

Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas à preservação prolongada por congelamento a -80°C e liofilização

RESUMO

Murilo Has

murilohas.mh@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-9673-0694>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Laura Neves Facco

laura_a_neves@hotmail.com
<http://orcid.org/0000-0001-8405-0686>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Monique de Paula Rosa

monique.p.r@hotmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1923-2536>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Giovana de Arruda Moura Pietrowski

giovana@utfpr.edu.br
<http://orcid.org/0000-0002-3061-1383>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

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 microrganismos a longo prazo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características fisiológicas e morfológicas de duas estirpes de leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas (*Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*), submetidas à conservação prolongada por congelamento a -80°C e liofilização, verificando a eficácia desses métodos de preservação. As recuperações das cepas foram realizadas em dois períodos distintos, sendo realizado teste ecométrico do meio de cultura usado na replicação e manutenção das cepas, avaliações morfológicas de crescimento em meio sólido e líquido, avaliações bioquímicas envolvendo fermentações de carboidratos e testes de assimilação de diversos compostos. 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, as demais avaliações bioquímicas não sofreram variações quando comparadas aos dados da literatura. Portanto, as características morfológicas e fisiológicas das cepas de leveduras estudadas, após sofrerem preservação a longo prazo, permanecem viáveis, possibilitando o uso dessas estirpes para a produção de compostos aromáticos em bebidas fermentadas. Além disso, a pesquisa ressalta a viabilidade da utilização tanto do congelamento a -80°C quanto da liofilização para a manutenção de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* por longos períodos.

PALAVRAS-CHAVE: *Hanseniaspora*. Congelamento. Liofilização. Leveduras.

INTRODUÇÃO

A descoberta de que as leveduras possuem um papel fundamental na fermentação foi o primeiro elo entre a atividade dos microrganismos 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, muitos esforços têm sido realizados 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 e XU, 2007).

Em consonância com Pietrowski et al. (2015), se verifica que o gênero *Hanseniaspora* contribui significativamente com aromas na fabricação de 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 microrganismo, 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 e SNELL, 1984; HAWKSWOTH, 1985; ABADIAS et al., 2006). Apesar da grande variedade de métodos de preservação que podem ser utilizados em microrganismos, muitos podem apresentar resultados distintos quanto à viabilidade, estabilidade fenotípica e genotípica conforme a espécie a ser preservada (OCDE, 2012; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

Como uma forma bastante utilizada para preservação de microrganismos 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 microrganismos, 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 teve como objetivo realizar a caracterização fisiológica e morfológica de leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas (*Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*), submetidas à preservação prolongada e recuperadas em dois períodos distintos, além de verificar a eficácia dos métodos de manutenção empregados, congelamento a -80 °C e liofilização.

MATERIAL E MÉTODOS

RECUPERAÇÃO DAS CEPAS

Foram coletadas cepas congeladas e liofilizadas do Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa (UTFPR – PG), armazenadas por um período de sete anos. As duas cepas de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* (congeladas e liofilizadas), foram recuperadas em dois momentos: (1) setembro de 2015 e (2) junho de 2016, para a execução das avaliações propostas, realizadas em duplicata. As cepas de leveduras congeladas e liofilizadas, foram recuperadas inicialmente em água peptonada 0,1% e 1 ml de glicose (1%), e depois em caldo Glucose – peptona –

extrato de levedura (GPBY) de acordo com a metodologia descrita por 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 a 30 °C por 24 horas, para a obtenção de colônias típicas e isoladas (PIETROWSKI et al., 2015).

TESTE ECOMÉTRICO

O teste ecométrico foi realizado utilizando os meio de cultura Ágar YMA para as cepas de *H. uvarum* e *H. guilhermondii* (cepas desejadas), e Ágar Cetrimide para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphi* e *Pseudomonas aeruginosa* (cepas não desejadas). A interpretação dos resultados foi executada, calculando-se o Índice de Crescimento Absoluto (ICA), onde 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. (MOSEL et al.,1983).

AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS

As cepas de leveduras obtidas em caldo GPBY foram inoculadas por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo meio sólido Ágar 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 GPBY foram inoculadas por estriamento contínuo em tubos de ensaio contendo Ágar 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 GBPY 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).

