 K2 foram semeadas com *swab* na superfície de placas contendo o meio Agar-YEPD-MB tamponado a pH 4,5-4,7. As placas, em triplicatas, foram incubadas após 30 minutos a 25 °C. Em seguida, as 69 cepas de leveduras selecionadas foram inoculadas com alça formando pontos na superfície de cada placa previamente inoculada com a cepa selecionada. Cada cepa foi testada em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C por três a quatro dias. A sensibilidade foi evidenciada pela presença de um halo de inibição do crescimento ao redor do ponto de inoculação, assim como pela formação de um círculo azul formado pelas células mortas coradas pelo azul de metileno, ou seja, as linhagens que sofreram inibição do crescimento pela toxina foram consideradas positivas para a sensibilidade (K-). As cepas que não apresentaram formação de halo foram consideradas resistentes ou imunes a cepa killer avaliada (TOSTA, 2004). Esses resultados representam, respectivamente, os fenótipos K<sup>-</sup>R<sup>-</sup> e K<sup>-</sup>R<sup>+</sup> (SILVA, 1996). A cepa referência padrão de sensibilidade *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 e *Candida glabrata* Y55 ATCC 90525 foram utilizadas como controle positivo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram bioprospectados 69 cepas de leveduras de amostras de caldo de cana natural. As características culturais dessas cepas estão na Tabela 1. Quarenta colônias, representando 58,6% das cepas de leveduras avaliadas foram circulares, côncavas, de superfície lisa e coloração creme. Observa-se também que aproximadamente 90% exibiram superfície lisa e 5,8%, rugosa. Quanto a cromogenêse as cores prevalentes foram creme (58,6%) e branca (41,4%). Um total de 71,5% das colônias foram brilhantes e 28,7%, opacas.

CAMARGO (2013) trabalhando com 46 cepas de leveduras industriais isoladas na região centro-oeste do Brasil constatou a presença de colônias com textura lisa (93,5%) ou rugosa (6,5%), opaca (82,6%) ou brilhante (17,4%) e cores branca (76,1%) ou creme (8,7%). Comparando esses valores com os do presente trabalho, a superfície das colônias foi semelhante, mas os detalhes ópticos foram o inverso, uma vez que as colônias das cepas avaliadas no presente estudo foram predominantemente brilhantes.

Quanto a pigmentação, embora as cores branca e creme tenham sido as mais evidentes em ambos estudos, no presente trabalho a cor creme foi registrada em 58,6% e em somente 8,7% na pesquisa de CAMARGO (2013).



**TABELA 1** Características culturais das colônias de leveduras isoladas de amostras de caldo de cana de uma indústria de fermentação alcoólica do Estado do Ceará.

Grupos	Características	Cepas	Nºcolônias	%
I	Circular, côncava, lisa, brilhante, creme	CE001, CE002, CE003, CE004, CE007, CE010, CE018, CE021, CE024, CE027, CE028, CE030, CE031, CE039, CE055, CE059, CE061, CE063, CE068, CE073, CE074, CE075, CE076, CE082, CE084, CE088, CE093, CE094, CE096, CE097, CE098, CE099, CE100, CE102, CE103, CE104, CE106, CE107, CE108, CE109	40	57,9
II	Circular, côncava, lisa, brilhante, branca	CE009, CE016, CE017, CE067, CE101	05	7,2
III	Circular, côncava, lisa, brilhante, com halo, branca	CE029, CE032, CE033, CE036	04	5,8
IV	Circular, côncava, lisa, opaca, branca	CE005, CE006, CE008, CE012, CE019, CE020, CE025, CE047, CE089	09	13,0
V	Circular, protuberante, lisa, opaca, branca	CE014	01	1,4
VI	Circular, protuberante, rugosa, opaca, branca	CE022, CE023, CE026, CE038	04	5,8
VII	Circular, achatada, lisa, opaca, branca	CE091	01	1,4
VIII	Circular, plana, lisa, opaca, branca	CE057, CE060, CE070	03	4,3
IX	Rizóide, opaca, grande, branca	CE056, CE066	02	2,9

