

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

**Análise das leveduras do mosto da fermentação alcoólica de alambiques
artesanais produtores de cachaça em Pernambuco**

**Recife/PE
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**Análise das leveduras do mosto da fermentação alcoólica de alambiques
artesanais produtores de cachaça em Pernambuco**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR:

Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior
Departamento de Genética – UFPE

CO-ORIENTADORA:

Dra. Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro
CCBS – UNICAP

**Recife/PE
2008**

Vila Nova, Meiriana Xavier

Análise das leveduras do mosto da fermentação alcólica de alambiques artesanais produtores de cachaça em Pernambuco.
/ Meiriana Xavier Vila Nova. – Recife: A Autora, 2008.

118 fls. .: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UFPE. CCB

1. Fermentação alcoólica 2. *Saccharomyces cerevisiae*
3. Cachaça I.Título

663

CDU (2^a. Ed.)

UFPE

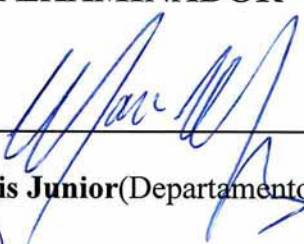
660.62

CDD (22^a. Ed.)

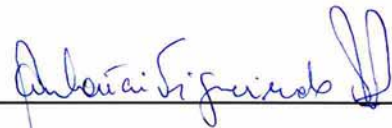
CCB – 2008 – 33

**Análise das leveduras da fermentação alcoólica em três alambiques
com diferentes níveis de qualidade de produção de cachaça em
Pernambuco**

BANCA EXAMINADOR



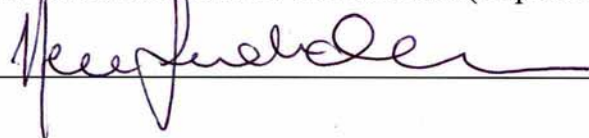
Prof. Dr. Marcos Antonio Morais Junior(Departamento de Genética - UFPE)



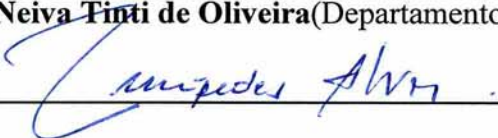
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto(Departamento de Morfologia e Fisiologia - UFPE)



Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta(Departamento de Micologia - UFPE)



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



Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho(ICBS - UFAL)

SUPLENTES:

Profa. Dra. Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro(CCBS - UNICAP)

Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon(Departamento de Genética - UFPE)

DEDICO

A minha Mãe, **Ivone Xavier do Nascimento**, pelo
carinho e apoio que nunca faltou.

da fermentação alcoólica

OFEREÇO

À minha irmã, **Marione Xavier Vila Nova**,
pela amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pois devo minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, através do Centro de Ciências Biológicas - CCB pela oportunidade de cursar o Doutorado nesta Pós-Graduação e ampliar os meus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE pelo suporte financeiro e técnico-científico no decorrer deste trabalho.

A meu orientador Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior, pela amizade, respeito e paciência, tornando assim a pesquisa prazerosa.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro, pela amizade construída, paciência e boa vontade de atender a todos os momentos que precisei.

Ao Professor Alexandre Ricardo Pereira Schuler do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, pela boa vontade e orientação durante as atividades de cromatografia.

A minha gratidão aos micros e pequenos empresários produtores de cachaça no Estado de Pernambuco, em particular aos proprietários dos Alambiques do Mirante da Cachaça - Paudalho/PE, São Saruê - Igarassu/PE e Engenho Água Doce - Vicência/PE, por terem disponibilizado suas instalações para as coletas e tomadas de fotografias.

Aos Professores, Doutores e Membros da Banca Examinadora, Eurípedes Alves da Silva Filho, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Cristina Maria de Souza Motta, Neiva Tinti de Oliveira e Ana Maria Benko Iseppon por terem aceitado a contribuírem como examinadores deste meu trabalho.

A todos os meus colegas de turma da Pós-Graduação do CCB, em especial Regina e a todos os meus colegas do Laboratório de Genética e Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

A doutoranda Carolina Einstein e a mestra Mariland Francisco de Paula, pela amizade e apoio.

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DA CACHAÇA.....	17
2.1.1 Histórico da cachaça.....	17
2.1.2 Definição e caracterização da cachaça.....	19
2.1.3 Matéria-prima.....	20
2.1.4 Extração do caldo e condições de fermentação.....	20
2.1.5 Produção de cachaça.....	22
2.1.6 Fermentação alcoólica	23
2.1.7 Compostos secundários na produção da cachaça.....	24
2.2 PROPAGAÇÃO DO FERMENTO.....	26
2.2.1 Leveduras utilizadas na produção de cachaça.....	26
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.3 <i>Candida milleri</i>	29
2.2.4 <i>Pichia guilhermondii</i>	30
2.2.5 <i>Pichia caribbica</i>	31
2.2.6 <i>Caida ubatubensis</i>	31
2.2.7 <i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	31
2.2.8 <i>Dekkera bruxellensis</i>	32
2.2.9 Fatores que influenciam diretamente na propagação do fermento.....	32
2.2.9.1 Aeração e agitação.....	32
2.2.9.2 Temperatura.....	33
2.2.9.3 Requerimentos para o crescimento e composição química do mosto.....	33
2.2.9.3.1 Fonte de carbono.....	34
2.2.9.3.2.Fonte nitrogênio	35
2.2.9.3.3 Adição de farinha de milho e de soja ao mosto.....	36
2.2.9.3.4 Fontes de minerais.....	37

2.3 FERRAMENTAS MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERSIDADE	39
2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. REFERÊNCIAS.....	43
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA EXISTENTE NO MOSTO FERMENTADO DE ALAMBIQUES ARTESANAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO	52
INTRODUÇÃO	53
METODOLOGIA	54
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO	60
BIBLIOGRAFIA.....	61
5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESPECIES <i>Sacharomyce cerevisiae</i> EXISTENTE NO MOSTO FERMENTADO DE ALAMBIQUES ARTESANAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	68
INTRODUÇÃO	70
METODOLOGIA	74
RESULTADOS	
DISCUSSÃO	72
BIBLIOGRAFIA.....	78
5.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA NO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	89
INTRODUÇÃO	90
MATERIAL E MÉTODOS.....	91
RESULTADOS	95
DISCUSSÃO	97
BIBLIOGRAFIA.....	100
6. CONCLUSÕES.....	109
7.APÊNDICES.....	110

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

1.	Fluxograma da produção de cachaça.....	23
2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Micrografia eletrônica de varredura do estágio de reprodução assexuada por brotamento; C) Estrutura celular.....	29
3.	<i>Candida milleri</i> . A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.....	30
4.	<i>Pichia guilliermondii</i> . A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.....	30
5.	<i>Pichia caribica</i> . A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.....	31
6.	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> . A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.....	32
7.	Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação da região espaçadora transcrita interna (ITS), dos sítios de reconhecimento dos iniciadores universais ITS4 e ITS5 e dos domínios D1-D2 da região do gene 26S. Além dos genes, estão indicados: espaçador transcrito externo (ETS) e espaçador não transcrito (NTS).....	40

Artigo Científico 1 - Caracterização molecular da espécie *Sacharomyce cerevisiae* existente no mosto fermentado de alambiques artesanais no Estado de Pernambuco

1.	Eletroferograma dos perfis (GTG) ₅ das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , isoladas do mosto fermentado de destilarias produtoras de álcool (SILVA-FILHO et al, 2005).....	63
2.	Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GTG) ₅ (A), (GACA) ₄ (B), e M13 (C) das <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> , encontradas no alambique Água Doce/PE, primeira e segunda batelada, safra 2005/2006, em gel de agarose. Pista M, marcador de peso molecular 100pb. Na terceira pista, encontra-se a levedura seqüenciada.....	64
3.	Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GTG) ₅ (A), (GACA) ₄ (B), e M13 (C) das <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> , encontradas no alambique São Sarué/PE, safra 2005/2006, em gel de agarose. Pista M, marcador de peso molecular 100pb. Na segunda pista, encontra-se a levedura seqüenciada.....	65
4.	Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GTG) ₅ (A), (GACA) ₄ (B), e M13 (C) das <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> , encontradas no alambique O Mirante da Cachaça/PE, safra 2005/2006, em gel de agarose. Pista M, marcador de peso molecular 100pb. Na terceira pista, encontra-se a levedura seqüenciada.....	66
5.	Dendrograma dos perfis resultantes da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG) ₅ das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , isoladas nos Alambiques do Engenho Água Doce - Vicência/PE, São Sarué - Igarassu/PE e O Mirante da Cachaça - Paudalho/PE, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Simple Matching (SM).....	67

Artigo Científico 2 - Caracterização molecular da microbiota existente no mosto fermentado de alambiques artesanais no Estado de Pernambuco

1. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA dos isolados de leveduras obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas de 1 a 18 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce – Vicência/PE, safra 2005/2006: 1. SADB1C1(4), 2. SADB1C1(2), 3. SADB1C3(20), 4. CADB1C5(4), 5. CADB1C6(1), 6. SADB1C1(8), 7. CADB1C3(1), 8. SADB1C4(1), 9. CADB1C5(1) 10. SADB1C6(7), 11. SADB1C7(13), 12. SADB1C1(5), 13. SADB1C2(1), 14. SADB1C3(13), 15. SADB1C4(3), 16. SADB1C5(1), 17. SADB1C6(2), 18. SADB1C7(1)..... 80
2. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GACA)₄ (A), (GTG)₅ (B) e M13 (C) das leveduras do Alambique do Engenho Água Doce – Vicência/PE, safra 2005/2006, em gel de agarose. Na pista M, o marcador de peso molecular 100bp; Na pista 1, encontra-se o DNA de *Candida* sp. SADB1C1(4); nas pistas de 2 a 5, encontram-se os DNAs de *Pichia caribbica*: 2. SADB1C1(2), 3. SADB1C3(20), 4. CADB1C5(4) e 5. CADB1C6(1); Nas pistas de 6 a 11, encontram-se os DNAs de *Candida miller*: 6. SADB1C1(8), 7. CADB1C3(1), 8. SADB1C4(1), 9. CADB1C5(1) 10. SADB1C6(7) e 11. SADB1C7(13); Nas pistas de 12 a 18, encontram-se os DNAs de *Saccharomyces cerevisiae*: 12. SADB1C1(5), 13. SADB1C2(1), 14. SADB1C3(13), 15. SADB1C4(3), 16. SADB1C5(1), 17. SADB1C6(2) e 18. SADB1C7(1)..... 81
3. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, encontra-se o marcador de peso molecular 100bp e na pista 5, DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Nas pistas de 1 a 4 e de 6 a 9 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce - Vicência/PE, safra 2006/2007: 1. SADB1(1), 2. SADB2C1(4), 3. SADB2C1(5), 4. SADB2C1(9), 6. SADB2C1(14), 7. SADB2C2(8), 8. SADC2(9), 9. SADC2(11)..... 82
4. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GACA)₄ (A), (GTG)₅ (B) e M13 (C). Na pista M, encontra-se o marcador de peso molecular 100bp e na pista 5, DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Nas pistas de 1 a 4 e de 6 a 9 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce - Vicência/PE, safra 2006/2007, em gel de agarose: 1. SADB1(1), 2. SADB2C1(4), 3. SADB2C1(5), 4. SADB2C1(9), 6. SADB2C1(14), 7. SADB2C2(8), 8. SADC2(9), 9. SADC2(11)..... 83
5. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pista 1, encontra-se o DNA de *Saccharomyces cerevisiae* e nas pistas de 2 a 7 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do São Saruê. 1. CAIB1(1), 2. CAIB1(8), 3. CAIBIC2(13), 4. CAIB1C3(21), 5. SAIB1C1(41), 6. (SAIB1C2(51), 7. SAIB1C3(61))..... 84
6. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GACA)₄ (A), (GTG)₅ (B) e M13 (C) das leveduras do Alambique Alambique São Saruê - Igarassu/PE, da safra 2005/2006, em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas 1 a 4 os DNAs dos isolados: 1. CAIB1(1), 2. CAIB1(8), 3. CAIBIC2(13), 4. CAIB1C3(21), 5. SAIB1C1(41), 6. (SAIB1C2(51), 7. SAIB1C3(61), 8. SAIB1C4(67))..... 85
7. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas de 1 a 8 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique O Mirante da Cachaça – Paudalho/PE, safra 2005/2006: 1. CPDC2(5) (*Candida ubatubensis*), 2. CPDC2(2) (*Candida drosophilae*), 3. SPDC1(13) (*Pichia caribbica*), 4. CPDC2(3) (*Pichia guilliermondii*), 5. SPDC2(7) (*Zygosaccharomyces* sp), 6. CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), 7. CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), 8. (NOME DO ISOLADO) *Sacharomyces cerevisiae*, 9. (NOME DO ISOLADO) *Sacharomyces cerevisiae*..... 86
8. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GACA)₄ (A), (GTG)₅ (B) e M13 (C) das leveduras do Alambique do Mirante da Cachaça – Paudalho/PE, da safra 2005/2006, em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas 1 a 5 encontram-se os DNAs de *Saccharomyces cerevisiae* (ITS/850pb): 1. SPDC1(1), 2. SPDC1(2), 3. SPDC2(1), 4. SAQPDC2(2), 5. SPDC1(13) (*Pichia caribbica*), 6. SPDC2(7) (*Zygosaccharomyces* sp), 7. SPDC2(11) (*Pichia caribbica*), 8. CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), 9. CPDC2(2) (*Candida drosophilae*), 10. CPDC2(3) (*Pichia guilliermondii*), 11. CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), 12. CPDC2(5) (*Candida ubatubensis*)..... 87

Artigo Científico 3 - Caracterização fisiológica de leveduras envolvidas no processo de produção de cachaça no Estado de Pernambuco