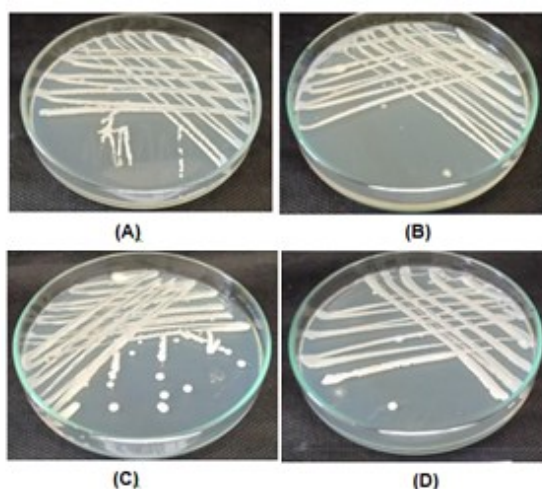
AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

Foram realizados testes bioquímicos como: teste de catalase, coloração de gram, hidrólise do amido e urease, seguindo o procedimento descrito por Silva et al., (2010). Testes de utilização do citrato, redução do nitrato, vermelho de metila e Voges – Proskauer, e fermentação de carboidratos (frutose, glicose, lactose, manitol, sacarose e xilose) foram executados seguindo a metodologia de Silva (1996). A análise de motilidade, hidrólise da gelatina e teste do indol, foram realizados segundo Madigan et al. (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado o crescimento em placas e verificado que as cepas em estudo, apesar de serem preservadas por métodos distintos, apresentaram aspectos semelhantes, como coloração das colônias, tamanho e forma (Figura1).

Figura 1 – Colônias típicas das leveduras em meio Ágar YMA.



Nota: (A) – *H. uvarum* congelada; (B) – *H. uvarum* liofilizada; (C) *H. guilliermondii* congelada; (D) – *H. guilliermondii* liofilizada.

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

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).

Quadro 1 – Características morfológicas das colônias de leveduras em Ágar YMA em placas de Petri.

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 setembro/2015; (2) – cepas recuperadas em junho/2016; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas; Pequena (2 mm); Média (3mm a 5 mm); Grande (maior que 5 mm).

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

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

Quadro 2 – Características morfológicas das leveduras em tubos de ensaio com ágar YMA inclinado.

Leveduras	Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização, em tubos de ensaio com ágar inclinado.				
	Forma	Qtde.	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 setembro/2015; (2) – cepas recuperadas em junho/2016; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

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

Quadro 3 – Crescimento das leveduras preservadas por congelamento e liofilização em Caldo GPBY.

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

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

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

Pietrowski et al. (2015) em seu trabalho verificaram que as colônias de leveduras do gênero *H. uvarum* conservadas por liofilização, se apresentam esbranquiçadas, com bordos lisos e brilhantes. No presente estudo, foi possível a identificação dessas características relacionadas a este gênero de levedura, porém, houve discordância com os autores, na característica de brilhante para opaca. Segundo dados da Viticulture and Enology (2016), as leveduras do gênero *H. 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; BOEKHOUT (2011), o aspecto colonial das cepas pertencentes ao gênero *H. guilliermondii*, coincidem com os resultados obtidos, diferenciando apenas a característica de opaca para brilhante.

As duas espécies de leveduras analisadas apresentaram características morfológicas semelhantes, revelando que dentro de um prazo de nove meses sendo armazenadas por congelamento a -80°C e liofilização, seu aspecto morfológico não foi alterado. Após a realização do teste ecométrico foi observado que o meio de cultura Ágar YMA se mostrou seletivo e produtivo como evidenciado nos dados da tabela 1.

Tabela 1 – Índice de crescimento absoluto (ICA) considerando a produtividade e seletividade por meio do teste ecométrico

SELETIVIDADE E PRODUTIVIDADE			
ÁGAR YMA		ÁGAR CETRIMIDE	
Microrganismo	ICA	Microrganismo	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.

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

Conforme verificado na tabela 1, o meio (YMA) quanto a sua produtividade e 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, resultados evidenciados no presente estudo

Gelli et al. (2003) ao realizarem o controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella sp.*, utilizaram como método o teste ecométrico e verificaram que testes ecométricos, de seletividade e produtividade, e de recuperação, demonstraram a adequação 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 neste estudo mostrou a eficiência do Ágar YMA para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*.

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

Quadro 4 – Perfil Bioquímico das leveduras preservadas por congelamento e liofilização.

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

Nota: 1 – cepas recuperadas em setembro/2015; 2 – cepas recuperadas em junho/2016; (+) positivo; (-) negativo; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas.

Fonte: Elaborado pelos autores (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 realizarem uma série de testes fisiológicos em leveduras isoladas de uvas *Vitis vinifera L.* verificou que leveduras do gênero *Hanseniaspora*, não assimilam o citrato. Essa afirmação mostra divergência 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). Nesse processo, o

microrganismo consegue suprir a ausência do oxigênio atmosférico derivando-o do nitrato (SILVA, 1996). Segundo dados da Viticulture & Enology, as leveduras *H. uvarum* e *H. guilliermondii* não assimilam o nitrato, sendo consideradas como aeróbicas. Tal afirmação não condiz com os resultados apresentados pelas cepas do gênero *H. uvarum* verificados em nossa pesquisa.

