

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E ENSINO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**LAURA NEVES FACCO
MONIQUE DE PAULA
MURILO HAS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE
LEVEDURAS SUBMETIDAS A PRESERVAÇÃO PROLONGADA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2016

**LAURA NEVES FACCO
MONIQUE DE PAULA ROSA
MURILO HAS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE
LEVEDURAS SUBMETIDAS A PRESERVAÇÃO PROLONGADA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado á disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Giovana A. Moura Pietrowski

PONTA GROSSA

2016



TERMO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS SUBETIDAS À PRESERVAÇÃO PROLONGADA

por

LAURA NEVES FACCO
MONIQUE DE PAULA
MURILO HAS

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 7 de dezembro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. Os candidatos foram arguidos pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Giovana de Arruda Moura Pietrowski
Professora Orientadora

Profa. Dra. Denise Milléo Almeida
Membro titular

Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se arquivado na Secretaria Acadêmica -

AGRADECIMENTOS

Agradecemos em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida e por nos dar forças para nunca desistir de nossos sonhos, mostrando que a perseverança e dedicação são essenciais para a concretização de nossos objetivos.

Um agradecimento de maneira especial, a nossa Professora e orientadora Giovana de Arruda Moura Pietrowski, pela oportunidade de participarmos dos projetos de Iniciação Científica e Estágio, que resultaram no desenvolvimento do presente trabalho, pelo imenso apoio e dedicação e por nos proporcionar o conhecimento, não apenas racional, mas a manifestação de caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, fazendo-nos crescer como profissionais e como pessoas.

A nossa gratidão a professora Juliana V. M. Bittencourt, pelo auxílio na caracterização molecular das leveduras utilizadas. Agradecemos também as suas orientandas do mestrado e iniciação científica, de maneira especial a Cláudia e Maryeli, pela disponibilidade e apoio durante a realização das análises.

Aos amigos que conquistamos durante toda a vivência no laboratório de microbiologia Andréia, Crislaine, Fran, Jean, Kahtlyn, Lilian, Luciane, Mariane e Valdinéia, pelo carinho e pelas inúmeras conversas que resultaram em bons risos, mas também em aprendizagem. Em especial aos amigos e companheiros na realização desse trabalho, que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis e nos momentos de glória.

A professora Denise Milléo, pela assistência e paciência em esclarecer dúvidas e pelo conhecimento emitido sobre microbiologia.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje avistamos um horizonte superior, constituído pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

A nossos pais e nossas famílias, que em mesmo às dificuldades, fizeram a diferença, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, acreditando na conclusão de mais essa etapa de nossas vidas.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de nossa formação, o nosso muito obrigado.

O conhecimento torna a alma jovem e diminui
a amargura da velhice. Colhe, pois, a
sabedoria. Armazena suavidade para o
amanhã.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

FACCO, Laura Neves; ROSA, Monique de Paula; HAS, Murilo. **Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas a preservação prolongada.** 2016. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2016.

Leveduras do gênero *Hanseniaspora* são reconhecidas por sua contribuição aromática para sidras, fermentados de frutos e vinhos. Para uma boa preservação das culturas de leveduras é essencial manter as propriedades morfológicas e fisiológicas das estirpes, independentemente do método de armazenamento escolhido. O congelamento a -80°C e a liofilização são métodos muito utilizados para preservação de micro-organismos a longo prazo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características fisiológicas e morfológicas de leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas (*Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*), submetidas à conservação por congelamento a -80°C e liofilização. Foi realizado teste ecométrico, avaliações morfológicas de crescimento em meio sólido e líquido, avaliações bioquímicas envolvendo fermentações de carboidratos e testes de assimilação de diversos compostos e caracterização molecular. Os resultados evidenciaram a seletividade do meio de cultura Ágar Malte Extrato de Levedura – YMA para as cepas estudadas. No perfil bioquímico a avaliação das cepas evidenciou diferenças na capacidade de fermentar a glicose e outros açúcares como também na assimilação de citrato, nitrato e hidrólise do amido, entretanto todos os demais testes bioquímicos não sofreram variações. Portanto, as características morfológicas e fisiológicas das cepas de leveduras estudadas, mesmo com pequenas variações, foram mantidas, garantindo a viabilidade destes micro-organismos para a produção de compostos aromáticos em bebidas fermentadas, tanto por congelamento a -80°C , quanto por liofilização.

Palavras-chave: *Hanseniaspora uvarum*. *Hanseniaspora guilliermondii*. Congelamento. Liofilização.

ABSTRACT

FACCO, Laura Neves; ROSA, Monique de Paula; HAS, Murilo. **Morphological and physiological characterization of yeasts subjected to prolonged preservation.** 2016. 33f. Completion Work of Course of Food Technology - Federal Technology University Paraná. Ponta Grossa, 2016.

Yeasts of the genus *Hanseniaspora* are recognized for their aromatic contribution to ciders, fermented fruits and wines. For good preservation of yeast cultures it is essential to maintain the morphological and physiological properties of the strains regardless of the storage method chosen. Freezing at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and lyophilization are widely used methods for the long-term preservation of microorganisms. The objective of the present work was to evaluate the physiological and morphological characteristics of yeasts used in the fermented beverage industry (*Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii*), preserved by freezing at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and lyophilization. Ecometric test, morphological growth assays in solid and liquid medium, biochemical evaluations involving carbohydrate fermentations and tests of assimilation of several compounds and molecular characterization were performed. The results evidenced the selectivity of the culture medium Malt Agar Extract - YMA for the studied strains. In the biochemical profile the evaluation of the strains showed differences in the capacity to ferment glucose and other sugars as well as in the assimilation of citrate, nitrate and starch hydrolysis, however all other biochemical tests did not change. Therefore, the morphological and physiological characteristics of the strains of yeasts studied, even with small variations, were maintained, guaranteeing the viability of these microorganisms for the production of aromatic compounds in fermented beverages, both by freezing at -80°C and by freeze-drying.