1.	Alambique do Engenho Água Doce - Vicência/PE: A) Começo da fermentação; B) Fim da fermentação; C) Engenho de moer cana; D) Dorna de cobre de fermentação; E) Destilador; F) Alambique; G) Produto final da Cachaça.....	103
2.	Alambique São Sarué - Igarassu/PE: A) Engenho de moer cana; B) Dorna metálica de fermentação; C) Fermento de corte; D) Barris de carvalho para envelhecimento da cachaça.....	104
3.	Alambique do Mirante da Cachaça – Paudalho/PE: A) Engenho de moer cana; B) Dornas de ferro de fermentação e destilador de ferro; C) Dorna de ferro; D) Fim da fermentação.....	105
4.	Concentração de metabólitos secundários de fermentação alcoólica nas respectivas coletas das amostras dos três Alambiques: Água doce (A), São Sarué (B) e O Mirante da Cachaça (C).....	106
5.	Concentração de metabólitos Secundários de Fermentação Alcoólica (mg/100ml/24horas): A) Acetadeído, B) Acetona, C) Álcool Iso-Amílico, D) Álcool N-Amílico, E) Álcool Iso-Butílico, F) Álcool N-Propílico, G) Acetato de Etila e H) Teor de Álcool, formados por sete espécies de leveduras isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal na Zona da Mata do Estado de Pernambuco.....	107
6.	Análise de sete espécies de leveduras isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal na Zona da Mata do Estado de Pernambuco. A) Consumo de açúcares redutores totais. B) Produção de glicerol.....	108

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

I	Composição típica da cachaça pela legislação brasileira.....	19
II.	Limites máximos para contaminantes orgânicos e inorgânicos.....	20
III.	Composição de leveduras de fermento prensado.....	35
IV.	Constituintes inorgânicos das leveduras.....	38

Artigo Científico 2 - caracterização molecular da microbiota existente no mosto fermentado de alambiques artesanais no Estado de Pernambuco

1.	Tipagem das leveduras dos alambiques produtoras de cachaça artesanal no Estado de Pernambuco	80
-----------	--	----

Artigo Científico 3 - Caracterização fisiológica de leveduras envolvidas no processo de produção de cachaça no Estado de Pernambuco

1.	Espécies de leveduras encontradas nos alambiques produtores de cachaça artesanal no Estado de Pernambuco.....	102
2.	Cálculo da concentração de subprodutos de fermentação alcoólica por cromatografia a gás. Onde C_p = Concentração do padrão (mg/100 mL), A_p = Área do padrão, F = Fator de resposta, A_a = Área da amostra, C_a = Concentração da amostra (mg/100 mL). Fator de correção é 1.....	102

Análise Das Leveduras Do Mosto Da Fermentação Alcoólica De Alambiques Artesanais Produtores De Cachaça Em Pernambuco

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

RESUMO

A produção de cachaça no Brasil data do início da colonização. Entretanto, as indústrias de cachaça até 1945 eram rurais e rudimentares, não havendo padrões de qualidade. A produção doméstica aumentou bastante e desde então o processo de produção vem sendo aperfeiçoado e melhorado, o que tem acarretado melhorias no rendimento, produtividade e qualidade do produto final. É uma bebida tipicamente brasileira, vem conquistando parcela crescente do mercado internacional de bebidas destiladas por ser considerada exótica e de sabor especial. O processo artesanal, no entanto, carece de procedimentos tecnológicos mais refinados que tornem o produto competitivo no mercado, tanto em termos de produtividade quanto em qualidade. Estas características estão diretamente relacionadas com a qualidade da população de leveduras envolvidas no processo fermentativo da cachaça. A análise desta população poderá fornecer subsídios para a identificação de linhagens específicas para os diferentes alambiques, as quais deverão unir o maior rendimento com a produção de metabólitos que qualificam o produto em termos de aroma e sabor. A partir destes fatos, têm-se como objetivos caracterizar e identificar a população de leveduras do processo fermentativo em diferentes unidades de produção de cachaça artesanal da zona da mata de Pernambuco e avaliar a produção de metabólitos fermentativos de interesse para a qualidade organoléptica da cachaça a partir de culturas puras das leveduras isoladas. A caracterização molecular das leveduras isoladas através de marcadores de PCR, forneceram dados importantes para detectar quais são os perfis de leveduras presente na fermentação da cachaça e através do sequenciamento detectamos as espécies. Os isolados foram caracterizados quanto ao perfil de amplificação do locus ITS1-5.8s-ITS2 do DNA ribossomal e agrupados em ribotipos. A relação genética entre os isolados do mesmo ribotipo e a diferenciação entre os ribotipos foram comprovadas pela técnica de *DNA-fingerprinting* usando os iniciadores (GTG)₅, M13 e (GACA)₄. Um ou dois representantes de cada ribotipo foi posteriormente identificado por sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S de rDNA. Além de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram encontradas também as espécies *Pichia caribbica* (*Candida fermentati*), *Candida millei*, *C. drosophilae*, *C. ubatubensis*, *C. guillermondii* e *Zygosaccharomyces fermentati*. Dois isolados foram identificados como *Candida* sp e *Zygosaccharomyces* sp. Para as características metabólicas foram cultivadas células em meio YPD, coletadas e reinoculadas em meio de caldo de cana filtrado para concentração final de células de 10% (m/v). Os inóculos foram incubados até o final da fermentação, os metabólitos presentes nos sobrenadantes foram determinados por cromatografia gasosa. As linhagens isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros produção de rendimento da fermentação e na formação dos principais compostos voláteis. Não foi observada a produção de metanol nos ensaios fermentativos.

Palavras chave: fermentação alcoólica, caracterização genética, *Saccharomyces cerevisiae*, cachaça, ISSR, (GTG)₅, (GACA)₄, M13.

ANALYSIS OF THE LEAVENINGS OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION IN THREE STILLS WITH DIFFERENT LEVELS OF QUALITY OF PRODUCTION OF CACHAÇA IN PERNAMBUCO

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

ABSTRACT

The production of cachaça in Brazil dates of the beginning of the settling. However, the industries of cachaça up to 1945 were agricultural and rudimentary, not having quality standards. The domestic production increased sufficiently and since then the production process comes being perfected and improved, what it has caused improvements the income, productivity and final product quality. It is a typically Brazilian drink, it comes conquering increasing parcel of the international market of drinks distilled for being considered exotic and of special flavor. The artisan process, however, lacks of technological procedures finer than they become the competitive product in the market, as much in terms of productivity how much in quality. These characteristics directly are related with the quality of the population of involved leavenings in the fermentative process of cachaça. The analysis of this population will be able to supply subsidies the identification of specific ancestries for the different stills, which will have to join the biggest income with the production of metabólitos that characterize the product in aroma terms and flavor. To leave of these facts, it is had as objective to characterize and to identify the population of leavenings of the fermentative process in different units of artesanal production of cachaça of the zone of the bush of Pernambuco and to evaluate the production of fermentative metabólitos of interest for the organoléptica quality of cachaça from pure cultures of the leavenings isoladas. A molecular characterization of the isolated leavenings through PCR markers, had supplied given important to detect which is perfins of leavenings present in the fermentation of cachaça and through the sequenciamento we detect the species. The isolated ones had been characterized how much to the profile of amplification of locus ITS1-5.8s-ITS2 of the ribossomal and grouped DNA in ribotipos. The genetic relation exactly enters the isolated ones of ribotipo and the differentiation between the ribotipos had been proven by the technique of DNA-fingerprinting using the starters (GTG)₅, M13 e (GACA)₄. One or two representative of each ribotipo later was identified by sequenciamento of region D1/D2 of the gene 26S of rDNA. Beyond different ancestries of *Saccharomyces cerevisiae* the species *caribbica* *Pichia* (*Candida fermentati*), *Candida* had also been found *milleri*, *C. drosophilae*, *C. ubatubensis*, *C. guilliermondii* and *Zygosaccharomyces fermentati*. Two isolated ones had been identified as *Candida* sp and *Zygosaccharomyces* sp. Pra the metabolic characteristics cells had been cultivated in half YPD, collected and reinoculadas in way of broth of sugar cane filtered for final concentration of 10% cells (m/v). The inóculos had been incubados until the end of the fermentation, indicated for the stop in the Co₂ production and the metabólitos gifts in the sobrenadantes had been determined by gaseous chromatography. The isolated ancestries of producing stills of aguardente artisan had presented significant differences in relation to the fermentative parameters of income of the fermentation and in the formation of main volatile composites. The methanol production was not observed in the fermentative assays.

Words key: alcoholic fermentation, genetic characterization, *Saccharomyces cerevisiae*, ISSR, (GTG)₅, (GACA)₄, M13.

1. INTRODUÇÃO

A cachaça, bebida tipicamente brasileira, vem conquistando parcela crescente do mercado internacional de bebidas destiladas por ser considerada exótica e de sabor especial. Embora os volumes de produção alcancem de 1,5 bilhões de litros/ano, os valores da Carteira de Comércio Exterior do Banco do Brasil (CACEX) demonstram que a exportação não passou de 0,2% do total produzido em 1990 (ETANISLAU et al., 2002) Apesar da sua tradição e importância, a indústria de aguardentes seguiu até a década de 90 na direção do aumento de produção sem se preocupar com a qualidade final do produto. A partir de 1990, vários segmentos ligados à produção da aguardente se manifestaram pela necessidade de medidas que viessem possibilitar o salto de qualidade da bebida. Como resultado, as exportações alcançaram cerca de 14,8 milhões de litros em 2002 (PATARO et al., 2002)

A projeção de exportação de 40 milhões de litros para 2010 representa evolução das possibilidades de se conquistar o mercado externo pela melhoria da sua qualidade. A produção de cachaça de alambique tem merecido destaque na economia do estado de Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo. O Estado de Pernambuco, concentrando principalmente alambiques artesanais, possui um grande potencial para a produção desta bebida, o qual vem sendo considerado um grande produto de exportação e geração de divisas em todo país (PIRES, 2001).

O processo artesanal, no entanto, carece de procedimentos tecnológicos mais refinados que tornem o produto competitivo no mercado, tanto em termos de produtividade quanto em qualidade. E estas duas características estão diretamente relacionadas com a qualidade da população de leveduras envolvidas no processo fermentativo da cachaça. A análise desta população poderá fornecer subsídios para a identificação de linhagens específicas para os diferentes alambiques, as quais deverão unir o maior rendimento com a produção de metabólitos que qualificam o produto, tais como: álcoois superiores, aldeídos e ácidos orgânicos em termos de aroma e sabor (BOZA & HORII , 1998).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DA CACHAÇA

2.1.1. Histórico da cachaça

A tecnologia de produção das bebidas alcoólicas espalhou-se pelo Velho e Novo Mundo. Na Itália, o destilado de uva fica conhecido como *grappa*. Na Alemanha, a partir da cerveja, o *kirsh*. Na Escócia, o *Whisky*, destilado da cevada sacarificada. Na Rússia, a *vodka*, de centeio. Na China e Japão, o *sakê*, de arroz. Em Portugal, destilado do bagaço de uva, a *bagaceira* (LIMA, 2001a). Com o descobrimento do Brasil, Portugal trouxe a cana-de-açúcar, originária da Ásia Meridional entre 1532 e 1548. A história da cachaça confunde-se então com a própria história do Brasil, sendo produzida como uma bebida alcoólica resultante dos tachos de melaço, a *garapa azeda* que passou então mais tarde a ser chamada *cagaça* e finalmente *cachaça* (LIMA, 2001b).

A produção de cachaça no Brasil data do início da colonização. Entretanto, as indústrias de cachaça até 1945 eram rurais e rudimentares, não havendo padrões de qualidade. A produção doméstica aumentou bastante e desde então o processo de produção vem sendo aperfeiçoado e melhorado, o que tem acarretado melhorias no rendimento, produtividade e qualidade do produto final (PATARO et al., 2002).

O mercado de cachaça no Brasil tem passado por recentes transformações, configuradas, principalmente, por uma certa elitização do consumo e por uma busca crescente de qualidade. Atualmente, o mercado brasileiro da cachaça movimenta um volume de aproximadamente 2,0 bilhões de litros, o que coloca a bebida como a segunda mais vendida no Brasil, perdendo apenas para a cerveja. Embora a produção nacional seja consumida quase que totalmente no mercado interno, tem se verificado um crescimento acentuado da sua aceitação no mercado internacional, haja vista que hoje ela representa o terceiro destilado mais consumido no mundo (ETANISLAU et al., 2002).

Assim, o atual estágio de desenvolvimento do mercado da cachaça mostra grande potencial para a exportação, levando-se em consideração a crescente aceitação e a pequena parcela da produção que é destinada ao exterior (ETANISLAU et al., 2002). Apenas cerca de 1% da produção nacional é exportada, totalizando 14,8 milhões de litros em 2002.

Como consequência do aumento da produção, surgiu uma demanda técnica e científica, da cultura da cana-de-açúcar ao engarrafamento da cachaça. Muitos estudos e pesquisas foram feitos na área de fermentação do caldo de cana-de-açúcar e muitos foram os conhecimentos adquiridos quanto à extração do caldo, purificação, fermentação, desinfecção, técnicas de destilação, busca de leveduras apropriadas e selecionadas, e outros parâmetros. Esses estudos contribuíram para o aperfeiçoamento técnico da antiga e rotineira indústria aguardenteira, e seu acervo foi muito importante quando a indústria de álcool etílico no Brasil foi solicitada a incrementar suas atividades com a finalidade de produzir etanol como combustível líquido alternativo (LIMA, 2001a).

Motivadas pela expansão do consumo, têm-se percebido ações voltadas no sentido de tornar a atividade mais eficiente e articulada, uma vez que historicamente ela se caracteriza como bastante pulverizada e com elevado índice de informalidade. Destas iniciativas, temos o Programa Brasileiro de Desenvolvimento de Aguardente de Cana (PBDAC), o Programa Especial de Exportações (PEE), o Programa dos Novos Pólos para Exportação (PNPE) e a Rede Mineira de Tecnologia da Cachaça (RTMC). Embora o objetivo final seja a inserção no mercado através da qualidade do produto final, esforços têm que ser dispensados desde a obtenção da matéria-prima, passando por todas as etapas do processamento, até chegar à comercialização (ETANISLAU et al., 2002).

De acordo com os dados da Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), a cachaça posiciona-se como a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil. Estima-se o consumo de 70 milhões de doses diários, o que representa, em média, aproximadamente 6L por habitante/ano. Dados oficiais apontam uma produção de 1,6 bilhões de litro por ano, sendo 90% de cachaça industrial e 10% de cachaça artesanal (LIMA et al., 2005). É ainda um produto exclusivamente nacional que participa de um dos maiores mercados mundiais de bebidas e é a bebida destilada mais popular no Brasil. Representa uma atividade econômica de 2,5 bilhões de dólares nos Estados Unidos (VICENTE et al., 2005). Este fato fez com que o governo federal decidisse considerar a cachaça bebida genuinamente brasileira, desencadeando, com isso um processo de valorização da bebida com o objetivo de estimular o aumento de produção e a melhoria da qualidade visando à ampliação ao mercado externo.