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* 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 realizaram a decomposição da ureia 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.

Quadro 5 – Resultado da Fermentação de Carboidratos

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

Nota: (1) – cepas recuperadas em setembro/2015; (2) – cepas recuperadas em junho/2016; (+) positivo; (-) negativo; (Cong.) – cepas congeladas; (Liof.) – cepas liofilizadas.

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

Todas as leveduras apresentaram diferenças nos resultados referentes à fermentação de carboidratos quando comparadas entre si. Assis et al. (2012) evidenciam que as leveduras *Hanseniaspora* fermentam a glicose. No entanto, em nossa investigação, os resultados obtidos com as cepas *H. uvarum* liofilizada (1) e *H. guilliermondii* congelada (1 e 2) se mostram distintos (Quadro 5). 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; FELL; BOEKHOUT (2011), as leveduras *H. 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* 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).

As diferenças na assimilação e na fermentação de compostos são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação diversificada quanto a essa habilidade (GUIMARÃES, 2005), o que pode ser verificado em um estudo de Martin et al. (2018), que

apresentam diferentes variações quanto a assimilação de compostos por leveduras do gênero *Hanseniaspora*.

O perfil bioquímico das leveduras em estudo apresentou variâncias comparado aos dados obtidos na literatura e resultados de estudos de diferentes autores. Sugere-se que esse fato se dá pelo dano celular causado no emprego dos métodos de criopreservação, uma vez que as estirpes analisadas foram conservadas por congelamento a -80°C e por liofilização durante um longo período.

Para prevenir tais variações na assimilação de compostos de carbono, Sola et al. (2012) citam que a criopreservação requer alguns cuidados para que seja realmente eficiente, e que apesar da liofilização ser amplamente empregada na manutenção de diferentes microrganismos, as etapas que compõem o processo são capazes de causar injúrias ou danos celulares (crioinjúria). Dellaretti (2014) diz que a crioinjúria pode ser um evento letal. O congelamento é um processo probabilístico e, na maioria dos casos, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular, afetando a estabilidade celular e ocasionando alterações nas estruturas da membrana plasmática dos microrganismos, assim como foi observado.

O objetivo da preservação de uma linhagem além conservar o estado inicial do microrganismo evitando mutações indesejáveis, também perpassa a máxima preservação da vitalidade das células e o número de células viáveis (PASSADOR et al., 2010). Analisando os métodos de conservação em que as leveduras estavam submetidas, foi observado que ambos se mostraram eficientes para a preservação das estirpes estudadas.

Para realizar uma comparação entre ambos, 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, devido ao fácil acesso.

Apesar da grande variedade de métodos de preservação que podem ser utilizados em microrganismos, muitos, no entanto, podem apresentar resultados distintos quanto à viabilidade, estabilidade fenotípica e genotípica conforme a espécie a ser preservada e devem ser selecionados também de acordo com a

infraestrutura disponível pelo laboratório (OCDE, 2012; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

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

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, 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.

Analisando os resultados obtidos pela avaliação fisiológica das cepas, foram observadas mínimas alterações na assimilação e na fermentação de compostos de carbono. As discrepâncias em relação à dados da literatura e de outros estudos, quanto a capacidade de fermentar a glicose e outros açúcares, como também na assimilação de citrato, nitrato e hidrólise do amido, sugere possíveis alterações nas estruturas da membrana plasmática dos microrganismos, ocasionadas pela crioinjúria.

Entretanto, todos os demais testes bioquímicos não apresentaram variações, evidenciando a eficácia do congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e da liofilização para a preservação das cepas submetidas à preservação prolongada. Pela garantia das características morfológicas e fisiológicas das cepas, se mantém a viabilidade desses microrganismos para a produção de compostos aromáticos em bebidas fermentadas, ressaltando a relevância da utilização desses métodos para a estocagem de leveduras *H. uvarum* e *H. guilliermondii*.