Key words: *Hanseniaspora uvarum*. *Hanseniaspora guilliermondii*. Freezing. Lyophilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colônias típicas das leveduras em meio Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA).....	21
Quadro 1 - Características morfológicas das colônias de leveduras em Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA), em placas de Petri.....	22
Quadro 2 - Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização, em tubos de ensaio com ágar inclinado.....	23
Quadro 3 - Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização em Caldo Glucose – Peptona – Extrato de levedura (GPBY).	24
Quadro 4 - Perfil Bioquímico das leveduras preservadas por congelamento e liofilização ...	26
Quadro 5 - Resultados da fermentação de carboidratos.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 RECUPERAÇÃO DAS CEPAS.....	15
2.2 TESTE ECOMÉTRICO	15
2.3 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS	16
2.4 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS.....	17
2.4.1 Teste de catalase	17
2.4.2 Teste da utilização do citrato	17
2.4.3 Coloração de gram	17
2.4.5 Hidrólise da gelatina	18
2.4.6 Teste do indol.....	18
2.4.7 Análise da motilidade	19
2.4.8 Teste de redução do nitrato	19
2.4.9 Teste da urease	19
2.4.10 Teste vermelho de metila e voges - proskauer	20
2.4.11 Fermentação de carboidratos (frutose, glicose, lactose, manitol, sacarose e xilose) ..	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
3.1 RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CEPAS	21
3.2 TESTE ECOMÉTRICO	25
3.3 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA (PERFIL BIOQUÍMICO) DAS CEPAS	26
CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de que as leveduras possuem um papel fundamental na fermentação foi o primeiro elo entre a atividade dos micro-organismos e as modificações físicas e químicas nos materiais orgânicos. Estudos bibliográficos citam que várias leveduras produzem uma infinidade de aromas que melhoram a qualidade sensorial dos produtos. Embora existam muitos métodos para a síntese química de bioaromas, uma série de esforços tem sido realizada para desenvolver a produção natural dos aromas, utilizando diversas vias biotecnológicas, dentre elas, a via fermentativa e a via enzimática, métodos que são ecologicamente corretos e menos poluentes, atendendo a exigência de uma gama de consumidores que preferem produtos naturais, em vez de seus correspondentes químicos (FAITH et al 1991 ; XIÃO & XU, 2007).

Segundo Viana et al, 2009; Moreira et al ,2005, Xu et al., 2006 ; Xufre et al, 2006 (apud Pietrowski et al, 2015) o gênero *Hanseniaspora* mostra uma contribuição aromática para sidras, fermentados de frutos e vinhos, devido à produção de ésteres que fornecem estas bebidas notas sensoriais como frutado e / ou floral. De acordo com Girão et al. (2004) , uma boa preservação das culturas de leveduras se torna essencial para estudos futuros sendo necessário manter as mesmas propriedades morfológicas e fisiológicas das estirpes, independentemente do método de armazenamento escolhido.

Para tanto, a manutenção e preservação das culturas deve ser realizada garantindo a sobrevivência do micro-organismo, bem como conservando propriedades morfológicas, fisiológicas, características genéticas e pureza dos isolados por longos períodos de tempo (CANHOS et al, 2004).

A escolha da forma mais adequada de conservação deve levar em conta à finalidade desta manutenção, o custo, a disponibilidade de material e espaço, além da eficácia de tal método na manutenção (KIRSOP & SNELL, 1984; HAWKSWOTH, 1985; ABADIAS et al, 2006).

Como uma forma bastante utilizada para preservação de micro-organismos está o congelamento em nitrogênio líquido ou em ultra-freezer. O preparo das culturas para o congelamento apresenta procedimentos simples e fáceis (KURTZMAN et al, 2003). A liofilização também se apresenta como uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de micro-organismos, justamente por garantir a viabilidade dos agentes por longos períodos (SOLA et al, 2012).

Tanto o congelamento quanto a liofilização são técnicas frequentemente utilizadas para preservação e estocagem de material biológico, não somente pela qualidade microbiológica dos materiais armazenados, mas também porque permitem uma redução drástica do tempo gasto em transferência de culturas (ROBERT et al, 2006).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada nas características do agente em estudo, assim como, pelas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. O alvo de qualquer método de manutenção está em preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo, pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características (SOLA et al, 2012).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo realizar a caracterização fisiológica e morfológica de leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas (*Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*), submetidas a conservação por congelamento a -80°C e liofilização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 RECUPERAÇÃO DAS CEPAS

Foram coletadas cepas congeladas e liofilizadas do Banco de Cepas no Laboratório de Microbiologia da UTFPR-PG, armazenadas há sete anos. As cepas de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* tanto congeladas quanto liofilizadas, foram recuperadas em dois momentos: setembro de 2015 e em junho de 2016, para a realização das avaliações propostas.

Para a recuperação das cepas congeladas, foram coletadas assepticamente 0,5 mL do criotubo depois de descongelado, e adicionadas em tubos de ensaio contendo 8,5 mL de água peptonada 0,1% e 1 mL de glicose. As cepas congeladas foram homogeneizadas em equipamento Vórtex Mixer (MODEL KMC – 1300V) e deixadas em repouso por 30 minutos. Decorridos os 30 minutos, foi transferido 1 mL da solução obtida para tubos de ensaio contendo 9mL de caldo Glucose – peptona – extrato de levedura (GPBY), e incubados à 30°C em Estufa Bacteriológica (Quimis Pat. 34200022) por 24 horas (PIETROWSKI et al, 2015).

Para as cepas liofilizadas, foram pesadas 0,007 mg das mesmas, e colocadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e 1 mL de glicose. As cepas liofilizadas foram homogeneizadas e incubadas seguindo o mesmo procedimento realizado com as cepas congeladas a -80°C (PIETROWSKI et al, 2015).