Embora os dois trabalhos reportem a caracterização cultural de leveduras, é possível relacionar as diferenças a origem das cepas dos dois trabalhos. SILVA et al. (2011) isolaram e caracterizaram leveduras de caldo de cana de uma destilaria de álcool de Mato Grosso do Sul, no Centro-oeste brasileiro, mesmo substrato da pesquisa em questão. Os autores reportaram 16 diferentes morfotipos de colônias,

superior a desse estudo, onde nove grupos coloniais foram detectados (TABELA 1). Ainda com relação ao estudo de SILVA et al. (2011) três colônias (1,9%) foram rugosas e 13 (81,3%) lisas, 12 (75%) de cor creme e 1,3% brancas. Esses valores foram semelhantes ao do presente estudo, o que reforça a influência do substrato nas características das cepas de leveduras.

Embora, as características macroscópicas sozinhas, não sejam suficientes para identificação de leveduras, as mesmas se constituem uma importante ferramenta no processo clássico de identificação (SILVA et al., 2011) e são sugestivas da diversidade desse grupo microbiano. Nesta pesquisa, o agrupamento das cepas de leveduras em nove grupos diferentes indica a diversidade cultural das mesmas no caldo de cana.

Assim como descrito por CAMARGO (2013), microscopicamente as leveduras avaliadas apresentaram formato prevalentemente circulares e ovais. A forma apiculata foi detectada em algumas cepas. A reprodução por brotamento foi predominante entre as cepas avaliadas.

A caracterização micromorfológica indicou a presença de blastoconídio e pseudomicélio em 25 cepas de leveduras (36,2%) previamente classificadas em quatro diferentes grupos culturais. Referidas estruturas foram sugestivas do gênero *Candida* spp (SIDRIM & MONTEIRO, 1999). As cepas de cada grupo cultural foram testadas quanto ao metabolismo assimilativo dos carboidratos manose, celobiose, arabinose e inositol e quanto a fermentação da galactose. Os resultados permitiram o agrupamento das cepas conforme exposto na Tabela 2.

**TABELA 2** Diversidade bioquímica das cepas de leveduras do gênero *Cândida* culturalmente diferentes isoladas do caldo de cana.

Grupos culturais	Assimilação				Fermentação	Cepas
	man	cel	ara	inos	gal	
I	+	+	+	-	-	CE001, CE002, CE027
	+	+	+	-	+	CE003
	+	-	-	-	-	CE004
	-	-	-	+	-	CE007
	+	+	-	-	-	CE010
	+	-	+	-	-	CE031
	-	-	-	-	-	CE073, CE074, CE104, CE106, CE108
	+	+	-	+	+	CE076
	-	+	+	-	-	CE102
	+	+	+	+	-	CE103, CE109
II	-	-	+	-	-	CE009
	+	+	-	-	-	CE016
III	+	+	+	-	+	CE032
IV	+	+	-	-	-	CE005, CE012
	-	-	-	-	+	CE006
	+	+	+	-	-	CE008
	-	-	-	-	-	CE089

(+): Presença; (-) Ausência; man=manose; cel=celobiose; ara=arabinose; inos=inositol; gal=galactose

No grupo I, as cepas foram classificadas em 10 sub-grupos de acordo com as características bioquímicas avaliadas. As duas cepas do grupo II, apresentaram

perfil metabólico diferentes, sendo assim alocadas em dois sub-grupos. O grupo III tinha apenas uma cepa, que foi classificada em um único sub-grupo. As cinco cepas do grupo V, foram separadas em quatro sub-grupos em relação ao metabolismo dos carboidratos estudados. Quanto a pesquisa da sensibilidade ao fator killer, todas as cepas foram classificadas como neutras para as cepas padrões *Saccharomyces cerevisiae* NCYC232, produtora da toxina K1, e a *Saccharomyces cerevisiae* NCYC732, produtora da toxina K2. O fenótipo killer também não foi detectado em nenhuma das cepas avaliadas tendo como referência padrão de sensibilidade a cepa *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 e *Candida glabrata* Y55 ATCC 90525. Assim todas as cepas do gênero *Candida* foram classificadas como K<sup>-</sup>R.