Atualmente o estado de Pernambuco é considerado grande produtor de cachaça. A Pitú, indústria instalada em Vitória de Santo Antão, é a maior exportadora de cachaça no

Brasil. Estima-se que existam mais de cinquenta produtores informais de cachaça e cerca de 15 a 20 formalizados em Pernambuco (PIRES, 2001).

2.1.2 Definição e caracterização da cachaça

A cachaça de alambique, produto alcoólico típico brasileiro obtido para destilação do caldo de cana fermentado, sob a atuação de leveduras. Segundo informes da ABRABE, a aguardente de cana, caninha ou cachaça é uma bebida tipicamente brasileira, produzida em quase todos os Estados da Federação, atendendo pelos mais diversos nomes - branquinha, cana, imaculada, maria branca, biritá, caninha, zuninga, pinga, entre outros, podendo ser produzida por pequenos, médios e grandes produtores (PIRES, 2001).

A tão brasileira cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) (Rolim 1981) produzida no Brasil, bebida fermento-destillada com graduação alcoólica de trinta e 38% a 48% v/v (volume por volume) à temperatura de 20°C obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose (BRASIL, 2005).

A Tabela I mostra a composição típica da cachaça (coeficiente de congêneres) segundo o novo Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça.

TABELA I. Composição típica da cachaça pela legislação brasileira

Composto	Limite Máximo
Teor alcoólico	38 a 48 % etanol v/v
Ésteres em acetato de etila	200 mg/100mL de álcool anidro
Acidez volátil em ácido acético	150 mg/100mL de álcool anidro
Aldeídos em aldeído acético	30 mg/100mL de álcool anidro
Furfural e Hidroximetilfurfural	5 mg/100mL de álcool anidro
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil -1- butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1- propanol),	360mg/100mL de álcool anidro

Fonte: BRASIL, 2005

Segundo este Regulamento Técnico são fixados limites máximos para contaminantes orgânicos e inorgânicos, mostrados na Tabela II, a seguir.

TABELA II. Limites máximos para contaminantes orgânicos e inorgânicos

Contaminantes Orgânicos	Limite Máximo
Álcool metílico	20,0 mg/100 mL de álcool anidro
Carbamato de etila	150µg/L
Acroleína (2-propenal)	5mg/100mL de álcool anidro
Álcool sec-butilico (2-butanol)	10mg/100mL de álcool anidro
Álcool n-butilico (1-butanol)	3mg/100mL
Contaminantes Inorgânicos	Limite Máximo
Cobre (Cu)	5mg/L
Chumbo (Pb)	200µg/L
Arsênio (As)	100µg/L

Fonte: BRASIL, 2005

2.1.3 Matéria-prima

A matéria-prima básica para a fabricação de cachaça é a cana-de-açúcar. No Brasil normalmente é feita uma seleção entre as variedades existentes para produção de açúcar e álcool, tentando-se obter as que possam ser utilizadas na produção de cachaça de alambique (ANDRADE & CARDOSO, 2004). Na seleção da matéria-prima deve-se levar em conta a diversidade do solo e as condições culturais e industriais da variedade. Para otimizar o processo de produção de cachaça, a cana deve estar perfeitamente madura e apresentar boas condições fitossanitárias. A safra de cana ocorre de maio a dezembro e cada variedade tem seu ponto de maturação em determinada época (TRINDADE, 2006).

2.1.4 Extração do caldo e condições de fermentação

A extração do caldo de cana-de-açúcar é feita por esmagamento direto nas moendas, cuja capacidade vai variar de acordo com a capacidade de processamento da fábrica. O maior ou menor rendimento em cachaça está ligado à eficiência na extração do caldo (LIMA, 2001a).

Tecnologicamente, todo líquido susceptível de fermentar é denominado mosto. Após moagem, o caldo de cana-de-açúcar é filtrado e clarificado por decantação, que retira parte das impurezas em suspensão. O caldo obtido pela moagem da cana-de-açúcar é formado por água entre 78% e 86%, sacarose entre 11% e 18%, pelos compostos orgânicos não açúcares que são

constituídos de substâncias nitrogenadas entre 0,5% e 1,0%, tais como proteínas, aminoácidos, etc., além das gorduras, ceras, pectinas, ácido málico, ácido succínico e de corantes como a clorofila, sacaretina e antocianina. Os compostos inorgânicos deste caldo são representados pelas cinzas entre 0,3% e 0,5%, que têm como componentes principais a sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio, cloro e outros (LIMA, 2001b).

O preparo do mosto envolve operações que permitem melhorar as condições de fermentação do caldo de cana. Inicia-se pela sua filtração e decantação, com ajustes no teor de açúcar, acidez, nutrientes e temperatura. O caldo de cana proveniente da moenda é filtrado em tela fina, passando em seguida por decantador tipo chicana, de modo a eliminar a terra e o bagacilho, partículas de terra e outras impurezas menores. Na filtração, são eliminados os pedaços maiores de bagaço arrastados com o caldo (RIBEIRO, 2002).

A fermentação ideal ocorre com o caldo de cana numa concentração de açúcares em torno de 15° brix. Normalmente, o caldo apresenta uma concentração de açúcares de 14° a 22° brix. Acima de 15° brix, é necessário diluir o caldo de cana, para garantir a estabilidade do fermento ao longo de todo o período de fabricação. Teores de açúcar acima de 15° brix acarretam fermentações mais lentas e freqüentemente incompletas, além de dificultarem a multiplicação do fermento. Quando se destila um mosto com fermentação incompleta, ocorrem incrustações no alambique e formação de furfural, que provocam aroma e gosto indesejáveis na cachaça. Já teores de açúcar abaixo de 15° brix permitem fermentações mais rápidas, sendo importantes na etapa de multiplicação do fermento. Entretanto, acarretam uma diminuição no rendimento industrial (ANDRADE & CARDOSO, 2004).

O pH desejável do caldo a ser fermentado situa-se entre 4,0 e 5,0. O caldo da cana-de-açúcar sadia e madura apresenta um pH que varia de 5,0 a 6,0, o que demonstra a necessidade de aumento de acidez para se obter uma boa fermentação. Essa diminuição do pH na fabricação artesanal é feita naturalmente, como parte integrante do processo (RIBEIRO, 2002). Na produção da cachaça artesanal mineira, essa acidificação é realizada colocando-se fubá no fundo da dorna de fermentação, ou ajustando para maior o volume do chamado pé-de-cuba (ver adiante). Outra prática utilizada para aumentar a acidez é a adição de vinhoto à água usada para diluir o caldo para o ajuste do brix (RIBEIRO, 2002). E a temperatura ideal para fermentação situa-se entre 28° e 32°. Temperaturas mais baixas diminuem a atividade do fermento, enquanto as mais elevadas favorecem o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, provocando o enfraquecimento das leveduras (ANDRADE & CARDOSO, 2004).

2.1.5 Produção de cachaça

A cachaça industrial não é obtida em alambiques, mas em destilarias de coluna, chamadas “destiladores contínuos”, colunas industriais de destilação ou colunas de destilação contínua. São equipamentos peculiares à produção do álcool. Na realidade, o aproveitamento total do volume fermentado para a destilação, entre outras práticas industriais, não consegue dar qualidade sensorial à pinga industrial, que normalmente, não possui aroma e gosto agradável e tem os mesmos efeitos criticados por consumidores que passam da segunda dose. O grande desafio industrial é aprimorar a estrutura organoléptica do seu produto, dar-lhe melhor perfume e sabor, para que fique tão atraente quanto à cachaça artesanal (CAMERA, 2004).

Do ponto de vista biológico, o processo para fabricação de cachaça de alambique constitui-se de duas etapas principais: na primeira é preparado o inóculo, chamado também pé-de-cuba. Nesta etapa, basicamente os microrganismos são multiplicados em condições apropriadas, para garantir o desenvolvimento adequado da segunda etapa, que corresponde à conversão de açúcar em álcool e gás carbônico, fase que é chamada fermentação (PATARO et al., 2002). O processo mais utilizado por produtores de cachaça de alambique é o de batelada simples com reciclagem de inóculo. Este método consiste na incubação de uma dorna com o pé de cuba. Quando a fermentação atinge um estado apropriado (formação de bolhas) passa-se metade do conteúdo para uma dorna vazia, o corte de dorna. Em seguida, completa-se o volume das duas com o caldo a ser fermentado (PATARO et al., 2002).

Um dos métodos mais usados para uma boa produção de cachaça artesanal é a utilização do pé de cuba “fermento selvagem”, pois há propagação exclusivamente a partir das leveduras presentes naturalmente no ambiente do canavial. Para o preparo do pé de cuba selvagem acrescenta-se caldo-de-cana a farelo de arroz, fubá de milho, farinha de rosca e suco de limão ou de laranja até que se forme uma pasta (TRINDADE, 2006).

A Figura 1 mostra o fluxograma da produção da cachaça. A cana-de-açúcar depois de moída e separado o bagaço, é submetida a uma filtração, por passagem em peneiras, ou decantado para separação do bagacilho. O caldo pronto para fermentar é denominado mosto, é colocado para fermentar na presença do fermento ou pé-de-cuba. Após o término da fermentação do mosto o caldo é chamado de vinho, que depois de sedimentado é destilado. Durante a destilação, são separadas frações da cabeça, primeira etapa da destilação que

contém impurezas tais como metanol, coração, que corresponde à cachaça propriamente dita, e cauda, que é última etapa da destilação que contém os álcoois de cadeia pesada ou álcoois de fúsel. Uma vez coletada, a bebida então pode ser envelhecida, ou engarrafada logo a seguir da produção (LIMA, 2001b).

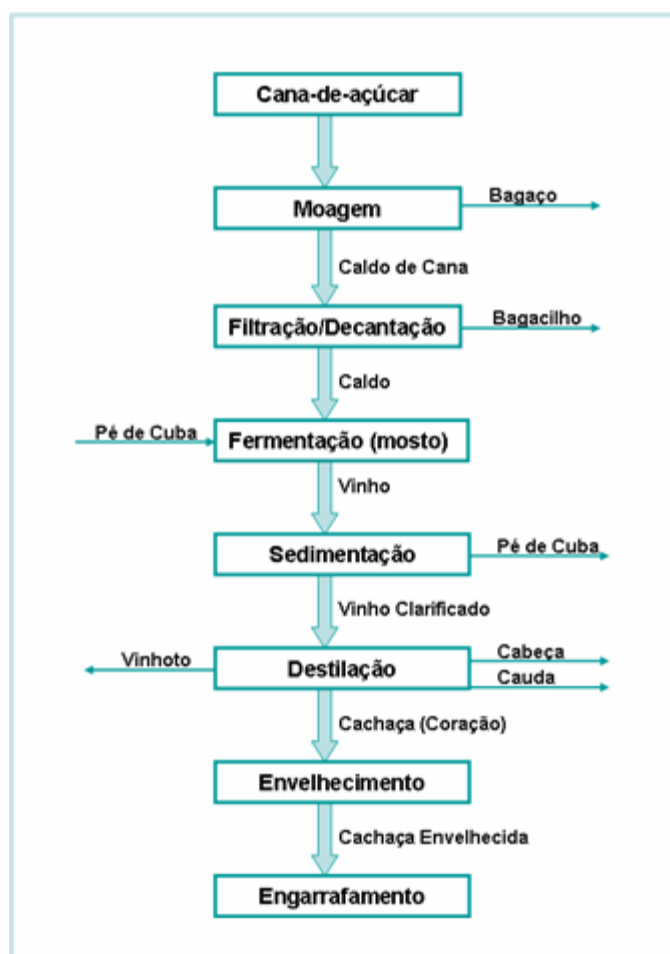


Figura 1. Fluxograma da produção de cachaça.

2.1.6 Fermentação alcoólica

No Brasil, por volta do século XV, a fermentação foi inicialmente utilizada para o preparo de bebidas, cachaça, e a produção de certos alimentos utilizando a planta da mandioca para essa finalidade (LEÃO, 2005).

A fermentação descontínua é também conhecida por fermentação por batelada ou processo descontínuo de fermentação, na qual o mosto e o pé-de-cuba são adicionados ao

mesmo tempo até o volume de trabalho das dornas e a fermentação é permitida até o final sem alteração do volume. O processo definido como fermentação descontínua alimentada é uma técnica aprimorada da batelada no qual um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação, por cerca de 24 horas. A adição de mosto pode ser contínua ou intermitente (CARVALHO, 2001; PATARO et al., 2002).

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas tais como matéria-prima e o método de condução do processo fermentativo. No entanto, leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas. O tipo de alambique e a técnica de destilação também afetam o sabor dos destilados. O cobre age de forma a reduzir o teor de compostos sulfurados voláteis no destilado, e, portanto o desagradável odor típico de sulfeto, o principal componente desta classe de compostos é dimetilsulfeto (OLIVEIRA, 2001).

2.1.7 Compostos secundários na produção da cachaça

Alem dos principais produtos de fermentação alcoólica com caldo de cana, que são álcool etílico e dióxido de carbono, há normalmente a formação de pequenas quantidades de outros componentes os produtos secundários da fermentação alcoólica (MAIA & NELSON, 1994). O ácido acético tem sido quantitativamente o principal componente da fração de ácidos orgânicos das aguardentes (NYKAMEN, 1983). O ácido acético é formado principalmente por bactérias acéticas e lácticas e por leveduras acéticas, por exemplo *Dekkera* sp. Quanto maior a acidez acética das dornas, menor o rendimento da fermentação, e este parâmetro depende da linhagem da levedura utilizada, pureza da fermentação, higiene dos equipamentos, tempo e temperatura de fermentação e tempo de espera para destilar o vinho. Esta acidez das cachaças pode atingir nível muito alto, inviabilizando o produto (PINHEIRO, 1999). Há ainda os ácidos graxos que são produzidos durante o período de aeração das leveduras para formação do mosto fermentativo, sendo esses, altamente indesejáveis, pois aumentam a turvação e promovem aromas desagradáveis na bebida (MAIA & NELSON, 1994). Dentre os compostos carbonílicos, os aldeídos são os mais importantes componentes do aroma, pois, mesmo em baixas concentrações, interferem nas características sensoriais da bebida e podem ter origem pela ação das leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação (PIGOOTT

et al., 1989). O acetaldeído é o maior componente, geralmente constituindo 90% do conteúdo total de aldeídos em vinhos e bebidas destiladas sendo originado do metabolismo de leveduras durante fermentações alcoólicas (LONGO et al., 1992; ROMANO et al., 1998). Diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* produzem altos níveis de acetaldeído, entre 50 a 120 mg/L, o que pode prejudicar o produto. O furfural, um aldeído produzido pela reação química entre compostos aromáticos e a glicose, influencia negativamente o aroma e o paladar da cachaça e deve ser evitado (PINHEIRO, 1999).