Após a recuperação das cepas em caldo GPBY, foi realizada semeadura em Ágar Malte e Extrato de Levedura (YMA), por meio do método de estriamento descontínuo, e incubação em estufa bacteriológica à 30°C por 24 horas, para a obtenção de colônias típicas e isoladas (PIETROWSKI et al, 2015).

2.2 TESTE ECOMÉTRICO

Para o teste ecométrico, foi utilizado o meio de cultura Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA) e Ágar Cetrimide com as respectivas cepas: *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilhermondii* (cepas desejadas), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphi* e *Pseudomonas aeruginosa* (cepas não desejadas).

Foram preparadas 8 placas de Petri estéreis, sendo 4 placas com aproximadamente 20 mL de YMA e 4 placas com aproximadamente 20 mL de Ágar Cetrimide. Após a solidificação dos meios foi realizado a inoculação a partir de uma alçada de 0,001 mL de cada

cepa em seu caldo específico. Para as cepas não desejadas foi utilizado Caldo Nutriente e para as cepas desejadas foi utilizado Caldo Glucose – peptona – extrato de levedura (GPBY). Cada placa foi dividida em 4 quadrantes e foram feitas 5 estrias em cada quadrante e uma estria no centro da placa. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas (MOSSEL et al, 1983).

Para a interpretação dos resultados, foi calculado o Índice de Crescimento Absoluto (ICA). O cálculo foi realizado atribuindo um valor de 0,2 (precisão do método) a cada estria, e multiplicado pelo número de estrias onde foi observado crescimento. Para o ICA, foram considerados como critérios de avaliação a produtividade e a seletividade. Para a produtividade, as cepas desejadas em meio de cultivo não seletivo deveriam ter ICA pelo menos igual a 3,5. Para a seletividade, as cepas não desejadas em meio seletivo não deveriam ter ICA maior que 2; e para as cepas desejadas o ICA não deveria ser menor que 2 (MOSSEL et al, 1983).

2.3 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS

As cepas de leveduras obtidas em caldo Glucose – peptona – extrato de levedura (GPBY) foram inoculadas por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo Ágar Malte e Extrato de Levedura (YMA) e incubadas a 30°C por 48 horas. As colônias isoladas foram observadas em contador de colônia (Phoenix, CP 600 plus) e analisadas quanto ao tamanho (grande – 5mm, média – 2 a 5mm e pequena – 2mm), forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa) bordos (lisos, lacerados, lobados, filamentosos ou ondulados), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida ou opaca) cor (incolor, branca ou pigmentada) (MADIGAN et al, 2010).

As leveduras presentes em caldo Glucose – peptona – extrato de levedura (GPBY) foram inoculadas por estriamento contínuo em tubos de ensaio contendo Ágar Malte e Extrato de Levedura (YMA) inclinado, com bisel longo, sendo incubados a 30°C por 48 horas. O crescimento foi analisado quanto à forma (difusa, espalhada ou equinulado), quantidade (escasso, abundante ou moderado), brilho (brilhante e sem brilho), cor (colorido ou sem cor). Os inóculos obtidos em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GPBY) foram observados quanto ao aspecto (turvo ou não turvo), sedimento (com ou sem sedimento), tipo de sedimento (granulado, feculento ou mucoide), película (com ou sem película na

superfície), tipo da película (resistente, frágil, lisa, rugosa, aderente as paredes do tubo) e com ou sem anel nas paredes do tubo (MADIGAN et al, 2010).

2.4 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

2.4.1 Teste de catalase

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo Ágar Malte Extrato e Levedura (YMA) e incubadas a 30°C por 48 horas. Em seguida, foi transferida uma colônia pura em lâmina de vidro e adicionado 3 gotas de peróxido de hidrogênio 3%. O resultado positivo mostra borbulhamento imediato e o resultado negativo não apresenta borbulhamento (SILVA et al, 2010).

2.4.2 Teste da utilização do citrato

As cepas presentes no caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Citrato de Simmons, em forma de bisel longo, e incubadas a 35°C por 48 horas. O resultado positivo mostra o crescimento na rampa do meio de cultivo com viragem alcalina do indicador, com alteração da cor verde para azul e o negativo sem crescimento e sem alteração de cor (SILVA, 1996).

2.4.3 Coloração de Gram

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo Ágar Malte Extrato e Levedura (YMA) e incubadas a 30°C por 48 horas. A partir das colônias isoladas foi realizada a coloração. Micro-organismos Gram positivos apresentam coloração roxa e Gram negativos são vermelhos (SILVA et al, 2010).

2.4.4 Hidrólise do Amido

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas por picada, com auxílio de fios de platina em placas de Petri contendo o Meio Ágar Amido adicionado de 1% de Iodo e 2% de Iodeto de potássio, sendo incubadas a 37°C por 48 horas. O resultado positivo mostra a hidrólise do amido pela formação de halo transparente ao redor da colônia e o resultado negativo não há formação de halo (SILVA et al, 2010).

2.4.5 Hidrólise da Gelatina

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas por picada, com auxílio de fios de platina, em tubos de ensaio com Ágar Gelatina a 12%, até a profundidade de 1 cm e incubados a 37°C por 24 horas. Após incubação foram retirados e colocados em banho de gelo por 10 minutos. O resultado positivo mostra a liquefação do meio de cultura e no resultado negativo o meio se mantém sólido (MADIGAN et al, 2010).

2.4.6 Teste do Indol

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas com uma alçada em tubos de ensaio com caldo triptona e incubados a 35°C por 24 horas. Após a incubação, foi transferido uma alíquota de 5 mL da cultura para um tubo estéril vazio e adicionado 5 gotas do reagente de Kovacs, e em seguida, agitado levemente. O resultado positivo mostra o desenvolvimento de anel vermelho – violeta na superfície do meio. A permanência do anel na cor amarela indica resultado negativo. (MADIGAN et al, 2010).