Tendo em vista que a absorção de pentoses é um pré-requisito para o sucesso da fermentação da biomassa lignocelulósica resultante da extração do caldo de cana, é importante destacar que oito cepas de *Candida* (32%), foram capazes de assimilar arabinose, um carboidrato não convencional (pentose) presente no bagaço de cana e que pode ser convertido em etanol de segunda geração. Embora se constitua o terceiro carboidrato mais abundante na parede celular de plantas, ainda são escassos estudos para o aproveitamento desse carboidrato (YOUNG et al., 2010; SUBTIL & BOLES, 2011). Nessa mesma linha de raciocínio, 10 cepas de *Candida* (40%) assimilaram a celobiose, um dissacarídeo presente nos hidrolisados de celulose, que também representa um substrato promissor para produção de bioetanol (DASHTBAN et al., 2009).

Em 44 cepas de leveduras foi detectada a presença de blastoconídios isolados, urease negativa e presença de ascósporos. Essas cepas quando observadas para o teste específico para a formação dessa estrutura apresentaram dois tipos de ascósporos: lisos, ovais sem septos e protuberância, sugestivos do gênero *Saccharomyces* e na forma de chapéu com superfície lisa e septos (TABELA 3). Dessas últimas, apenas uma cepa foi nitrato positiva, indicativa do gênero *Hansenula*, as demais foram incapazes de reduzir o nitrato sugerindo a presença do gênero *Pichia* (Figura 2).

**TABELA 3** Características ascósporos cepas de leveduras isoladas do caldo de cana.

Cepas	Ascósporos	Provável gênero
CE014, CE017, CE018, CE019, CE020, CE021, CE022, CE023, CE026, CE029, CE036, CE038, CE039, CE047, CE057, CE059, CE060, CE061, CE063, CE066, CE070, CE075, CE082, CE084, CE088, CE093, CE096, CE097, CE107	lisos, ovais sem septos e sem protuberância	<i>Saccharomyces</i>
CE024, CE025, CE028, CE030, CE033, CE055, CE056, CE067, CE068, CE091, CE098, CE099, CE100, CE101,	forma de chapéu com superfície lisa e septos	<i>Pichia</i>
CE094	Forma de chapéu com superfície lisa e septos Redução de nitrato (+)	<i>Hansenula</i>

As 44 cepas de leveduras ascopógenas (63,8%) foram classificadas em nove grupos culturais e as cepas de cada grupo foram agrupadas de acordo com as

características bioquímicas. No grupo I, as cepas foram classificadas em 12 sub-grupos, as cepas dos grupos II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, foram classificadas em 3, 3, 5, 1, 3, 1, 3 e 2 sub-grupos, respectivamente (TABELA 4).

**TABELA 4** Diversidade bioquímica de cepas de leveduras ascoporógenas culturalmente diferentes isoladas do caldo de cana