Morphological and physiological characterization of yeasts submitted to prolonged preservation by freezing at -80 °C and lyophilization

ABSTRACT

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°C and lyophilization are widely used methods for preserving microorganisms in the long term. The present study aimed to evaluate the physiological and morphological characteristics of two yeast strains used in the fermented beverage industry (*Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii*), subjected to prolonged conservation by freezing at -80 °C and freeze-drying, verifying the effectiveness of these methods of preservation. The recoveries of the strains were carried out in two different periods, with an ecometric test of the culture medium used in the replication and maintenance of the strains, morphological evaluations of growth in solid and liquid medium, biochemical evaluations involving fermentations of carbohydrates and tests of assimilation of several compounds. The results showed the selectivity of the culture medium Agar Malt Yeast Extract (YMA) for the studied strains. In the biochemical profile, the evaluation of the strains showed differences in the ability to ferment glucose and other sugars as well as in the assimilation of citrate, nitrate and starch hydrolysis, however, the other biochemical evaluations did not suffer variations when compared to the literature data. Therefore, the morphological and physiological characteristics of the studied yeast strains, after undergoing long-term preservation, remain viable, enabling the use of these strains for the production of aromatic compounds in fermented drinks. In addition, the research highlights the feasibility of using both freezing at -80°C and freeze drying for the maintenance of *H. uvarum* and *H. guilliermondii* for long periods.

KEYWORDS: *Hanseniaspora*. Freezing, Lyophilization. Yeasts.

REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M. et al. Microbial quality of commercial 'Golden Delicious' apples throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain). **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 3, p. 404-409, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.011>
- ASSIS, Mariana Oliveira et al. Leveduras isoladas de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas na região equatorial brasileira. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 4, p. 718-722, 2012.
- 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. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2007.
- DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Universidade Federal São João Del-Rei. Bacharelado interdisciplinar em Biosistemas, Campus de Sete Lagoas. 2014. Monografia. 36 p. Disponível em:
<<https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/cobib/Dellaretti.pdf>> Acesso em abr. 2020.
- FAITH, W. T.; NEUBECK, C. E.; REESE, E. T. **Production and applications of enzymes**. In: *Advances in Biochemical Engineering*, Volume 1. Springer, Berlin, Heidelberg, 1971. p. 77-111. <https://doi.org/10.1007/BFb0044731>
- GELLI, Dilma Scala; RISTORI, Christiane Asturiano; BUZZO, Adriana Aparecida. Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella ssp*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 159-164, 2003.
- GIRÃO, Marília Dutra et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000300007>
- 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: Plant Sciences**, v. 94, n. 2-3, p. 319, 1985.

HOFLING, JF-Gonçalves et al. **Isolamento e caracterização de fungos patogênicos de importância médica**. Paco Editorial, 2016.

KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of Microorganisms**, A Manual of Laboratory Methods. London: Academic Press Inc.; 1984.

KURTZMAN, Cletus; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, Teun (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier, 2011.

KURTZMAN, C. et al. **Methods to identify yeast**. In: BOEKHOUT, T. e ROBERT, V. *Yeast in Food: Beneficial and detrimental aspects*. Cambridge: CRC, 2003.
<https://doi.org/10.1533/9781845698485.69>

LIBKIND, Diego; SAMPAIO, Jose Paulo; VAN BROOCK, Maria. Cystobasidiomycetes yeasts from Patagonia (Argentina): description of *Rhodotorula meli* sp. nov. from glacial meltwater. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 9, p. 2251-2256, 2010. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018499-0>

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12ª. Ed. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, v. 1160, 2010.

MARTIN, Valentina et al. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines—a review. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 76, 2018.
<https://doi.org/10.3390/fermentation4030076>

MOSSEL, D. A. A. et al. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, n. 3, p. 313-327, 1983.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02623.x>

OCDE. **Versão brasileira do documento diretrizes da OCDE de boas práticas para centros de recursos biológicos**. DOQ-CGCRE-034 Revisão: 2012.

PASSADOR, M. M. et al. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, São Paulo, [online], v. 72, n. 1, p. 51-55, 2010.

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, Giovana de Arruda Moura et al. Viability of *Hanseniaspora uvarum* yeast preserved by lyophilization and cryopreservation. **Yeast**, v. 32, n. 8, p. 559-565, 2015. <https://doi.org/10.1002/yea.3079>

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 et al. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SOLA, Marília Cristina et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 8, n. 14, p. 1398, 2012. Disponível em:
<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>>
Acesso em abr. 2015.

TEIXEIRA, Lílian Viana. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, p. 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, Zijun; XU, Ping. **Acetoin metabolism in bacteria**. Critical reviews in microbiology, v. 33, n. 2, p. 127-140, 2007.
<https://doi.org/10.1080/10408410701364604>

Submetido: 27 out. 2019.

Aprovado: 04 mai. 2020.

Publicado: 04 mai. 2020.

DOI: 10.3895/rbta.v14n1.11003

Como citar:

HAS, Murilo et al. Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas à preservação prolongada por congelamento a -80 °C e liofilização. **R. bras. Tecnol. Agroindustr.**, Francisco Beltrão, v. 14, n. 1, p. 3122-3138, jan./jun. 2020. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Murilo Has

Rua Felipenses, n. 95-CEP 84062-627-Bairro Chapada, Ponta Grossa, Paraná. Brasil.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