2.4.7 Análise da Motilidade

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas em tubo de ensaio com Ágar Motilidade, por picada no centro do meio até a profundidade de 1 cm e incubados a 30°C por 24 horas. O resultado positivo mostra o crescimento fora da linha de inoculação e o negativo se restringe a linha da picada (MADIGAN et al, 2010).

2.4.8 Teste de redução do nitrato

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas com uma alçada em tubos de ensaio com caldo nitrato e tubo de Durham invertidos, sendo incubados a 35°C por 48 horas. O resultado positivo apresenta a formação de gás nos tubos de Durham. Não ocorrendo a produção de gás, foi adicionado 5 gotas da solução de 0,6% de α -naftol e 5 gotas da solução de 0,8% de ácido sulfanílico e agitado delicadamente os tubos. O desenvolvimento da cor vermelha entre 1 a 2 minutos indicava resultado positivo (presença de nitrito), se não era adicionado 20 mg de pó de zinco aos tubos contendo as soluções de α -naftol e ácido sulfanílico. O desenvolvimento da cor vermelha entre 5 a 10 minutos indica redução de nitrato a nitrito pelo zinco resultando em negativo. O não desenvolvimento da cor vermelha indica ausência de nitrato no meio, resultando em positivo (SILVA, 1996).

2.4.9 Teste da Urease

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas com uma alçada em tubo de ensaio com caldo uréia de Christensen, sendo incubados a 37 °C por 24 horas. O resultado positivo mostra a viragem alcalina do indicador, com alteração da cor do meio de alaranjado para cor rosa escuro, o que indica que o micro-organismo produz a enzima urease, responsável pela decomposição da uréia em amônia. No resultado negativo há permanência da cor original (SILVA et al, 2010).

2.4.10 Teste Vermelho de metila e Voges - Proskauer

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas com uma alçada leve em tubos de ensaio com Caldo Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (VM-VP) e incubados a 35°C por 48 horas, com tampas levemente desrosqueadas.

Para teste de Voges Proskauer (VP) foi adicionado 2,5 mL da cultura, 6 gotas de solução alcoólica de 5% de α -naftol e 2 gotas de solução 40% de hidróxido de potássio, sendo o tubo agitado por 30 segundos a 1 minuto, para introduzir oxigênio atmosférico e promover a oxidação da acetoína. O resultado positivo, após 15 minutos, há o aparecimento de cor vermelha ou rosa escuro na superfície do meio e a permanência da cor amarela indica resultado negativo.

O teste de Vermelho de Metila foi realizado após 96 horas de incubação, sendo adicionado 2,5 mL da cultura e 5 gotas de solução vermelho de metila. O resultado positivo mostra alteração do meio para a cor vermelha e o resultado negativo há permanência da cor amarela. O surgimento de uma cor alaranjada indica reação lenta (SILVA, 1996).

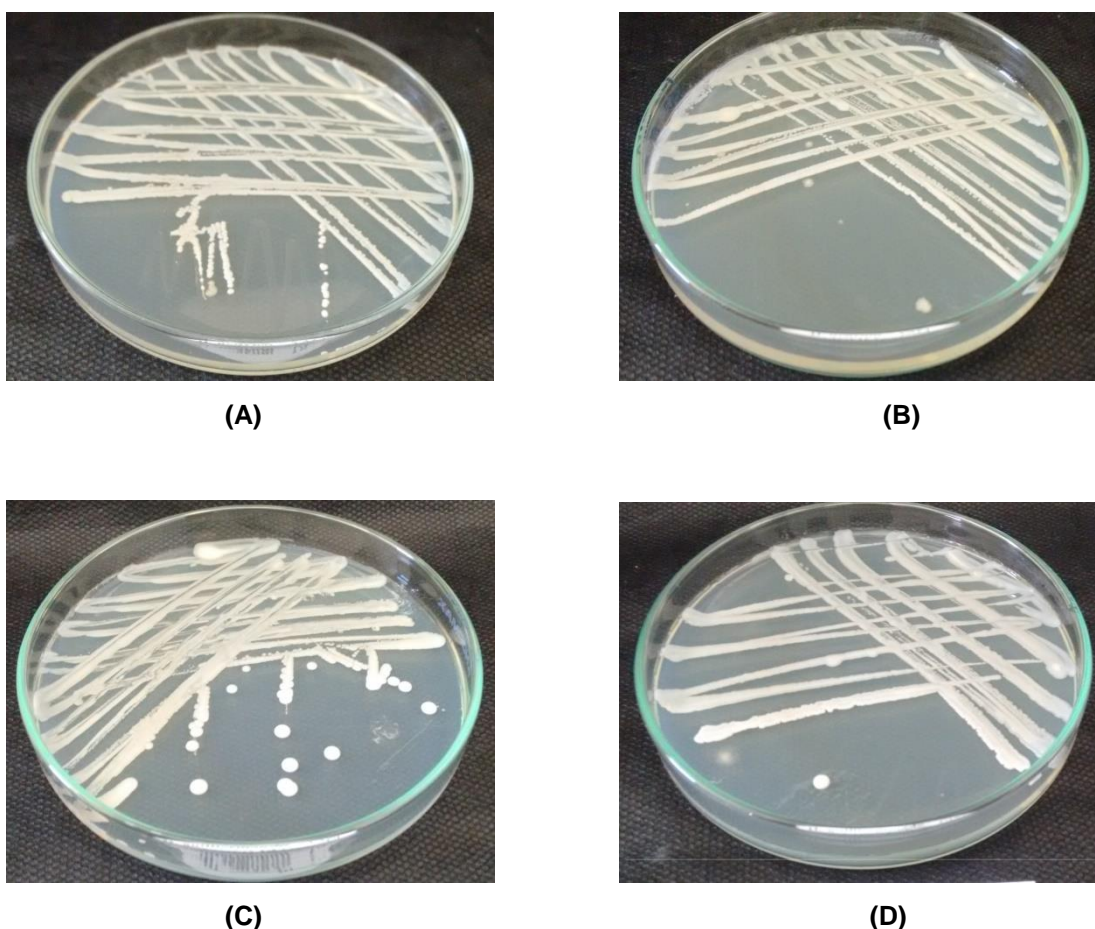
2.4.11 Fermentação de Carboidratos (frutose, glicose, lactose, manitol, sacarose e xilose)