Grupo s cultura is	Assimilação				Fermenta ção gal	Cepas	Provável gênero
	ma n	ce l	ara	inos			
I	+	+	-	+	-	CE018	<i>Saccharomyces</i>
	-	+	-	+	-	CE021, CE100	<i>Saccharomyces, Pichia</i>
	+	+	-	-	-	CE024, CE055	<i>Pichia, Pichia</i>
	-	-	-	-	+	CE028, CE068	<i>Pichia, Pichia</i>
	+	+	+	-	+	CE030, CE063, CE093,	<i>Pichia, Saccharomyces, Saccharomyces</i>
	+	+	+	-	-	CE098	<i>Pichia</i>
	+	-	+	-	+	CE039	<i>Saccharomyces</i>
	-	-	-	-	-	CE059, CE088, CE107	<i>Saccharomyces, Saccharomyces</i>
	-	-	-	-	-		<i>Saccharomyces</i>
	-	+	-	+	+	CE061	<i>Saccharomyces</i>
	-	+	-	-	+	CE075	<i>Saccharomyces</i>
	+	-	-	-	+	CE082	<i>Saccharomyces</i>
+	+	-	-	+	CE084	<i>Saccharomyces</i>	
+	+	+	+	-	CE099	<i>Pichia</i>	
II	+	+	-	+	-	CE017	<i>Saccharomyces</i>
	-	-	-	-	-	CE067	<i>Pichia</i>
	-	+	-	-	-	CE101	<i>Pichia</i>
III	+	-	-	-	+	CE029	<i>Saccharomyces</i>
	+	+	+	-	+	CE033	<i>Pichia</i>
	+	+	-	-	+	CE036	<i>Saccharomyces</i>
IV	+	+	-	+	+	CE019	<i>Saccharomyces</i>
	-	-	-	-	+	CE020	<i>Saccharomyces</i>
	+	-	-	-	+	CE025	<i>Pichia</i>
	+	+	-	-	+	CE047	<i>Pichia</i>
	-	-	-	-	-	CE094	<i>Hansenula</i>
	+	+	+	-	+	CE096	<i>Saccharomyces</i>
	+	-	+	+	+	CE014	<i>Saccharomyces</i>
V	+	+	-	-	+	CE022	<i>Saccharomyces</i>
	+	+	-	+	-	CE023, CE038	<i>Saccharomyces, Saccharomyces</i>
	+	-	-	-	+	CE026	<i>Saccharomyces</i>
VII	-	-	-	-	-	CE091	<i>Pichia</i>
	-	-	+	-	-	CE057	<i>Saccharomyces</i>
VIII	-	-	-	-	+	CE060	<i>Saccharomyces</i>
	-	-	-	-	-	CE070	<i>Saccharomyces</i>
	-	-	-	-	-		

(+): Presença; (-) Ausência; man=manose; cel=celobiose; ara=arabinose; inos=inositol; gal=galactose

Vinte e oito cepas foram identificadas com *Saccharomyces* spp (40,6%), 15 *Pichia* spp (21,7%) e uma (1,4%) como *Hansenula* spp. Quanto à pesquisa da sensibilidade ao fator killer, todas as cepas de leveduras ascoporógenas foram

classificadas como neutras para as cepas padrões *Saccharomyces cerevisiae* NCYC232, produtora da toxina K1, e a *Saccharomyces cerevisiae* NCYC732, produtora da toxina K2. O fenótipo killer foi detectado somente na cepa CE0025 (*Pichia*) frente as cepas referência padrão de sensibilidade *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 e *Candida glabrata* Y55 ATCC 90525, que foi classificada como K<sup>+</sup>R<sup>-</sup>. As demais cepas foram classificadas como K<sup>-</sup>R<sup>-</sup>.

REIS et al. (2013) destacaram que entre as leveduras nativas encontradas na fermentação alcoólica, colônias rugosas, em geral, pertencem às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e são indesejáveis no processo fermentativo. Assim, embora essa única característica seja insuficiente para identificar as leveduras isoladas, as cepas CE022, CE023, CE026 e CE038, classificadas como rugosas, e do gênero *Saccharomyces* são sugestivas do referido contaminante.

Embora os resultados sugiram apenas quatro gêneros de leveduras no caldo de cana, foi relevante a diversidade cultural e bioquímica observada entre as cepas desses gêneros, o que sugere um potencial enzimático promissor para seleção de cepas capazes de degradar diferentes substratos para produção de bioetanol. Além disso, diferenças bioquímicas são importantes na caracterização e classificação de novas cepas de leveduras.

É importante ressaltar que as leveduras selvagens podem dominar e melhorar a eficiência na produção de álcool ou acarretar problemas na fermentação, como baixo rendimento, formação excessiva de espumas e floculação do fermento (NAVES et al., 2010), o que reforça a importância do presente estudo.