Os ésteres são formados em reações de esterificação entre álcoois e ácidos carboxílicos durante o processo de oxidação, apresenta aroma típico, agradável e suave (GALHINE, 1988). Os ésteres de ácidos graxos são os que mais contribuem para o sabor das bebidas em geral (NONATO et al., 2001). O principal éster da cachaça é o acetato de etila, responsável pela formação de aroma frutal, que é desejável. O acetato de iso-amila e o butirato de amila têm aroma de banana e, em quantidades excessivas, torna a bebida enjoativa (PINHEIRO, 1999).

O glicerol é um composto produzido em decorrência do crescimento celular e tem importância na composição do “bouquet” e textura das bebidas destiladas, devido a sua viscosidade (WALKER, 1998).

Os álcoois superiores são provenientes das transformações dos aminoácidos durante o processo fermentativo, e como destaque temos o álcool amílico e o álcool propílico com até cinco carbonos, responsáveis pelo odor da bebida (GALHANE, 1988). A formação dos álcoois superiores ocorre através da descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos, seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica (WEBB; INGRAHAM, 1963). Os principais álcoois superiores são n-propílico, isopropílico, n-butílico, isobutílico, amílico e isoamílico e álcoois aromáticos, dos quais o fenetil-álcool é o mais importante (WALKER, 1998).

O metanol é um produto da decomposição de pectinas, através da hidrólise enzimática microbiana, e ocorre principalmente quando não há uma boa clarificação e o caldo de cana apresenta grandes quantidades de bagacilho. Cachaças que apresentem o somatório desses componentes acima de 30,0 mg/100 mL de álcool anidro, são consideradas impróprias para o consumo (PINHEIRO, 1999). Além do metanol, o cobre é um componente indesejável da cachaça, pois elimina os odores desejáveis do produto (MAIA & NELSON., 1994).

Existe diferença quanto aos produtos do metabolismo celular da levedura *S. cerevisiae* em condições de respiração e de fermentação. Em condições de respiração, quando a formação

de biomassa é predominante, a levedura ainda produz etanol quando está em condições favoráveis para produção de biomassa. Ao se duplicar, a célula da levedura retira energia das ligações químicas do açúcar.). Assim, a glicose de seis carbonos é hidrolisada, inicialmente, em duas moléculas de 3 carbonos, como, alcoóis aldeídicos e cetônicos que são convertidos a duas moléculas de ácido pirúvico. Esta sequência de transformações químicas constitui a via metabólica chamada glicólise. O ácido pirúvico é completamente oxidado nas mitocôndrias pelo Ciclo de Krebs, liberando CO_2 e NADH, e este último é oxidado pela cadeia respiratória até ATP e água. Esta energia de oxidação é utilizada para converter intermediários da degradação metabólica em materiais para construção de novas células (ALTERTHUM, 2001).

A diferença básica nos produtos do metabolismo celular da levedura *S. cerevisiae* quando esta se encontra fermentando, em relação ao metabolismo aeróbico consiste no seguinte: o ácido pirúvico formado é convertido no citosol a etanol, glicerol, CO_2 e ácido succínico como principais produtos (ALTERTHUM, 2001).

2.2 PROPAGAÇÃO DO FERMENTO

2.2.1 Leveduras que participam na produção de cachaça

As leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, heterótrofos, caracteristicamente esféricos, ovais ou cilíndricos, com fase somática ou vegetativa, reproduzem-se assexuada mitoticamente por processo denominado brotamento multilateral ou fissão e sexualmente por produção de esporos e conjugação, envolvendo mitose e meiose. Na classificação taxonômica, as leveduras podem ser divididas em dois filos Ascomycota e Basidiomycota. (ALEXOPOULOS et al., 1996). A capacidade das leveduras de sintetizar produtos industriais como lipídios, proteínas e substâncias como etanol, é conhecida desde o século dezenove, mas o interesse por esses microrganismos vem crescendo nos últimos vinte e cinco anos. As leveduras mais estudadas são as que pertencem aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*. A primeira pela sua importância médica e as duas últimas são muito utilizadas como modelos eucariotos em trabalhos científicos (LIMA, 2001a). As leveduras são consideradas como importantes modelos para a genética, elas têm contribuído com enorme soma de conhecimentos para um melhor entendimento dos processos genéticos. Sua distribuição é ampla, como eucarióticas, além de crescerem e reproduzirem-se rapidamente em

meio simples gerando uma alta densidade celular, se requer pouco tempo para um número determinado de gerações, assim elas podem ser usadas, com eficiência, na resolução de muitos problemas. Devido à facilidade de manipulação e por apresentar altos níveis de produção de proteínas secretoras, estudos genéticos neste grupo têm sido intensamente realizados (ANCHORENA MATIENZO, 2002).

As leveduras são constituídas de proteínas, carboidratos, matéria graxa, sais minerais e contem vitaminas cujas proporções variam com a cepa e com o meio ambiente. Os carboidratos representam de 15 a 60% da matéria seca e incluem 33% de trealose, 27% glucanas, 21% de mananas e 12% de glicogênio. As glucanas e mananas são polissacarídeos não redutores, formados de glicose e manose, que são encontrados na membrana celular. Apresentam baixos teores de vitamina A, mais são ricas de vitamina do complexo B e de provitaminas D, transformável em vitamina D por irradiação ultravioleta (AQUARONE et al., 2005).

A industrialização de leveduras secas para fins alimentares exige a produção de concentrados com teor de proteínas bruto capaz de competir economicamente com 47% dos farelos de soja (*Glycine max*), e com os 39 a 44% das tortas de farelo de algodão (*Gossypium hirsutum*) (LIMA et al., 2005).

Em condições de restrição de oxigênio, as leveduras absorvem a sacarose na forma de seus monossacarídeos estruturais, glicose e frutose, a partir da oxidação parcial dessas moléculas ao piruvato. Esse piruvato é descarboxilado para a formação de acetilaldeído e CO₂, reação catalisada pela enzima piruvato-decarboxilase. A redução do acetilaldeído a etanol ocorre através da enzima álcool-desidrogenase com a re-oxidação do NADH produzido durante a glicólise a NAD⁺ (LEÃO, 2005).

As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas geralmente são linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Nas fermentações espontâneas, um grande número de espécies pode estar envolvido, com predominância de *S. cerevisiae* (PATARO, 2000).

Existem os fermentos "caipiras", os selecionados e os prensados. O fermento natural ou pé-de-cuba é usualmente preparado pelo método conhecido como fermento caipira, que consiste numa mistura de caldo de cana-de-açúcar não diluído, farelo de arroz (*Oryza Sativa*), farinha de milho (*Zhea mays*) ou soja, entre outros cereais, com adição de suco de limão (*Citrus Limon*) ou laranja (*Citrus sinensis*) azeda para abaixar o pH. São feitas adições diárias de caldo de cana-de-açúcar no período de cinco a sete dias (RIBEIRO, 2002), quando as

leveduras naturalmente presentes nos substratos estão se reproduzindo e o volume de massa celular está aumentado. Desta forma, o inóculo é obtido a partir da fermentação espontânea do caldo por microrganismos selvagens presentes no caldo da cana-de-açúcar, nos equipamentos e nas dornas de fermentação. O fermento prensado é um produto comercial contendo células da levedura *S. cerevisiae* a mais específica para a fermentação da garapa, como por exemplo, Fermento Fleischmann, Itaquara, Mauri, etc.

A utilização de leveduras selecionadas tem sido pesquisada, visando um aumento da produtividade, vantagens tecnológicas e melhoria das características sensoriais da cachaça (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001). Segundo MORAIS et al. (1997) foi observado que durante a multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para produção de aguardente de cana artesanal, a qual varia de 12 a 48 horas, há uma sucessão de espécies de leveduras, sendo a espécie predominante *S. cerevisiae*. *Candida sake*, *Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilarum* e leveduras apiculadas também são frequentes.

Nas grandes destilarias brasileiras de álcool e mesmo em pequenas fábricas, já é comum o uso de fermentos selecionados no início da safra, mas ainda há um grande número de fábricas que trabalha com leveduras de panificação, prensadas, e com fermentos naturais. Ao longo dos ciclos de fermentação, que dura normalmente entre 20 a 24 horas, o caldo de cana-de-açúcar vai sendo lentamente “contaminado” pelas leveduras indígenas, que se sobrepõem e dominam o processo fermentativo. Isso ocorre em qualquer região do país, com predominância de microrganismos adaptados às condições locais (LIMA, 2001). Observa-se que de uma forma geral, *S. cerevisiae* prevalece nas fermentações, sejam espontâneas ou conduzidas (SCHWAN et al., 2001).

Pataro et al. (2000) mostraram uma sucessão de população de leveduras em diferentes períodos de fermentação da cachaça, em três alambiques no estado de Minas Gerais. *Saccharomyces servazzi*, *Pichia anamala*, *S. uniporus* e *Torulaspora delbrueckii* foram exclusivamente isoladas de fermentações iniciais, *Candida glabrata*, *C. colliculosa* e *C. krusei* foram isoladas nas fermentações medianas; a maioria das linhagens de *S. pombe*, *S. cerevisiae* foram espécies predominantes em todo período da fermentação.

Segundo Oliveira (2001), a fermentação artesanal da cachaça de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *S. cerevisiae*, leveduras apiculadas (*Kloeckera japonica*) e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Picchia* são também frequentemente isoladas. As leveduras presentes nessas

fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também devido às condições de processo.

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (Figura 2) é uma levedura heterotática que em seu ciclo de vida apresentam as fases haplóide e diplóide estáveis, pertence ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae e gênero *Saccharomyces*. Apresenta reprodução assexuada por brotamento multilateral podendo reproduzir sexuadamente formando quatro ascospores em ascos livres, os quais têm origem tanto de um zigoto quanto de uma célula somática partenogênica. Dois ascospores em cada asco possuem o sinal de acasalamento **a**, enquanto os outros dois possuem o sinal de acasalamento α . Após a fusão, o zigoto inicia o brotamento seguido da formação dos ascospores (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).



Figura 2. *Saccharomyces cerevisiae*. A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Micrografia eletrônica de varredura do estágio de reprodução assexuada por brotamento; C) Estrutura celular.

Fonte: University of Kent Biosciences.

O uso de *S. cerevisiae* na biotecnologia tem grande importância e interesse econômico no Brasil. Encontra-se no centro da Biotecnologia tradicional, pelo seu papel milenar nos processos fermentativos para produção de pães, bebidas e álcool combustível, devido à sua capacidade de produzir álcool e dióxido de carbono que permite a expansão da massa do pão a partir de açúcares. (LIMA 2001a)

2.2.3 *Candida milleri*

Candida milleri (Figura 3) foi encontrada a primeira vez na África do Sul, foi isolada

de água, cerveja e pão. Classificada como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae e gênero *Candida* (BARNETT et al, 2002)

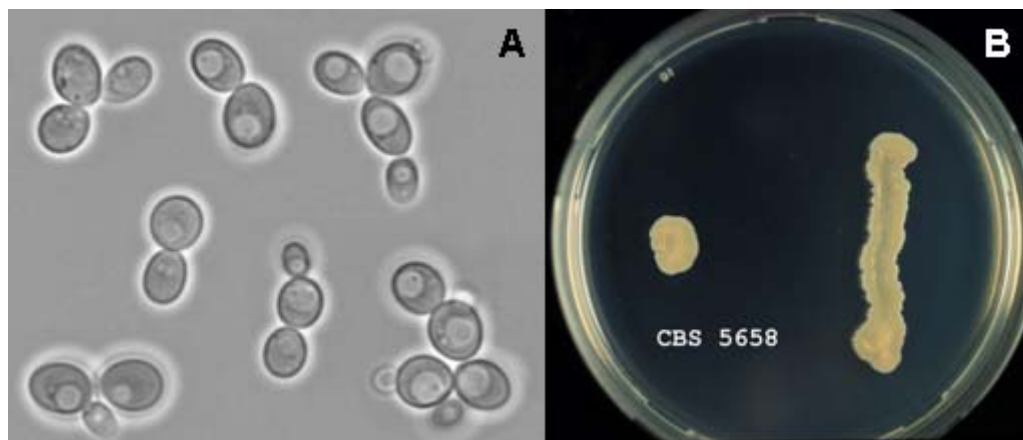


Figura 3. *Candida milleri*. A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.

Fonte: <http://www.cbc.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx>

2.2.4 *Pichia guilliermondii*

Pichia guilliermondii (Figura 4) foi isolada de água, pele humana, cerveja, soro de leite, água do mar, árvores, solo, sendo encontrada pela primeira vez na Itália e na África do Sul. Classificada como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae e gênero *Pichia* (BARNETT et al, 2002)

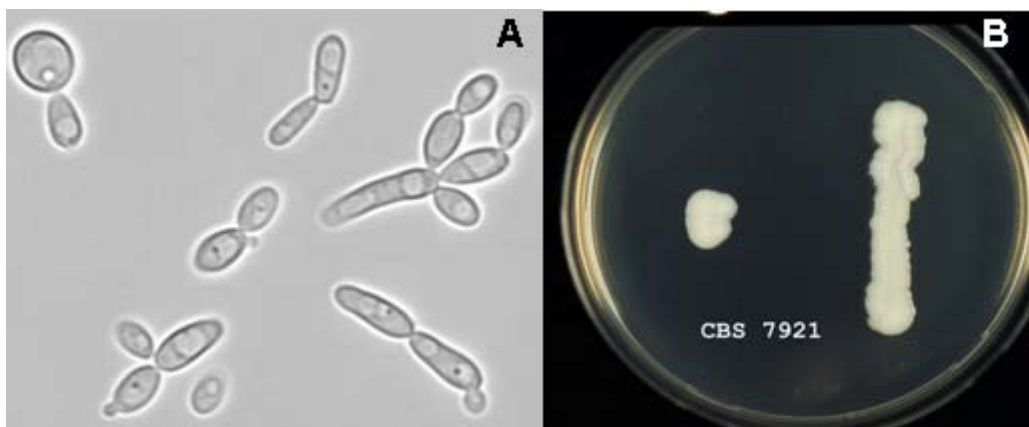


Figura 4. *Pichia guilliermondii*. A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.