As cepas presentes em caldo Glucose – peptona - extrato de levedura (GBPY) foram inoculadas em tubos de ensaio com Ágar Vermelho de Fenol suplementado com os carboidratos testados (frutose, glicose, lactose, manitol, sacarose e xilose), sendo incubados a 35°C por 48 horas. O resultado positivo mostra a viragem ácida do indicador da cor de vermelho alaranjado para amarelo e o negativo há a viragem alcalina para a cor rosa escura (SILVA, 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CEPAS

Foram recuperadas cepas congeladas e liofilizadas, até a obtenção de colônias típicas (Figura 1).



Nota - Colônia A – *Hanseniaspora uvarum* congelada a -80°C; Colônia B - *Hanseniaspora uvarum* liofilizada; Colônia C - *Hanseniaspora guilliermondii* congelada a -80°C; Colônia D - *Hanseniaspora guilliermondii* liofilizada.

**Figura 1 – Colônias típicas das leveduras em meio Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA).
Fonte: Autoria própria, 2016.**

Foi observado o crescimento em placas e verificado que as quatro cepas em estudo, apesar de serem preservadas por métodos distintos, apresentaram aspectos semelhantes, como coloração das colônias, tamanho e forma.

As avaliações morfológicas mostram que todas as leveduras recuperadas nos dois momentos (setembro de 2015 e em junho de 2016), tanto congeladas quanto liofilizadas, apresentam características brancas, opacas e com bordos lisos (Quadro1).

	Leveduras	Morfologia das colônias de leveduras preservadas por congelamento e liofilização						
		Tamanho	Forma	Elevação	Bordos	Estrutura	Brilho	Cor
<i>H. uvarum</i>	Cong. (1)	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
	Cong. (2)	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
	Liof. (1)	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
	Liof. (2)	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
<i>H. guilliermondii</i>	Cong. (1)	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
	Cong. (2)	Pequena	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
	Liof. (1)	Média	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
	Liof. (2)	Pequena	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Opaca	Branca

Nota: (1) – cepas recuperadas em set/2015; (2) – cepas recuperadas em jun/2016; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas; Pequena (2 mm); Média (3mm a 5 mm); Grande (maior que 5 mm).

Quadro 1- Características morfológicas das colônias de leveduras em Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA), em placas de Petri.

Fonte: autoria própria, 2016.

Todas as cepas de leveduras congeladas e liofilizadas apresentaram crescimento em ágar inclinado com características filiforme e branca (Quadro 2).

	Leveduras	Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização, em tubos de ensaio com ágar inclinado.			
		Forma	Quantidade	Brilho	Cor
<i>H. uvarum</i>	Cong. (1)	Filiforme	Moderado	Brilhante	Branca
	Cong. (2)	Filiforme	Moderado	Brilhante	Branca
	Liof. (1)	Filiforme	Moderado	Brilhante	Branca
	Liof. (2)	Filiforme	Moderado	Brilhante	Branca
<i>H. guilliermondii</i>	Cong. (1)	Filiforme	Escasso	Brilhante	Branca
	Cong. (2)	Filiforme	Escasso	Brilhante	Branca
	Liof. (1)	Filiforme	Escasso	Brilhante	Branca
	Liof. (2)	Filiforme	Escasso	Brilhante	Branca

Nota: (1) – cepas recuperadas em set/2015; (2) – cepas recuperadas em jun/2016; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas

Quadro 2 - Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização, em tubos de ensaio com ágar inclinado.

Fonte: autoria própria, 2016.

Todas as cepas de leveduras tanto liofilizadas quanto congeladas apresentaram as mesmas características em crescimento em Caldo GPBY (Glucose – peptona – extrato de levedura) sendo, turbidez, com sedimento feculento, sem película na superfície e sem desenvolvimento de anel na parede do tubo. (Quadro 3).

	Leveduras	Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização em Caldo Glucose – Peptona – Extrato de levedura (GPBY)			
		Aspecto	Sedimento	Película	Anel
<i>H. uvarum</i>	Cong. (1)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
	Cong. (2)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
	Liof. (1)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
	Liof. (2)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
<i>H. guilliermondii</i>	Cong. (1)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
	Cong. (2)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
	Liof. (1)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel
	Liof. (2)	Turvo	Feculento	Sem película	Sem anel

Nota: (1) – cepas recuperadas em set/2015; (2) – cepas recuperadas em jun/2016; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas

Quadro 3 - Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização em Caldo Glucose – Peptona – Extrato de levedura (GPBY).

Fonte: autoria própria, 2016.

Pietrowski et al (2015) em seu trabalho verificou que as leveduras do gênero *Hanseniaspora uvarum* conservadas por liofilização, se apresentam como esbranquiçadas, com bordos lisos e brilhantes. No presente estudo, foi possível a identificação dessas características relacionadas a este gênero de levedura, porém, houve distinção com o autor, na característica de brilhante para opaca.