CASTRO (1995) estudando a diversidade de leveduras na fermentação alcoólica de duas usinas de álcool em São Paulo encontrou que os gêneros *Saccharomyces* (44,8%), *Candida* (38,9%) e *Pichia* (5,4%) foram os principais contaminantes na primeira usina, enquanto na segunda foram registrados os gêneros *Candida* (43,6%) e *Saccharomyces* (33,0%). O gênero *Pichia* foi reportado somente em 0,5%. CABRINI & GALLO (1999) avaliando a microbiota de levedura do caldo de cana primário do processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, identificaram 36,6% de espécies do gênero *Saccharomyces*, 36,8% do gênero *Candida*, 16,6% de espécies do gênero *Torulopsis* e 10% do gênero *Pichia*. Embora se tratando de ambiente geográfico de condições climáticas diferentes, o substrato analisado foi o mesmo e, com exceção do gênero *Torulopsis*, que não foi identificado no presente estudo, os demais foram comuns nos dois trabalhos. Segundo CECCATO-ANTONINI & PARAZZI (1996) os principais gêneros de leveduras selvagens encontrados na cana-de-açúcar saudável são *Saccharomyces*, *Pichia* e *Torula*. ÁVILA et al. (2010) em trabalho com diferentes cultivares de cana de açúcar no sul de Minas Gerais registraram resultados semelhantes, destacando que os gêneros de leveduras com maior frequência foram *Torulopsis*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Candida*.

JUTAKANOKI et al. (2014) isolaram 72 cepas de leveduras do caldo de cana de indústrias processadoras de açúcar na Tailândia. Os autores testaram essas cepas para produção de etanol a partir de raiz da mandioca e uma cepa de *Pichia kudriavzevii* mostrou-se a mais promissora, confirmando o potencial de cepas de leveduras do caldo de cana para produção de bioetanol.

A Tabela 4 mostra que 22 cepas, sendo 15 *Saccharomyces* e sete *Pichia*, incluindo a CE025, detentora do fenótipo killer, foram capazes de fermentar a galactose. PARK et al. (2014) destacaram que muitas cepas de leveduras são incapazes de fermentar a galactose. Os mesmos autores ressaltaram a importância

de cepas fermentadoras desse carboidrato para produção de bioetanol a partir da biomassa de algas vermelhas, onde o principal carboidrato é a galactose. LEE et al. (2011) também registraram a importância de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fermentadoras de galactose para produção de etanol a partir da biomassa de algas marinhas vermelhas. Ainda nesse contexto, KIM et al. (2014) estudaram a cepa *Saccharomyces cerevisiae* KL17 como produtora de etanol a partir da galactose.

A temperatura é uma variável que afeta diretamente a taxa de crescimento do micro-organismo, e, portanto a eficiência do processo fermentativo. A faixa de temperatura para o crescimento das leveduras está entre 18 a 24 °C (ARROYO-LÓPEZ et al., 2009). No entanto, as temperaturas ótimas para a produção industrial de álcool estão situadas na faixa de 26 a 35 °C. Nesse sentido, é importante destacar que as 69 cepas avaliadas neste trabalho cresceram a temperatura de 37 °C, sugerindo adaptação a temperaturas mais elevadas, predominantes na região Nordeste.

Um destaque especial para a cepa *Pichia* CE025, com fenótipo killer, que pode reduzir a eficiência do processo fermentativo por eliminar a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 selecionada para a fermentação. Por outro lado, é possível que essa cepa mostre potencial para atuar como principal agente fermentativo de eliminando as cepas contaminantes, uma vez que foi efetiva contra a cepa de *Candida glabrata* Y55. Nessa perspectiva, são importantes estudos posteriores com a cepa CE025.

## CONCLUSÃO

O caldo de cana natural se constitui um reservatório de cepas de leveduras com ampla diversidade cultural e bioquímica, constituindo-se um nicho promissor para seleção de cepas com potencial biotecnológico para produção de biotanol.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. de C.; BUCKERIDGE, M. S., GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n.1299, p.195-200, 2007.

ANTONANGELO, A. T. B. F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

ANTUNES, J.; AGUIAR, C. Search for killer phenotypes with potential for biological control. **Annals of Microbiology**, v. 62, n.1, p. 427-433, 2012.