Fonte: <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Files/177/7921-col+.JPG>

2.2.5 *Pichia caribbica*

Pichia caribbica (Figura 5) foi isolada de água e classificada como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae e gênero *Pichia* (BARNETT et al, 2002). Esta levedura representa a teleomorfa (forma com reprodução sexuada) do anamorfo (forma sem reprodução sexuada) de *Candida fermentati*.

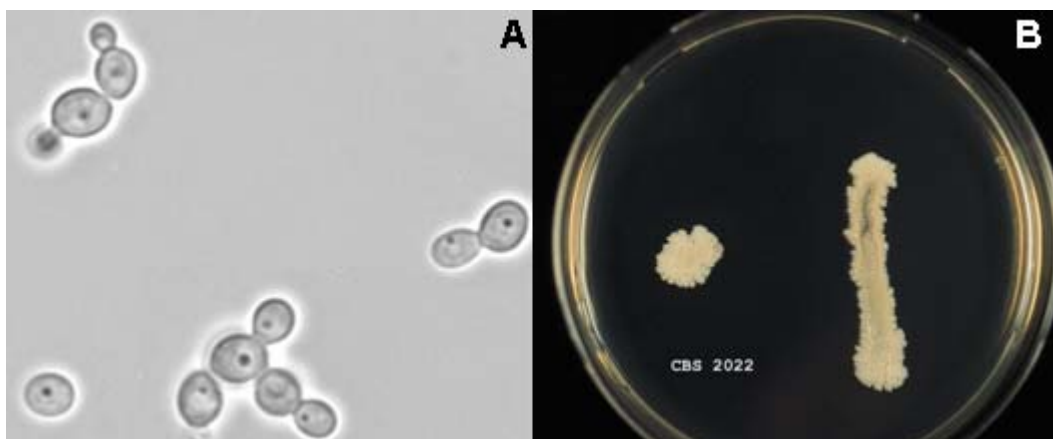


Figura 5. *Pichia caribbica*. A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.

Fonte: <http://www.cbc.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx>

2.2.6 *Candida ubatubensis*

Candida ubatubensis foi classificada como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae e gênero *Candida* (BARNETT et al, 2002) e foi recentemente descoberta.

2.2.7 *Zygosaccharomyces fermentati*

Zygosaccharomyces fermentati (Figura 6) foi encontrada na Espanha, isolada de árvores e frutos de laranja (*Citrus sinensis*) e classificada como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae e gênero *Zygosaccharomyces* (BARNETT et al, 2002).

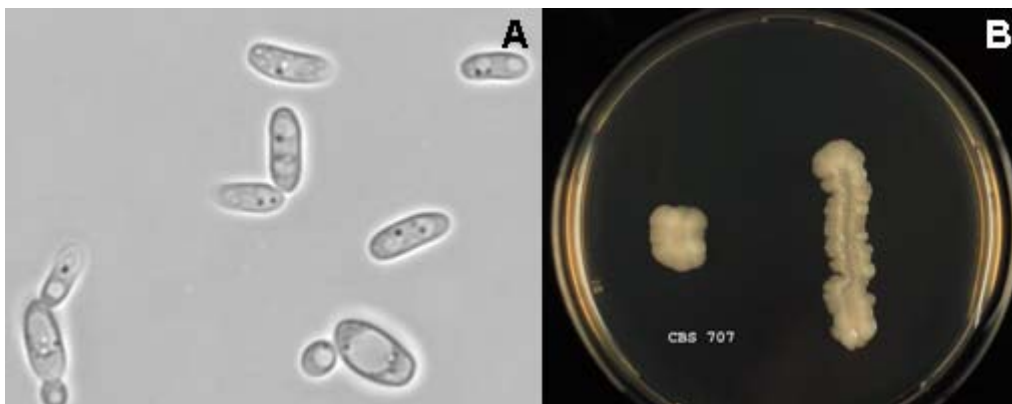


Figura 6. *Zygosaccharomyces fermentati*. A) Aspectos microscópicos da cultura; B) Aspectos macroscópicos da cultura.

Fonte: <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Files/177/707-col+.jpg>

2.2.8 *Dekkera bruxellensis*

Espécies do gênero *Dekkera* apresentam, ao microscópio, células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais. A reprodução vegetativa se dá por brotamento e exhibe pseudomicélio. Como características gerais, podem ainda ser listadas seu lento crescimento, curta duração de vida em placas, aroma característico, forte produção de ácido acético a partir de glicose, estímulo da fermentação pelo oxigênio molecular e exigência de fonte externa de vitaminas. A espécie *D. bruxellensis* representa a espécie típica deste gênero. (Walt, 1984). São associadas com o vinho têm sido, quase que exclusivamente, isoladas de vinhos prontos ou em fermentação (Walt & Kerken, 1961, SOUSA LIBERAL, et al., 2002).

2.2.9 Fatores que influenciam diretamente na propagação do fermento

2.2.9.1 Aeração e agitação

Para preparação de culturas “starter” (ou inóculo) e no controle da fermentação alcoólica, é importante considerar a função do oxigênio no controle do metabolismo e crescimento da levedura. Quando o oxigênio está disponível, o metabolismo da levedura direciona para a respiração, rendendo teoricamente 38 moles de ATP para cada mol de glicose, desta forma, permitindo uma maior velocidade de crescimento, maior produção de biomassa, e a síntese de materiais de reserva, como esteróis e ácidos graxos. Desta forma, a aeração é usada na preparação de culturas “starter” quando uma quantidade maior de biomassa é requerida (HENICK-KLING, 1988).

Segundo Schmidell (2001), um cultivo que seja altamente eficiente, ocorre com elevadas velocidades de crescimento celular, significa altas velocidades de consumo da fonte de carbono, a fim de que haja abundância de elétrons transportados na cadeia respiratória (geração de ATP). Mas significa também, obrigatoriamente, a necessidade da existência de oxigênio dissolvido, a fim de que estes elétrons sejam drenados ao final desta cadeia. A concentração de oxigênio dissolvido na saturação é apenas da ordem de 7mg O₂/L (ou 7 ppm), ao se borbulhar ar atmosférico a pressão de 1 atm e a 35 °C. Por esta razão é que se costuma afirmar que a extensão de um processo descontínuo aeróbio e, por conseguinte, a obtenção de elevadas concentrações do produto desejado, depende enormemente da capacidade de se transferir o oxigênio para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular pode ser elevada. Em outras palavras, podem-se ter situações em que a capacidade de transferência de oxigênio é que ditará as condições de operação. Formas menos eficientes, em termos de transferência de oxigênio, podem ser interessantes sob outros aspectos, como, por exemplo, a de submeterem as células a um menor cisalhamento. Deve-se lembrar também que sempre se adicionam soluções de nutrientes, o que significa a presença de muitas substâncias dissolvidas, as quais, no cômputo final, reduzem a concentração de oxigênio em relação ao valor observado para a água (SCHMIDELL, 2001).

2.2.9.2 Temperatura

Pataro et al. (2000) estudaram as características da fisiologia de crescimento de 210 isolados de leveduras obtidos de um alambique de cachaça de alambique do estado de Minas Gerais. A maioria das linhagens foi fisiologicamente adaptada às condições ambientais observadas nas dornas de fermentação. Elas foram capazes de crescer a 35°C, em meio contendo até 25% de glicose e em concentração de 5 % (v/v) de etanol. A temperatura ótima para a fermentação é de 5 a 10°C acima do ótimo para o crescimento da levedura, que se encontra na faixa de 25 a 30°C (JONES et al. 1981). Stupiello e Horii (1981) afirmam que a reprodução de células pode ocorrer até a temperatura da ordem de 38 °C, havendo inibição da multiplicação a 40 °C e na presença de 8 a 9 % v/v de etanol.

2.2.9.3 Requerimentos para o crescimento e composição química do mosto

É importante observar que as condições de cultivo que proporcionem o máximo de crescimento celular podem não ser necessariamente aquelas que proporcionem o máximo de rendimento de algum produto do metabolismo. Sabe-se que metabolicamente as leveduras são predominantemente anaeróbias facultativas, sendo capazes de crescer tanto na ausência de ar (fermentação) como na sua presença (respiração ou metabolismo oxidativo) (AIBA et al., 1973). A célula de levedura possui compartimentações para adequação da atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria (LIMA, 2001a). Observa-se que, quando os microrganismos são capazes de crescer em ambas as situações (aerobiose/anaerobiose), um substrato que é metabolizado aerobiamente ocasiona um crescimento celular muito maior quando comparado ao substrato metabolizado anaerobiamente (STUPIELLO & HORII, 1981). Na verdade, poucas espécies são capazes de crescer mais rapidamente sob estas condições, e *S. cerevisiae* se sobressai como uma levedura anaeróbica facultativa. É comumente aceito que anaeróbios facultativos têm a habilidade de crescer sob ambas as condições de aerobiose ou anaerobiose usando, respectivamente, oxigênio molecular ou outro composto comoceptor final de elétrons ou redutores equivalentes vindos do processo anabólico (PEREIRA et al, 2003).

Segundo Reed e Nagodawithana (1991), muitos autores têm demonstrado a relação entre a composição da biomassa das leveduras e a quantidade dos vários nutrientes requeridos para alcançar esta composição. A composição de leveduras *S. cerevisiae* de fermento prensado para panificação é mostrada na Tabela III, a seguir. Pulzatto (2000) comenta que a composição química da levedura é amplamente afetada pelas condições químicas e físicas do meio de crescimento, mas podem ser resumidas como tendo alto teor de proteína, alto conteúdo de ácidos nucleicos, baixo conteúdo de lipídeos, alto para cinzas, conteúdo moderado de carboidratos e alto para vitaminas.

2.2.9.3.1 Fonte de Carbono

A concentração de glicose no meio tem provado ter uma importante função regulativa no metabolismo. A concentração de açúcar no caldo de cana-de-açúcar deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira está relacionada com a propagação de *S. cerevisiae* que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja superior a 2-3% (p/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é indispensável para um crescimento eficiente. A segunda etapa está relacionada com a fermentação propriamente dita, ou seja, a conversão de açúcar em etanol e CO₂. Nesta etapa, o teor médio de açúcar tolerado pela levedura é em torno de 15% (p/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo (MAIA et al., 1992; SCHWAN et al 2001).

TABELA III. Composição de leveduras de fermento prensado

Componente	% em base seca
Proteína	47
Carboidratos	33
Minerais	8
Ácidos Nucléicos	8
Lipídeos	4

Fonte: Reed e Nagodawithana (1991)

Maia & Nelson (1994) comenta que em cultura aeróbia, o próprio substrato é reconhecido com agente regulador do metabolismo da glicose. O efeito Crabtree é descrito como o efeito repressor da atividade respiratória pela glicose livre. Assim, *S. cerevisiae* seria “sensível” à glicose, pois em concentrações de 100 a 200 mg/L já é iniciada a fermentação. Segundo Peppler e Reed (1987) esta repressão ocorre na concentração de 0,2 % p/v, e esta é a razão para se conduzir fermentações em batelada alimentada. O açúcar deve ser alimentado continuamente a uma taxa lenta para que possa ser consumido continuamente e não ultrapasse a concentração crítica. Devido à formação de etanol diminuir o rendimento em biomassa, é necessário controlar a taxa de alimentação de açúcar no propagador para minimizar a produção de etanol. Desta forma, a concentração de açúcar é o parâmetro principal para efetiva produção de massa celular de levedura (KASPERSKI, MISKIEWICZ, 2002).

2.2.9.3.2 Fonte de Nitrogênio

As leveduras geralmente podem sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias para seu crescimento celular a partir do íon amônio (HENICK-KLING, 1988). No entanto, Maia & Nelson (1994) comenta que a utilização de sulfato de amônio como fonte nitrogenada resulta em maior acidez do meio, que embora possa favorecer o controle da contaminação bacteriana (e conseqüente redução da formação de ácidos láctico e acético), causa estresse à levedura, diminuindo a viabilidade e multiplicação.

Pode-se usar suplementação com amônio ou sais de amônio, mas segundo Aiba et al. (1973), o crescimento é mais rápido quando se usa nitrogênio orgânico. A produção específica de células de levedura ($Y_{x/s}$) normalmente aumenta linearmente com o aumento do nitrogênio protéico no meio de fermentação sintético (PULZA, 2000). Portanto, a reprodução de *S. cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, e dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta mais significativa. A levedura não assimila instantaneamente o nitrogênio quando adicionado na forma de uréia (46% de N) ou sulfato de amônio (21% de N) (PIGGOTT et al., 1999).

Visando verificar a influência da adição de nitrogênio protéico na fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça, Jerônimo (2004) testou o uso de três diferentes fontes de nitrogênio protéico, dentre elas, um isolado protéico de soja (denominado comercialmente de SUPRO 780 – anteriormente denominado Samprosoy 90 LH produzido pela Bunge Alimentos), obtendo uma boa multiplicação e viabilidade da levedura, propiciando assim, melhor qualidade no fermento reciclado. Neste experimento, a viabilidade manteve-se elevada até o final do experimento (6 ciclos), e a massa celular produzida também. Segundo este autor, o nitrogênio protéico original do caldo de cana-de-açúcar foi praticamente todo consumido, o que significa estar em forma assimilável pela levedura. Do ponto de vista nutricional da levedura, os resultados deste trabalho mostram que o N protéico presente no caldo é insuficiente para suprir a nutrição da levedura em fermentação.

2.2.9.3.3 Adição de farinha de milho e de soja ao mosto

Maia (1991) propôs que a adição de farinha de milho ao mosto resulta em alguns benefícios ao processo fermentativo, como a adsorção pelo amido de metabólitos secundários

da própria fermentação alcoólica, cuja presença no mosto afeta a via glicolítica. Porém Cleto (1997) testou a suplementação do mosto com fubá de milho, não obtendo alterações significativas na viabilidade celular. O autor observou um menor teor de acidez no mosto suplementado com fubá, resultando também numa cachaça com menor acidez total.