Segundo dados da Viticulture and Enology (2016), as leveduras do gênero *Hanseniaspora guilliermondii* apresentam suas colônias cremosas, lisas brilhantes e convexas. Com relação a característica colonial, as cepas de leveduras apresentaram resultados semelhantes aos dados da literatura para o aspecto “lisa e convexa”. De acordo com Kurtzman & Fell (1998), o aspecto colonial das cepas pertencentes ao gênero *Hanseniaspora guilliermondii*, coincidem com os resultados obtidos, diferenciando apenas a característica de opaca para brilhante.

As cepas de leveduras analisadas apresentaram características morfológicas semelhantes revelando que não houve alterações nestas características dentro de um prazo de nove meses sob conservação por congelamento a -80°C e liofilização.

3.2 TESTE ECOMÉTRICO

O teste ecométrico foi realizado e foi observado que o meio de cultura Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA) se mostrou como seletivo e produtivo como pode ser observado com os dados da tabela 1.

Tabela 1. Índice de Crescimento Absoluto (ICA) considerando a Produtividade e Seletividade por meio do Teste Ecométrico

Seletividade e Produtividade			
Meio Ágar Malte Extrato de Levedura (YMA)		Meio Ágar Cetrimide	
Micro-organismo	ICA	Micro-organismo	ICA
A	5	A	0
B	5	B	0
C	5	C	0
D	5	D	0
<i>Salmonella thypi</i>	0	<i>Salmonella thypi</i>	0
<i>S. aureus</i>	0	<i>S. aureus</i>	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	<i>P. aeruginosa</i>	1

Nota: **A** - *H. uvarum* congelada; **B** - *H. uvarum* liofilizada; **C** - *H. guilliermondii* congelada; **D** - *H. guilliermondii* liofilizada.

Conforme apresenta a tabela 1, o meio (YMA) quanto a sua produtividade e sua seletividade, se mostrou eficiente pois as cepas desejadas (A, B, C e D) tiveram ICA com valores iguais a 5, enquanto que as cepas não desejadas (*Salmonella thypi*, *S.aureus* e *P. aeruginosa*) tiveram ICA de valor 0. Segundo Gelli et al (2003), para um meio ser considerado produtivo, o ICA deve ser ao menos 3,5 e para ser considerado seletivo, as cepas desejadas devem ter ICA maior que 3,0 e cepas não desejadas, menor que 2,0.

Gelli et al (2003) ao realizar o controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella spp.* utilizou como método o teste ecométrico e verificou que testes ecométricos, de seletividade e produtividade e de recuperação demonstraram a adequacidade geral dos meios de cultura usados nas diferentes etapas analíticas de seu estudo, enfatizando assim, a

importância e confiabilidade do teste. Neste sentido, o teste ecométrico realizado no presente estudo mostrou a eficiência do Ágar Malte Extrato de Levedura para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*.

3.3 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA (PERFIL BIOQUÍMICO) DAS CEPAS

Todas as cepas de leveduras apresentaram coloração de Gram negativa e resultados positivos para produção de catalase, indicando que são capazes de converter o H₂O₂ em água e oxigênio gasoso. (Quadro 4)

Perfil Bioquímico das Leveduras								
Leveduras	H. uvarum				H. guilliermondii			
	Cong. (1)	Cong. (2)	Liof. (1)	Liof. (2)	Cong (1)	Cong (2)	Liof. (1)	Liof. (2)
Coloração de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	-	-	+	+
Nitrato	+	+	+	+	-	-	-	-
V. Proskauer	+	-	-	-	-	-	+	-
V. Metila	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-
Hid. Amido	+	-	+	+	+	-	+	-
Hid. Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: 1 – cepas recuperadas em set/2015; 2 – cepas recuperadas em jun/2016; (+) positivo; (-) negativo.

Quadro 4 - Perfil Bioquímico das leveduras preservadas por congelamento e liofilização

Fonte: autoria própria, 2016.

As leveduras são tradicionalmente caracterizadas, classificadas e identificadas utilizando características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica (PHAFF, 1990).

Para os testes de Vermelho de Metila, Indol, Motilidade, Hidrólise da Gelatina, Catalase e Urease, as leveduras apresentaram resultados semelhantes, não evidenciando alterações em relação aos testes mencionados e à diferença de métodos de conservação e de espécies.

No teste do Citrato, as cepas *H. uvarum* congelada (1) e *H. guilliermondii* congelada (1 e 2) apresentaram resultado negativo, enquanto que as demais foram positivas para utilização do citrato, demonstrando que são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono para seu crescimento. Assis et al (2012), ao realizar uma série de testes fisiológicos em leveduras isoladas uvas *Vitis vinifera* L. verificou que leveduras do gênero *Hanseniaspora*, não assimilam o citrato. Essa afirmação mostra-se divergente com os resultados obtidos no presente estudo.

A capacidade de reduzir o nitrato em nitrito foi verificada apenas pelas cepas de *H. uvarum* tanto congeladas quanto liofilizadas (Quadro 4). Neste processo, o micro-organismo consegue suprir a ausência do oxigênio atmosférico derivando-o do nitrato (SILVA, 1996). Segundo dados da Viticulture & Enology, as leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* não assimilam o nitrato, sendo consideradas como aeróbicas. Tal afirmação não condiz com os resultados apresentados pelas cepas do gênero *Hanseniaspora uvarum* neste trabalho.

No teste de Voges-Proskauer apenas as leveduras *H. uvarum* congelada (1) e *H. guilliermondii* liofilizada (1); mostraram capacidade de produzir butilenoglicol, como resultado do produto final da fermentação da glicose. O que se confirma pela capacidade de fermentar a glicose pelas leveduras *H. uvarum* congelada (1 e 2), *H. uvarum* liofilizada (2) e *H. guilliermondii* liofilizada (1 e 2) (Quadro 5).