ARRÓYO-LÓPEZ, F. N.; ORLIC, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Effects of temperature, pH and sugar concentrations on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 120-127, 2009.

ÁVILA, C. L. S.; VALERIANO, A. R.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. F.; REZENDE, A. V.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.1, p. 25-32, 2010.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW D. **Yeasts, characteristics and identification**. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811 p.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, v. 32, n.2, p. 83 - 95, 2010.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, v. 56, n.1, p.207-216, 1999.

CAMARGO, J. Z. **Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região Centro-Oeste**. Dourados, 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

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

CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e alcooleiros do Brasil. **Anais...** Maceió: STAB, p. 23-29.1996.

CHATTERJEE, S.; GHOSH, B.; RAY, R. R. Isolation and characterization of local yeast strains from waste fruit juices, jaggery and dahi samples. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 9, n.2, p. 647-656, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2013**- Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2013.

CUNHA, A. F.; MASSWA, S. K.; GOMES, L. H.; REIS, S. F.; PEREIRA, G. A. G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 280-287, 2006.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues, opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n.6, p. 578-595, 2009.

FREITA, L. A.; ROSSINI, L. A. C. J.; GOMES, E. S.; RODRIGUES, G.; LOPES, E. M.; FERREIRA, O. E.; MUTTON, M. J. R. Yeast strains assimilating carbon sources to production of ethanol. **Ciência & Tecnologia**, v. 6, n.1, p. 1-14, 2014.

JUTAKANOKI, R.; TANASUPAWAT, S.; AKARACHARANYA, A. Characterization and ethanol fermentation of *Pichia* and *Torulaspora* strains. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n.4, p. 52-56, 2014.

KIM, J. H.; RYU, J.; HUH, I. Y.; HONG, S. K.; KANG, H. A.; CHANG, Y. K. Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1871-1878, 2014.

KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. **Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts**. In: KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. The Yeasts: A taxonomic study. C.P. Kurtzman and J.W. Fell (eds.), 4<sup>th</sup> Elsevier Science B.V., Amsterdam, v.1, p. 88-108, 1998.

LEE, K. S.; HONG, M. E.; JUNG, S. C.; HA, S. J.; YU, B. J.; KOO, H. M.; PARK, S. M.; SEO, J. H.; KWEON, D. H.; PARK, J. C.; JIN, Y. S. Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n 3, p. 621-631, 2011.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O.G.; NAVES, P.L.F. Contaminação microbiana de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n 11, p. 1-16, 2010.

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

PARK, J. H.; KIM, S. H.; PARK, H. D.; KIM, J. S.; YOON, J. J. Simultaneous utilization of galactose and glucose by *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 65, p. 213-218, 2014.

PEIXOTO, C. R. M.; ROSA, G. R.; SILVA, C. N.; SANTOS, B. T.; ENGELMANN, T. L. Miniprojeto para ensino de química geral experimental baseado na fermentação do caldo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p.1686-1691, 2012.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n.4, p. 1121-1131, 2013.

RODRÍGUEZ, L. A.; ABAD, D.; GÓMEZ, J.; CASANOVA, J. B.; LEMA, C. Fenotipo killer: distribución en la comarca de la Ribeira Sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n.1, p. 33-37, 1998.



SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro Guanabara-Koogan, 1999.

SILVA, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Itálico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 112-121, 1996.

SILVA FILHO, E. A.; MEOL, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; SIMÕES, D. A.; MORAIS JR., M. A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.32, p. 481-486, 2005.

SILVA, R.O; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n.3, p. 22-27, 2011.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n.38, p. 1-10, 2011.

TAVARES, F.C.A. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. STAB. **Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 10, n.5, p.45-49, 1992.

TOSTA, C.D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer**. 2004. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Agricultura Luiz de Queiroz- Universidade de São Paulo.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In **The Yeasts, a Taxonomic Study**, 4th edn, p. 77-100, 1998. Edited by C. P. Kurtzman, & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.

YOUNG, E.; LEE, S. M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n.24, p. 1-12, 2010.