2.2.9.3.4. Fonte de Minerais

As leveduras exigem diversos íons inorgânicos (minerais) em concentrações tanto micro como milimolar para manifestarem ótimos crescimentos e rendimento fermentativo. Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais, ou seja, um desequilíbrio entre os nutrientes minerais provoca alterações metabólicas significativas (BASSO et al., 1996).

Microelementos têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). Aparentemente, íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase. Todavia, quantidades excessivas destes mesmos íons são tóxicas e podem causar danos às funções às quais se prestam (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). A composição elementar de uma célula microbiana depende de muitos fatores, como condições de cultivo, espécie do microorganismo, e até mesmo do substrato utilizado para seu crescimento (CARVALHO; SATO, 2001). Zinco, cobre e manganês são muito interessantes devido ao efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento de *S. cerevisiae* (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). Fósforo, potássio enxofre e magnésio são os minerais mais encontrados na composição de microrganismos, e estes e outros elementos presentes em quantidades significativas devem ser suplementados ao meio de cultura. A seguir, são mostrados na Tabela IV os constituintes inorgânicos de leveduras.

O zinco na sua forma biologicamente mais relevante (íons Zn^{2+}) é essencial como cofator catalítico em várias enzimas, inclusive álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, anidrase carbônica e várias carboxipeptidases, não sendo substituído por nenhum outro íon em suas funções (STEHLIK-TOMAS ET AL., 2004). Tem sido apontado que a presença de íons Zn^{2+} em quantidades de 5-15 μM no meio nutriente otimizam o fator de crescimento de células de levedura, assim como a produção de etanol. De forma oposta, sua deficiência paralisa o

crescimento celular e atividade fermentativa. Todavia, altas concentrações de zinco no meio de crescimento podem ser tóxicas, uma vez que o zinco afeta a permeabilidade das membranas ao potássio, causando um efeito antagonista no crescimento e fermentação (JONES et al 1981, STEHLIK-TOMAS et al., 2004). O cobre também é um cátion divalente vital para células de leveduras, agindo como cofator de algumas enzimas como citocromo c-oxidase, lactase e Cu-Zn superóxido dismutase (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). A concentração ótima no meio nutritivo para crescimento da levedura e atividade fermentativa está na faixa de 1-10 μM . O manganês como um elemento traço essencial a uma concentração de 2-10 μM para otimizar o crescimento. O manganês tem uma função importante no metabolismo de *S. cerevisiae* como parte de algumas enzimas, por exemplo, piruvato descarboxilase. Stehlik-Tomas et al. (2004) conduziram um experimento visando estudar a incorporação de alguns microelementos a células de *S. cerevisiae* e o impacto no estado fisiológico das células. A adição de 0,1 g/L de cada um dos sais ZnSO_4 , CuSO_4 e MnSO_4 aumentou o rendimento em biomassa celular em 30% em condições semiaeróbias. Em condições de anaerobiose, o rendimento de biomassa aumentou 10%, e a produção de álcool aumentou 20%. O ferro é um importante elemento da nutrição das leveduras e concentrações tão baixas quanto 0,01 g/100 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ em meio de cultivo aeróbio ou em cultivos em batelada alimentada de *S. cerevisiae* proporcionaram aumento do rendimento de produção da biomassa (BACH ET AL., 1978; ALBA, 1976); OURA (1974).

TABELA IV. Constituintes inorgânicos das leveduras

Elementos (g/100g peso seco)	AIBA et al. (1973)	REED; NAGODAWITHANA (1991)
Fósforo	0,8 – 2,6	1,35
Enxofre	0,01 – 0,24	0,39
Potássio	1,0 – 4,0	2,1
Magnésio	0,1 – 0,5	0,165
Sódio	0,01 – 0,1	0,012
Cálcio	0,1 – 0,3	0,075
Ferro	0,01 – 0,5	0,002
Zinco		0,017
Cobre	0,002 – 0,01	0,0008
Manganês	0,0005 – 0,007	0,000002
Molibdênio	0,0001 – 0,0002	0,00004
Total de Minerais	5 - 10	

Fonte LIMA, U.A, 2001b

2.3 FERRAMENTAS MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE LEVEDURAS

Constantemente, aumentam-se o uso de técnicas moleculares para caracterização, identificação e classificação de organismos e a disponibilidade dos métodos genéticos para investigação dos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) vem crescendo acentuadamente.

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) é uma ferramenta importante na identificação e discriminação de organismos, envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação baseia-se na desnaturação de fita dupla face de DNA, por alta temperatura, seguida de anelamento de um par de iniciadores de seqüências conhecida, com posterior extensão de uma nova molécula pela ação da polimerase (CARVALHO & TORRES, 2002).

A tecnologia de PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicado no estudo de DNA inteiro ou fragmentado, tais como: ISSR e rDNA.

Seqüências curtas de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em blocos (microsatélites) encontrados dispersos no genoma dos organismos vêm sendo bastante utilizadas na caracterização genética desses organismos e, por serem instáveis devido ao alto acúmulo de mutações, estes marcadores altamente polimórficos se tornam extremamente úteis a estudos genéticos (CARVALHO & TORRES, 2002). A utilização deste tipo de seqüência como marcador molecular ocorre através da própria seqüência do microsatélites como iniciador da amplificação de DNA, neste caso, as seqüências de nucleotídeos localizadas entre as microsatélites são amplificadas, método chamado de amplificação de seqüências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats - ISSR), apresentando padrões intraespecíficos distintos (SILVA FILHO, 2003).

A combinação do produto de PCR com análises de RFLP (Polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição) permite diferenciar organismos e até linhagens através da clivagem do DNA analisando variações no comprimento dos sítios de restrição (HILL, 2005).

As seqüências do DNA que codificam RNA ribossômico apresentam regiões altamente conservadas e outras variáveis permitindo análise de diferentes níveis taxonômicos. Essas seqüências apresentam-se como um agrupamento gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Esses genes são separados por regiões denominadas seqüências internas transcritas, ITS1 e ITS2 (Figura 7) e são processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. A região 18S é mais conservada sendo utilizada para comparação de organismos distantemente relacionados. A região 28S é mais variável apropriada para comparação de gênero e espécies. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, relativamente curtos (500 a 800 pb), e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e utilizadas na identificação de fungos. A amplificação desta região, digestão com enzimas de restrição e separação eletroforética dos fragmentos é rápida, simples, relativamente barata e facilmente adaptável para novos grupos de fungos (FUNGARO, 2000).

Os domínios D1-D2 da região do gene 26S (Figura 7) dos organismos eucariotos mostra um alto grau de variações específicas e tem sido utilizado na taxonomia e identificação das leveduras. O seqüenciamento desses domínios se mostra um método seguro e eficaz na determinação de espécies, devido à análise serem feita diretamente do genoma do microrganismo. (STENDER et al, 2000).

Segundo Silva Filho, (2003) o iniciador (GTG)₅ mostrou uma alta capacidade de discriminação entre gêneros de leveduras que podem estar associados a episódios de contaminação do processo de produção de álcool combustível. Adicionalmente, há indicações que este marcador poderá ser uma ferramenta útil no estabelecimento do nível de relacionamento genético entre espécies muito próximas da *S. cerevisiae*.

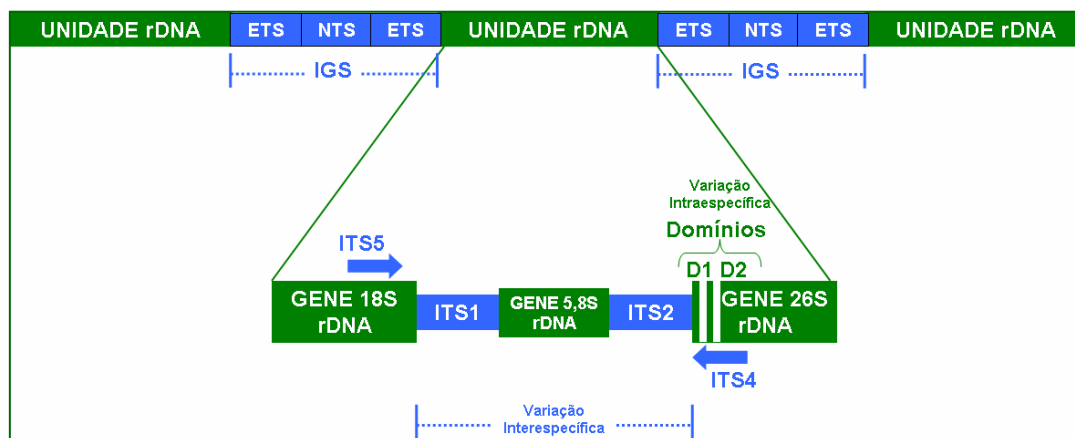


Figura 7. Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação da região espaçadora transcrita interna (ITS), dos sítios de reconhecimento dos iniciadores universais ITS4 e ITS5 e dos domínios D1-D2 da região do gene 26S. Além dos genes, estão indicados: espaçador transcrito externo (ETS) e espaçador não transcrito (NTS).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Basicamente, a produção de cachaça consiste em se extrair o caldo da cana-de-açúcar na operação de moagem, convertê-lo em vinho pelo processo de fermentação e transformar o vinho de cana-de-açúcar em cachaça através da destilação. Tradicionalmente, a propagação do fermento nas fábricas de cachaça de alambique é feita diretamente dentro das dornas de fermentação. Esta prática, no entanto, está associada a um elevado grau de contaminação por bactérias e leveduras, devido à precariedade operacional. Pois a maior parte da produção ainda concentra-se em alambiques artesanais que continuam a utilizar técnicas tradicionais, principalmente na produção do fermento, chamado pé-de-cuba. Desta forma, não existe controle microbiológico que assegure a constância na qualidade do produto, a qual está relacionada ao conjunto de substâncias produzidas pela microbiota presente durante a fermentação acarretando, muitas vezes, em sérios problemas operacionais, perda da produtividade e qualidade do produto.

Estudos de dinâmica populacional de leveduras produtoras de cachaça artesanal utilizando as técnicas de tipagem genética apresentam bons resultados na identificação dos microrganismos e abrem caminho para a utilização de linhagens selecionadas, o que pode representar um salto de qualidade para a cachaça de alambique. Com esse efeito, a proposta deste trabalho aponta excelentes perspectivas para se implementar a qualidade sensorial do destilado e uma rotina de controle do processo fermentativo, o qual certamente repercutiria na uniformidade da qualidade do produto beneficiando o setor de produção de aguardente artesanal na zona da mata de Pernambuco.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar leveduras isoladas da cachaça no estado de Pernambuco através de análises fisiológicas e determinar a variabilidade genética da população de leveduras através de marcadores moleculares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar leveduras de diferentes unidades produtoras de cachaça da Zona da Mata do Estado de Pernambuco;
- Selecionar as principais leveduras envolvidas no processo através de marcadores de PCR;
- Determinar a capacidade fermentativa das principais leveduras envolvidas no processo; avaliar a produção de metabólitos secundários, tais como: álcoois, aldeídos das principais leveduras envolvidas no processo.

4. REFERÊNCIAS

- AIBA, C.J., BRAZ FILHO R, GOTTLIEB **Porosin: a neolignan from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* 12: 413-416. 1973**
- ALENCAR, E.M.B. **Leveduras isoladas de mosto de cana-de-açúcar usado para produção de álcool carburante**. 2001. 84f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2001
- ALTERTHUM, F. **Elementos em Microbiologia**. In: Almeida Lima, 2001 U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. *Biotecnologia Industrial (Fundamentos v.1)*, pp. 01-32. Edgar Blücher, Brasil, 2001
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory mycology**. 4.ed. New York : John Wiley & Sons, Cap.23, p.683-737. 1996
- ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1994. 251p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ANCHORENA- MATIENZO, P **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Piracicaba setembro 2002, 81f, escola superior de agricultura “luiz de queiroz” universidade de São Paulo Mestre Em Ciências – Área Ciências e tecnologia de alimentos, 2002.
- ANDRADE, L. A B.; CARDOSO, M.B.; Cultura de cana de açúcar , larvas : UFLA/FAPRIL (curso de especialização)2004
- ANTONI, S.R.C & PARAZZI, C. **Monitoramento microbiológico Fermentação etanólico**. Jornal Cana. Araras v 4. 25-26, 2000.
- AQUARONE, E. BORZANI, W. SCHMIELL, LIMA. URGEL DE ALMEIDA. **Biотecnologia industrial**. VOLUME I. 2005. ED. EDGARD BLUCHER LTDA. 254 PAGINAS.
- ASSUNÇÃO, I. P.; ALFENAS, A. C.; COELHO, R. S. B.; LIMA, G. S. A. Análise Isoenzimático de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente Etiológico da Antracnose foliar da Cebola. **Summa Phytopathologica**. v. 25, p. 293 - 298, 1999.
- BACH A B., Sherman, L.; Benacerraf B and Greene M. *Mechanisms of Regulation of Cell-Mediated Immunity*. *The Journal of Immunology*, 1978, 121: 1460-1468
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. E YARROW, D. (2002), *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press, 1002p

BARSZCZEWSK, W. ROBAC, MALGOZATA. PCR - based differentiation and taxonomy of brewing and type strains of the genus *Saccharomyces*. **Journal of the Institute of Brewing**. V.112n0.2.p.165-172.2006

BENÍTEZ T & ISABEL, L. **Intergeneric Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* Obtained by Protoplast Fusion**. **Applied and Environmental Microbiology**, maio 1986, p. 995-1003.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Influência de fonte de carbono nos teores de glicogênio e trealose durante a fermentação. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n.7, p.63-69, 1988.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas. v. 18, n. 4, p. 391-396, 1998

BRASIL. Instrução Normativa n 13, de 29 de junho de 2005. **Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, Página 3.** disponível em www.agricultura.gov.br.

BIOLOMICS <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Files/177/7921-col+.JPG> Acesso 16/05/2007

BIOLOMICS : <http://www.cbc.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx> 16/05/2007

BIOLOMICS <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Files/177/707-col+.jpg> Acesso 16/05/2007

CAMARA, M. Cachaça prazer brasileiro. **Guia prático para identificar a verdadeira pinga** ED. MAUAP. 144p. 2004

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação descontínua**. In: SCMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnology Industrial**: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 193-204.

CARVALHO, D.; TORRES, G.A. **Marcadores Moleculares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002, 35p.