A hidrólise do amido foi verificada apenas pelas cepas *H. uvarum* congelada (1), *H. uvarum* liofilizada (1 e 2), *H. guilliermondii* congelada e liofilizada (1), portanto, capazes de hidrolisar o amido em carboidratos menores (Quadro 4). Este aspecto também foi observado por Crestani (2007), que ao isolar e caracterizar leveduras de uma madeira verificou que as pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* sp. não são capazes de utilizar o amido como única fonte de carbono. Contudo, o crescimento dessas cepas foi variável, indicando como causa a diferença na atividade amilolítica, seja pela especificidade das enzimas ao substrato amiláceo ou pela acessibilidade das enzimas aos grânulos de amido.

Todas as leveduras apresentaram a capacidade de hidrolisar a uréia formando duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, mas não hidrolisaram a gelatina em aminoácidos, ou seja, não possuem a enzima gelatinase (Quadro 4). As cepas de leveduras por

meio da ação enzimática, fizeram a decomposição da uréia em fontes de nitrogênio, sendo de grande importância para o crescimento microbiano.

No quadro 5, são apresentados os resultados da fermentação de carboidratos pelas leveduras.

Fermentação de Carboidratos								
Leveduras	<i>H. uvarum</i>				<i>H. guilliermondii</i>			
	<i>Cong.</i> (1)	<i>Cong.</i> (2)	<i>Liof.</i> (1)	<i>Liof.</i> (2)	<i>Cong.</i> (1)	<i>Cong.</i> (2)	<i>Liof.</i> (1)	<i>Liof.</i> (2)
Frutose	+	+	+	+	-	-	+	+
Glicose	+	+	-	+	-	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	+	+
Manitol	-	-	-	+	-	-	-	+
Sacarose	-	-	-	+	-	-	-	+
Xilose	-	-	-	+	-	-	-	+

Nota: 1 – cepas recuperadas em set/2015; 2 – cepas recuperadas em jun/2016; (+) positivo; (-) negativo.

Quadro 5. Resultados da fermentação de carboidratos
Fonte: Autoria própria, 2016.

Todas as leveduras apresentaram diferenças nos resultados referentes à fermentação de carboidratos quando comparadas entre si. Assis et al (2012) evidencia que as leveduras *Hanseniaspora* fermentam a glicose. Essa afirmação relatada pelo autor não apresenta concordância com os resultados obtidos com as cepas *H. uvarum* liofilizada (1) e *H. guilliermondii* congelada (1 e 2) (Quadro 5). No entanto, a capacidade de fermentar a glicose referente à cepa *H. uvarum* liofilizada, sugere erro operacional, uma vez que a cepa passa a “ganhar” esta capacidade fermentativa, evidenciando uma incoerência de resultado. Com relação à fermentação do manitol, sacarose e xilose, para a cepa *H. guilliermondii* recuperada nos dois momentos, se observa o mesmo fato.

A capacidade fermentativa da frutose e lactose foi observada em todas as cepas, com exceção das leveduras *H. guilliermondii* congeladas (1 e 2). Com base nos dados descritos por Kurtzman e Fell (1998), as leveduras *Hanseniaspora uvarum* fermentam glicose e não

fermentam a lactose. Os resultados apresentados mostram concordância para a fermentação da glicose, porém diferem na fermentação da lactose.

Crestani (2007) apresenta em seu trabalho as características bioquímicas de leveduras *Hanseniaspora sp.* e demonstra que essas leveduras fermentam a glicose e não fermentam a xilose e o manitol. No presente estudo, todas as cepas apresentam anuência com os dados apresentados pelo autor em relação a fermentação da xilose e manitol, com ressalva para as cepas *H. uvarum* liofilizada (2) e *H. guilliermondii* liofilizada (2).

Diferenças na assimilação e na fermentação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação diversificada na habilidade de fermentação de açúcares (GUIMARÃES, 2005).

Portanto o perfil bioquímico das leveduras em estudo apresenta variâncias quando comparado com dados da literatura e de vários autores, sugerindo que a causa das diferenças fisiológicas seja devido à agressividade que os métodos de conservação empregados causaram, uma vez que essas leveduras foram conservadas por congelamento a -80°C e por liofilização.

Segundo Sola *et al* (2012) a criopreservação (congelamento a -80°C) requer alguns cuidados para que seja realmente eficiente e que apesar da liofilização ser amplamente empregada na manutenção de diferentes micro-organismos e ser considerada uma técnica de conservação a longo prazo, as etapas que compõem o processo são capazes de causar injúrias ou danos celulares. Esses fatores podem afetar a viabilidade e estabilidade celular, sendo decorrentes principalmente do comportamento da água sob condições de baixas temperaturas, tendo como exemplo mais frequente, a crioinjúria (lesão celular causada durante os processos de congelamento e descongelamento), ocasionando alterações nas estruturas da membrana plasmática dos micro-organismos preservados.

Os resultados apresentados na literatura foram comparados com os resultados obtidos não considerando a linhagem das cepas utilizadas. Sugerindo que as características morfológicas e fisiológicas sofrem variações advindas também da diferença de linhagem dessas cepas.

Comparando os métodos de conservação em que as leveduras estavam submetidas, se observa que ambos foram eficientes para a preservação da viabilidade das estirpes estudadas, assim para a escolha do método seria necessário pensar no custo de armazenamento, que para liofilização não existe, enquanto para o congelamento a -80°C resulta no custo com energia elétrica. Por outro lado, o pesquisador nem sempre dispõe do liofilizador, tornando o congelamento a -80°C , mais viável neste caso. Entretanto, pensar em manter, estocar e

preservar coleções significa assegurar um patrimônio de culturas e bancos genéticos com atenção à morfologia, fisiologia, respostas celulares e teciduais. A variabilidade das populações microbianas determina a comparação experimental quanto ao melhor método, melhor temperatura e período de tempo para condições específicas, ou a combinação de dois ou mais métodos (SOLA et al, 2012).