CARDOSO, M.; CAPECE, A.; RUMANO, P. Tipagem of *Sacharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* from aglinio wire. **Letter in applied microbiology**. V. 34. p. 323-328.2002

CETEC (Centro Tecnológico de Minas Gerais). **Manual para produção artesanal de cachaça**. Belo Horizonte: CETEC, 1994.

CLETO.F.V. G. **Influência da adição de ácido sulfúrico e de fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição do aguardente de cana**. Jaboticabal, 1997, 109 f. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” 1997.

COSTENOBLE, R.; VALADI, H.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C. E FRANZÉN, C.J. **Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast*, v.16, p.1483-1495, 2000.

CRUZ, S.H.; CASSIO, F.; LEÃO, C.; ERRANDES, J. R. **O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônia em *Saccharomyces***. *Eletica Química*, v. 26, São Paulo 2001.

DAUDT, C.E.; HOUGH, C.S. Efeitos da variedade de microorganismos, temperatura, SO₂ e de álcoois superiores. **Revista Brasileira de Tecnologia**, São Paulo, v.6, n.4, p.301-305, 1975.

ETANISLAU, M.L.L.; CANÇADO JR., F.L.; PAIVA, B.M. **Mercado Atual e potencial da cachaça. Informe Agropecuário**. EPAMIG, v. 23, n.217, p.19-24, 2002.

FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo. Editora Sarvier. 2000, 276p.

FERREIRA, Vascos Ferreira. **Estudo da fermentação alcoólica em fracos agitados**. Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos. Campinas – UNICAMP, 266p. 2002

FERREIRA, L.V.; AMORIM H. V.; BASSO, L.C. **Fermentação de tretose e glicose endógena em *Saccharomyces cerevisiae***. *Ciências e tecnologia de alimentos*. v 19, n 1 . Campinas jan/abr. 1999.

FERREIRA, M. E.; GLATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Molecular em Análise Genético**. ed.2, EMBRAPA, Brasília, 220p.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 14, p. 12 - 18, 2000.

GALHIANE, M. S. **Análise de aroma em bebidas por cromatografia gasosa de alta resolução**. 1988, 99p., Dissertação (MS) – Inst. De Física e Química de São Carlos, USP/SP.

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, R.E. **I ncreased prodection of n propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide**. *Am. J. enol.vitic. davis*. V. 30 n. 4, p. 301-305, 1973

GOBO, A.B; BOGUZ, S.J; KETZER, C M; GUBERT, R; ANDRADE, L. **Composição química da cachaça produzida na Região Noroeste Do Rio Grande do sul, Brasil. Ciências tecnologica Alimentar**. Campinas, 26(4): 793-798, out.-dez.2006

GOMES F.C., PATARO, C., GUERRA, J.B., NEVES, M.J., CORREA, S.R., MOREIRA, E.S. AND ROSA, C.A. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaca. **Can J Microbiol** 48, 399-406.2002

GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C., ROSA, C.A. **Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae***

strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the arthisanal Brazilian cachaça. Letters in Applied Microbiology, v.33, p.106-111, 2001.

GUTIERREZ, L.;E. Produção de alcoois superiores por linhagens de *Saxxharomyces* durante a fermentação alcoólica. Sci Agri., Piracicaba, 50(3): 464-472.1993

HILL, W. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). Disponível em : <http://vm.efsan.fda.gov/~frf/rflp.htm> Acessado em: 28 jul 2005.

KASPERKI, A.; MIŚKIEWICZ T . An adaptive fuzzy logic controller using respiratory quotient as an indicator of overdosage in the baker's yeast process. **Biotechnol. Lett.** 24: 17-21.2002

JONAS, R. P., PAMMENT, N., GREENFIELD, D. P. F. **alcohol fermentation by yeasts the effect of environmental and ather variabre.** Processo biochemistry, p. 42-49, 1981.

JERONIMO,C. M.; ANDRIOLO, C. L.; BISOGNIN, D. A.; GODOI, R. S.; BORTOLOTO, O.C. **Relação potássio- nitrogênio para o diagnóstico e manejo nutricional da cultura da batata.** Pesq. agropec. bras. vol.41 no.12 Brasília Dec. 2004

LEÃO, R.M.; AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p

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

LIMA, U.A.**Biotecnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos.**Vol.1, SP, EDITORA BLUCHER LTDA., 2001a.

LIMA, U.A. **Biotecnologia: biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo: Edgard Blücher, v.4, p.145-207, 2001b.

LIMA Almeida de Urgel, EUGENIO AQUARONE,WALTER BORZANI, WILLIBALDO SCHMIDEL. **Biotecnologia industrial.v.4. biotecnologia na produção de alimentos.** Editora edgar blucher ltda. 2005. 523paginas

LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J. B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T. G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region.(Salnés, N. W. Spain). **World J. Microbiol. Biotechnol.,** v.8, p.539-541,1992.

MALAJOVICH, M ., A. **biotecnologia, capitulo 6** . 663 p. 2004 ed. Axcel

MAIA. A.B.R.A.& NELSON, D. **Fermentação alcoólica semicontinua destinada a produção de aguardente.** Biologia Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia e Alimentos. Campinas. V. 25 n.1. p. 33-36. 1991

MAIA, A. B. et al. **Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade**. Ed. Escola de Engenharia da UFMG e Fundação Cristiano Otoni. 1994, 65p.

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

MICHAEL J.MCCULLOUGH,KARL V. CLEMONS, JHON H. MCCUSKER E DAVID A. STEVENS. **Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids**. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. AP. 1998,P. 1035-1038VOL 36, NO. 4. 1998.

MIDDELHOVEN, W. ; KURTZMAN. Relationbetween phylogeny and physiology in some ascomycetos yaeasts. **Antonie wan leeuwenhoek** v. 83. p. 69-74. 2003

MIRANDA,M.P.;DANTAS,V.P.;DEL CORRAL, F. S. D. **Graus alcoólico e níveis de metanol em aguardentes do comercio (Estado da Bahia)**. *Biologia Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos . campinas*. V.26.n.2 p. 104-107, 1991

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; LINARDI, V.R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. *Short Communication: Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol 13, p.211-213, 1997.

NYKAMEN, L e NYKAMEN,I. **Rum flavour of destilled beverages: Origin and development**. Piggott, J. R. ED.Society of chemical industry / Ellis Harwood Limited.Chichester, UK p.49-63. 1983.

NONATO, E. A., et al. **A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of brazilian sugar cane spirits by gas chromatography**. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, p. 3533-3539, 2001.

OLIVEIRA, E.S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtido por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**.Discertação. Mestrado – Universidade de Campinas. Faculdade de engenharia de alimentos.2001.120f Campinas - SP

OURA, E. Carbon dioxide fixation process in yeast, particularly baker's yeast; theoretical background. In: Klaushofer, H., Sleytr, U. B. (eds.) **F'roceedings of the 4th International Symposium on Yeasts**. Vienna. Part 11, pp. 53-60. 1974

O' DONNELL, K., SUTTON, D. A., RINALDI, M. G., MAGNON, K. C., COX, P. A., REVANKAR, S. G., SANCHE, S., GEISER, D. M., JUBA, J. H., VAN BURIK, J.-A. H., PADHYE, A., ANAISSIE, E. J., FRANCESCONI, A., WALSH, T. J., ROBINSON, J. S.. Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium oxysporum* Complex Inferred from Multilocus DNA Sequence Data and Amplified Fragment Length Polymorphism

Analyses: Evidence for the Recent Dispersion of a Geographically Widespread Clonal Lineage and Nosocomial Origin. **Journal of Clinical Microbiology** 42: 5109-5120.2004

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

PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. *Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique*. **Informe Agropecuário**, EPAMIG, Belo Horizonte, v. 23, n 217, p. 37-43, 2002.

PEPPLER, H.J.; REED, G. Enzymes in food on feed processing. In: Rehm, H.J.; REED, G.; Kennedy, J. F. (Eds). **Biotechnology**. Vol. 7a. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH. p. 547-603. 1987.

PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. G.; AZEVEDO, S.M.; MORAIS, ^a R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachasa produzidas no estado de minas gerais. **Ciências Agrotec. Larvas**. V 27 n. 5. p 1068-1075. 2003

PEREZ, M A.; GALLEGU, F.J.; HIDALGO, P. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains; *Microbiology Letters*. 20s: 375-378. 2001.

PIRES, A.C.R *Cachaça análise de um empreendimento*, Recife: SEBRAE/PE. 2001

PINHEIRO, S. H. M. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará. Fortaleza**: Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, 1999. 133p. (Dissertação de Mestrado).

PULZATTO, M.E. Fatores que influem na obtenção de biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) na fermentação alcoólica. **Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas**, 2000. 112 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

PIGGOTT, J. K. et al. **The science and technology of whiskies**, New York: Longman, 1989.

PINHEIRO, S. H. M. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará. Fortaleza**, 1999. 133p. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.

QUAIN, D.E.; DUFFIELD, M.L. A metabolic function for higher alcohol production by yeast. In: CONGR. EUR. BREW. CONV., 20., 1985. **Proceedings**. 307-314, Apud: **Chemical Abstracts**, Columbus, v.105, p.41.142c.

RANKINE, B.C. Formation of higher alcohols by wine yeasts relationship to taste thresholds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.18, p.583-589, 1967.

RIBEIRO, J.C.G.M. *Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira*. 2 ed. Belo Horizonte: **O Lutador**, 2002. 223 p.

RED-NOGODAWITANA. *Biotechnology. Enzymes biomassa. Food and feed*. 167pv1. 1991

ROMANO, P.; PARAGGIO, M.; TURBANTI, L. Stability in by-product formation as a selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **J. Appl. Microbiol.**, v.84, p. 336-341, 1998.

ROLIM, J.C. Métodos de aplicação de glifosato N-(fosfonometil)-glicina para eliminação de soqueiras de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 2., 1981, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: STAB, 1981. p.61-75.

SCHWAN, R.F., MENDONÇA, A.T., DA SILVA JR, J.J., RODRIGUES, V. AND WHEALS, A.E. (2001) Microbiology and physiology of Cachaca (Aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek** 79, 89-96.

STENDER, A, F., STEFAN L, ROHDE M., MIROLD S., HARDT, S. IDENTIFICATION. of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell **Molecular Microbiology**. 36 (6), 1206–1221 .2000

SCHMIDELL, W., Lima, U.A., Aquarone, E. and Borzani, W., **Biotecnologia Industrial**, pp. 299-308 Coleção Biotecnologia, vol. 2. 2001

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.17, p.43-46, 1981

STEHLIK-TOMAS *et al.*: Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*, **Food Technol. Biotechnol.** 42 (2) 115–120.2004

SILVA-FILHO, E. A. Caracterização genética de populações de leveduras de destilaria de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. tese apresentada ao departamento de Micologia . Doutorado Em Biologia De Fungos. UFPE Pernambuco . 2003

SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA JR., J.J.; RODRIGUES, V. e WHEALS, A.E. **Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations**. *Antonie van Leeuwenhoek* v. 79, p. 89–96, 2001.

TRINDADE, A G. **CACHAÇA UM AMOR BRASILEIRO**. História-fabricação _ receitas ed. 2006. 200p.ed. Melhoramentos LTDA

SOUZA, C.M. **Caracterização das amostras de *Saccharomyces* Neysenex Reess (1838) estocadas na micoteca –URM, quanto a fermentação e Floculação**.1994. 87f. Dissertação. (Mestrado em Biologia de Fungos) Universidade Federal de Pernambuco, 1994.

STROPA, C.T.; ANDRIETTA, S. A; ANDRIETA, M. G. S.; SERRA, G. P. **Dinâmica populacional de leveduras em processos de fermentação alcoólica**. *Anais do XIII sinaferm*. 7-10 de agosto de 2000, Teresópolis, Rio de Janeiro.

VAUGHAN-MARTINI, A .; KURTZMAN, C. P.; MAYER, S.A.; O'NEILL, E. O . Two new species in the *Pichia guilhermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. Nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* camb. Fedemation of Eropcan **Microbiological Societ.Publisheal by Elsevier B.v allright.p.** 463-469. 2003

VICENTE, M. A; FIETTO, L.G.;CASTRO, I L.;SANTOS, MAURI'CIO, A N.G.; COUTRIM, X.; BRANDÃO, R. **Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higherlevels of flavoring compounds for production of “cachaça”the Brazilian sugarcane spirit.** International Journal of Food Microbiology 108 (2005) 51 –59

WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology.** John Wiley and Sons Publishers. London, UK. 250P. 1998.

WALT, J. P. van der Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts:genus 8: *Dekkera* van der Walt. In: KREGER-van RIJ. N.J.W. (Ed.), **The Yeast ataxonomic study.** Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 146-151.

WALT, J. P. van der; KERKEN, A. E. van The wine yeasts of the Cape: part V: studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 27, p. 81-90, 1961.

WEBB, A.D.; INGRAHAM, J.L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**, Washington, v.5, p.317-353, 1963.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S & TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: innis; GELFAND, D.H.; SNINSKYI, J. J. & WHITE,T. J. (ED) PCR prodtoctols, a guide to methods and applications.** New York. **Academic Aprec.** 1990, pp. 315-322.

WOJCIECH BARSZCZEWSKI & MALGORZATA ROBAK. PCR – **based differentiation and homology of brewing and type strains of the gehus *Saccharomyces*.j. inst.Brew.** 112(2), 165 – 172,2006. vol. 112.no. 2

XUFRE, A F.; SIMÕES, F.; GÍRIO, A C AND M. AMARAL-COLLAÇO T. **Use of RAPD analysis for differentiation among Six enological *Saccharomyces* spp. Strains.**FOOD TECHMOL.BIOTECHMOL. 38(1) 53-58 (2000).

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESPECIES *Sacharomyce cerevisiae* EXISTENTE NO MOSTO FERMENTADO DE ALAMBIQUES ARTESANAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Artigo a ser submetido para a revista Food Microbiology

Meiriana Xavier Vila Nova

Departamento de Genética, UFPE.