CONCLUSÃO

Foi observada a seletividade do meio de cultura Ágar Malte Extrato de Levedura – YMA para as cepas *H. uvarum* e *H. guilliermondii* tanto congeladas quanto liofilizadas.

A avaliação morfológica das cepas, não mostrou distinção das características apresentadas com dados descritos na literatura, apresentando suas colônias brancas, opacas e com bordos lisos.

A avaliação fisiológica das cepas evidenciou diferenças na capacidade de fermentar a glicose e outros açúcares, como também na assimilação de citrato, nitrato e hidrólise do amido. Entretanto, todos os demais testes bioquímicos não sofreram variações, mostrando que o congelamento a -80°C e a liofilização em que as cepas foram submetidas foram eficientes preservando suas características por um período de nove meses.

As características morfológicas e fisiológicas das cepas de leveduras estudadas mesmo com pequenas variações, foram mantidas, garantindo a viabilidade destes microorganismos para a produção de compostos aromáticos em bebidas fermentadas, tanto por congelamento a -80°C , quanto por liofilização, mostrando que os dois métodos foram eficientes para garantir a viabilidade e características das leveduras *H. uvarum* e *H. guilliermondii*.

REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M.; CAÑAMÁS, T.P.; ASENSIO, A.; ANGUERA, M.; VIÑAS, I. *Microbial quality of commercial 'Golden Delicious' apples throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain)*. International Journal of Food Microbiology 108 (2006) 404–409.
- ASSIS, M.O.; MAMEDE, M.E.O.; GUIMARÃES A.G.; SANTOS L.S.; ROSA C.A. *Leveduras isoladas de uvas Vitis vinifera L. cultivadas na região equatorial brasileira*. Revista Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2012; 71(4):718-22. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552012000400015&lng=pt&nrm=iso> Acesso em ago.2015.
- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. *Coleções de culturas de microrganismos*. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.
- CRESTANI, J. *Isolamento E Caracterização de leveduras de uma Madeireira e sua Correlação com um caso Clínico de Criptococose*. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2007.
- FAITH, W.T.; NEUBERCK, C.E.; REESE, E. *Production and Applications of enzymes*. In Advances in Biochemical Engineering, n.1, 1991, p.77-111.
- GELLI, D. S.; RISTORI, C. A. e BUZZO, A. A. - *Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de Salmonella spp*. Revista Instituto Adolfo Lutz, 62(3): 159 - 164, 2003.
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Viabilidade de cepas de Malassezia pachydermatis mantidas em diferentes métodos de conservação*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, jun. 2004.
- GUIMARÃES, T.M. *Isolamento, Identificação e Seleção de Cepas de Levedura Saccharomyces cerevisiae para Elaboração de Vinho*. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2005.
- HAWKSWORTH, D.L. *Problems and prospects in the systematics of the Ascomycotina, Proceedings of the Indian Academy of Science, Plant Science*, v. 94, p. 319-339, 1985
- KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S. *Maintenance of Microorganisms, A Manual of Laboratory Methods*. London: Academic Press Inc.; 1984.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science B.V. 4th ed. Sara Burgerhartstraat 25, P.O Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands, 1998.

KURTZMAN, C.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.; FELL, J. W.; DEAK, T. *Methods to identify yeast*. In: BOEKHOUT, T. e ROBERT, V. *Yeast in Food: Beneficial and detrimental aspects*. Cambridge: CRC, 2003.

LIBKIND, D.; SAMPAIO, J.P.; VAN BROOCK, M. *Cystobasidiomycetes yeasts from Patagonia (Argentina): description of *Rhodotorula meli* sp. nov. from glacial meltwater*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2010), 60, 2251–2256

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. Editora: Artmed S.A. 12ª Edição. São Paulo. 2010.

MOSSEL, D. A. A.; BONANTS-VANLAARHOVEN, T. M. G.; LIGTENBERGMERKUS, A. M. Th.; WERDLER, M. E. B. *Quality Assurance of Selective Culture Media for Bacteria, Moulds and Yeasts: an Attempt at Standardization at the International Level*. *Journal of Applied Bacteriology*, ASM. Washington – D.C. : 1983. número 54. p. 313 – 327.

PHAFF, H. J. Isolation of yeasts from natural sources. In: LABEDA, D. P. (Ed.) *Isolation of biotechnological organism from nature*. New York: Mc Graw Hill, p. 53- 79, 1990.

PIETROWSKI, G.A.M.; GROCHOSKI, M.; SARTORI, G.F.; GOMES, T.A.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. *Viability of *Hanseniaspora uvarum* yeast preserved by lyophilization and cryopreservation*. *Yeast*. 32: 559–565, 2015.

ROBERT, V.; STALPERS, J.; BOEKHOUT, T.; TAN, S. *Yeast biodiversity and culture collections*. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G.(Eds) *Biodiversity and Ecophysiology of yeasts*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.

SILVA, N. da. *Testes bioquímicos para identificação de bactérias em alimentos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos; Laboratório de Microbiologia, 1996.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; SANTOS, R. F.S. dos. *Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água*. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SOLA, M.C; OLIVEIRA, A.P.D.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M.E. *Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade*. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1 3 9 8 – 2012. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>> Acesso em abr.2015.

TEIXEIRA, L. V. *Análise Sensorial na Indústria de Alimentos*. 21 f. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Jan/Fev, nº 366, 64: 12-21, 2009.

VITICULTURE & ENOLOGY. *Hanseniaspora guilliermondii*. The Regents of the University of California, Davis Campus. Disponível em: <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora_guilliermondii.html> Acesso em set. 2016.

XIAO, Z.; XU, P. *Acetoin Metabolism in Bactéria*. Critical Reviews in Microbiology, n.33, 2007, p.127–140.