Email meirianan@bol.com.br

Marcos Antonio Moraes Junior

Departamento de Genética, UFPE

marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro

CCBS, UNICAP

bereneuza@unicap.br

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESPECIES *Sacharomyce cerevisiae*
EXISTENTE NO MOSTO FERMENTADO DE ALAMBIQUES ARTESANAIS NO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

RESUMO

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram coletadas em alambiques artesanais que utilizam diferentes procedimentos de fermentação para produção da cachaça no estado de Pernambuco. As linhagens foram caracterizados quanto ao perfil de amplificação genética aplicando a técnica de ISSR usando os iniciadores (GTG)₅, M13 e (GACA)₄. Um ou dois representantes de cada ribotipo foi posteriormente identificado por seqüenciamento da região D1/D2 do gene 26S de rDNA. Os resultados demonstraram que o marcador (GTG)₅ foi o mais eficiente para discriminar as linhagens e pode ser comparado com outros marcadores baseados em cariotipo ou reação de PCR no acompanhamento da dinâmica de leveduras no processo fermentativo.

Palavras chave: fermentação alcoólica (cachaça), caracterização genética, *Saccharomyces cerevisiae*, ISSR, (GTG)₅, (GACA)₄, M13, 26S de rDNA.

INTRODUÇÃO

O Brasil produz anualmente cerca de 1.3 bilhões de litros de cachaça, que rendem cerca de US\$ 2 bilhões ao país (CARDELLO et al., 1998; NASCIMENTO et al., 1999). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Cachaça de Alambique (IBCA), dos 1.3 bilhão de litros produzidos por ano, aproximadamente 1.0 bilhão é de cachaça industrial, produzida em destilarias, e o restante, de cachaça artesanal, feito em pequenos alambiques. (VASCONCELOS, 2003).

A cachaça vem conquistando novos mercados; em 2002, foram exportados 14,8 milhões de litros (1% da produção) para 70 países. A Europa compra cerca de 60% do total exportado, sendo a Alemanha a maior importadora com 30% do total (VASCONCELOS, 2003). Atualmente, Pernambuco é um Estado considerado grande produtor de cachaça. A Pitú, indústria instalada em Vitória de Santo Antão, é a maior exportadora de cachaça no Brasil.

Estima-se que existam mais de cinquenta produtores de cachaça, informais, em Pernambuco, e cerca de 15 a 20 formalizados (PIRES, 2001).

A fermentação artesanal da cachaça de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (OLIVEIRA 2001). Desta forma, as linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas no processo fermentativo estão expostas a condições climáticas significativamente diferentes nesses locais e em formas de produção da bebida, podendo apresentar diferenças na morfologia, fisiologia e ate mesmo molecular.

Estudos indicam que a padronização na qualidade da cachaça resultaria em melhor aceitação do produto tanto por consumidores, como por novos apreciadores, criando condições para aumentar o volume de exportações (BOZA; HORII, 1998). Levando em consideração a importância das leveduras na formação do sabor e a necessidade de obtenção de um produto padronizado, a análise da diversidade molecular dessas linhagens em diferentes métodos de produção de cachaça é de grande importância.

O acompanhamento da dinâmica de populações de leveduras em processos fermentativos artesanal pode trazer valiosas informações com relação à seleção linhagens de *S. cerevisiae* nativas (STROPPA et al., 2002). O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem permitido nas últimas décadas estudos de tipagem, identificação, classificação e ecologia microbiana, contribuindo para as áreas de ecologia e taxonomia microbiana (PEREZ et al., 2001).

Marcadores moleculares baseados em PCR (Polimerase Chain Reaction) são importantes ferramentas na discriminação inter e intraespecífica de leveduras presentes em fermentação industrial e artesanal. Gomes et al (2000) Estas técnicas baseadas em PCR têm demonstrado um elevado poder de discriminação intraespecífica, aliado ao baixo custo operacional e ao menor tempo de análise (Pataro et al, 2000). O presente trabalho tem como objetivo detectar o potencial de iniciadores da PCR na discriminação de *S. cerevisiae* presentes na fermentação da cachaça no estado de Pernambuco.

MATERIAL E METODOS

Coletas das amostras e isolados das leveduras

As coletas para o acompanhamento das populações de leveduras produtoras de cachaça artesanal do processo fermentativo ocorreram nos Alambiques O Mirante da Cachaça - Paudalho/PE, São Sarué - Igarassu/PE e Engenho Água Doce - Vicência/PE. As amostras foram obtidas através de coletas de 30mL de mosto fermentado colhidas diretamente da dorna do pré-fermentador do processo de batelada.

Para o isolamento de leveduras, o mosto foi diluído em solução salina 0,85% até $1:10^7$ e 0,1mL desta diluição foi plaqueado em duplicata, sobre o meio WLN (Caldo Wallerstein Nutriente, com corante) contendo em placa de petri, de forma a se obter aproximadamente 10 a 20 colônias de leveduras por placa. A incubação foi realizada a 30°C por sete dias. As colônias formadas foram caracterizadas morfológicamente quanto ao bordo, superfície, consistência, tamanho e cor. Amostras das colônias foram suspensas em 1mL de salina 0,85% e semeadas por estrias em meio WLN por no mínimo duas vezes para confirmação da pureza das culturas. As culturas puras foram mantidas em tubo com meio WLN sem corante, e preservadas sob óleo mineral esterilizado.

As coletas do alambique Água Doce (Vicência/PE), primeira batelada, foram realizadas durante o período de sete dias, no mês de outubro de 2005, nos intervalos de zero hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas e 144 horas. Na segunda batelada, as coletas foram realizadas durante o período de dois dias, no mês de março de 2006, nos intervalos de zero hora e 24 horas com fermento reutilizado.

O fermento utilizado no Engenho Água Doce é preparado com grãos triturados (milho 30kg, soja 5kg, arroz 10kg) e adicionado por sete dias, a cada 24 horas, 100L de caldo-de-cana com diferentes concentrações de Brix (6; 8; 10; 12; 14 e no sexto e sétimo dia em torno de 15). Sendo o mesmo reutilizado depois de sete dias de fermentação, por três meses. Depois dos sete dias de fermentação, todo material fermentado é retirado para destilar, este fermento natural permanece no pé de cuba e é utilizado para novas fermentações, as quais são realizadas em 24 ou 48 horas, assim que o Brix chega a zero. Foi assim que foi feita a coleta da segunda batelada.

No alambique São Sarué (Igarassu/PE), as coletas foram realizadas no tempo zero hora, uma hora, 24 horas e 48 horas, quando o Brix chegou a zero. O fermento é comercial e é utilizado caldo de cana diluído Brix 16.

No alambique O Mirante da Cachaça (Paudalho/PE), as coletas foram realizadas em zero, 24 e 48 horas, o material para fermentação tem o mesmo procedimento do alambique São Sarué.

Extração de DNA Nuclear

As leveduras foram transferidas, separadamente, para frascos de Erlenmeyer de 150mL, contendo 40mL de meio YPD (glicose, peptona e extrato de levedura) líquido e incubadas a 30°C por 16 horas a 150rpm. Amostras de 1,0mL de cada cultura foram transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugadas por três minutos a 5.900g. O sobrenadante foi descartado e 600µL de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; Dodecil Sulfato de Sódio 1%) foram adicionados, seguido de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada cinco minutos. Em seguida, foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio (24:1) e após breve homogeneização, as suspensões foram centrifugadas a 15.400g por 10 minutos. Após a centrifugação, foram transferidos 500µL do sobrenadante para microtubos novos de 1,5mL e a estes foram adicionados iguais volumes da solução clorofórmio/álcool isoamílico (1:1). As amostras foram centrifugadas mais uma vez por igual período e rotação e 400µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos novos. A estes microtubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por duas horas a -20°C para precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi coletado por centrifugação a 15.400g por 10 minutos, lavado em etanol a 70% por duas vezes e secado em estufa a 37°C por 30 minutos. Este precipitado foi ressuspenso cuidadosamente com 100µL de tampão TE pH 8,0 (TRIS 10mM/EDTA 1mM) e mantido a -20°C.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA, foi utilizada a relação $1 \text{ DO} = 50 \mu\text{g/mL}$ (SAMBROOK et al., 1989).

Seqüenciamento

Para a amplificação dos domínios divergentes D1/D2 da subunidade 26S do rDNA foram utilizados, tampão de PCR 10X, BSA (Soro albumina bovina) 0,25µg/µL, dNTP 2,0 mM, iniciador NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 10,0pmol/µL, iniciador NL-4 (5'-GGT3.3.2 CCGTGTTCACAGACGG-3') 10,0pmol/µL, MgCl₂ 50mM, *Taq* DNA polimerase 5U/µL e DNA 50ng/µL, como descrito por O'Donnel, (1993), utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE.

A reação de amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos,

anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, com um ciclo de extensão final a 72°C durante cinco minutos.

A eletroforese dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose a 1,3% em tampão TBE 0,5X, durante 40 minutos em 75W. O produto diretamente da amplificação foi purificado com o Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). A eletroforese dos fragmentos purificados foi feita em gel de agarose a 1,3% com TBE 0,5X por 90 minutos, juntamente com o marcador λ DNA/*Hind*III. Os fragmentos foram corados em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 μ g/mL - SAMBROOK et al., 1989), visualizados em transiluminador de luz U.V. e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart.

Os domínios D1/D2 da região 26S de rDNA das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* foram seqüenciados no Laboratório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando o BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para a identificação de cada isolado foi feito um BLAST nucleotídeo a nucleotídeo. As seqüências destas leveduras foram comparadas com as seqüências D1/D2 de fungos e leveduras disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>- National Center for Biotechnology Information)

Amplificação com os iniciadores (GTG)₅, (GACA)₄ e M13

As reações de amplificação do DNA da região ISSR com os iniciadores (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), (GACA)₄ (5'-GACAGACAGACAGACA-3') e M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') descritos por Silva-Filho et al. (2005) e foram realizadas no volume final de 25 μ L nas seguintes condições: tampão de PCR 10X (Tris-HCl 20mM pH 8.4; KCl 50mM), MgCl₂ 0.75Mm, BSA (Soro albumina bovina) 0,25 μ g/ μ L, dNTP 0.25mM, 0.25 μ M do iniciador, *Taq* DNA polimerase 0.1U (Operon Technologies CA) e 50 ng de DNA, utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE.

A amplificação para (GTG)₅ foi programada para um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente, 6 minutos a 72°C para extensão final. Para os iniciadores (GACA)₄ e M13 foram utilizado a mesma programação alterando a temperatura de anelamento de 45°C para (GACA)₄ e o iniciador M13 para 50°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.3% a 7,5 volts/cm por 2 horas e 30 minutos em tampão TBE 0,5X, utilizando-se como marcador *S. cerevisiae*, corados em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 μ g/mL -

SAMBROOK et al., 1989), visualizados em transiluminador de luz U.V. e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França).

Análises Estatísticas

Os dados obtidos das amplificações de ISSR com o iniciador (GTG)₅ das leveduras *S. cerevisiae* foram analisados pelo programa Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs – NTSYS-PC 2.1 (BUSSAB *et al.* 1990; ROHLF, 2002). Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, nas quais o número 1 (um) significa a presença da banda e o número 0 (zero) a ausência da banda. A partir das bandas no gel, o programa construiu uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente similaridade Simple Matching (SM) calculado de acordo com a fórmula:

$SM = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)}$	Onde: a = número coincidências positivas b e c = número de não-coincidências d = número coincidências negativas
--	---

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

RESULTADOS

Identificação e tipificação dos isolados de *S. cerevisiae*

Para identificação dos perfis de amplificação das linhagens de *S. cerevisiae*, foi adotado o eletroferograma utilizado no trabalho de Silva-Filho et al. (2005) (Figura 1). Os fragmentos de 650, 980, 1020, 1080, 1120, 1350, 1450, 1500, 2200 e 3100pb apresentaram-se como um conjunto de fragmentos monomórficos, caracterizando o perfil típico da espécie *S. cerevisiae*. A presença ou ausência de fragmentos neste intervalo, juntamente com a presença ou ausência da banda de 750pb permitiram discriminar linhagens de *S. cerevisiae*.

Dinâmica da população de *S. cerevisiae* no Alambique do Engenho Água Doce

Durante sete dias da primeira batelada e dois dias da segunda batelada, foram isoladas 207 e 31 colônias, respectivamente, do mosto fermentado e 99 e 20, respectivamente, foram as que apresentaram fragmento de 850pb foram amplificadas pelo (GTG)₅. Dezenove linhagens da espécie de *S. cerevisiae* foram amplificadas com os iniciadores (GTG)₅, M13 e (CAGA)₄ (Figura 2). A amplificação com os iniciadores (GACA)₄ e M13, não apresentou quase nenhuma variação intraespecífica entre os isolados de *S. cerevisiae*. A amplificação com o

iniciador (GTG)₅. Demonstrou a maior variação genética na formação de 4 tipos de perfis genéticos P1, P5, P6 e P25 que apresentaram padrão de fragmentos que variou de 650 a 3100pb detectados a partir de 10% na população.

***S. cerevisiae* no Alambique São Sarué**

Durante quarenta e oito horas de batelada, foram isoladas 61 colônias, do mosto fermentado e 30 foram as que apresentaram fragmento de 850pb e foram amplificadas pelo (GTG)₅. Dez amostras foram submetidas a ampliações com três diferentes tipos de iniciadores de ISSR (Figura 3). A amplificação com os iniciadores (GACA)₄ e M13, não apresentou quase nenhuma variação intraespecífica entre as espécies de *S. cerevisiae*. A amplificação com o iniciador (GTG)₅ formou apenas 3 tipos de perfis genéticos P1, P1A e P5 que apresentaram padrão de fragmentos que variou de 650 a 3100pb detectados a partir de 10% na população.

***S. cerevisiae* no Alambique Mirante da cachaça**

Durante quarenta e oito horas de batelada, foram isoladas 36 colônias, do mosto fermentado e 28 foram as que apresentaram fragmento de 850pb foram amplificadas pelo (GTG)₅. Nove amostras foram submetidas a ampliações com três diferentes tipos de iniciadores de ISSR (GTG)₅, M13 e (CAGA)₄ (Figura 4). A amplificação com os iniciadores (GACA)₄ e M13, também não apresentou quase nenhuma variação intraespecífica entre as espécies de *S. cerevisiae*. A amplificação com o iniciador (GTG)₅ demonstrou a maior variação genética na formação de 4 tipos de perfis genéticos P1, P5, P6 e P25 que apresentaram padrão de fragmentos que variou de 650 a 3100pb detectados a partir de 10% na população.

Os mesmos representantes dos 5 perfis genéticos (P1, P1A, P5, P6 E P25) caracterizados pelo (GTG)₅ foram amplificados com o iniciador (GACA)₄ e M13 para amplificação de ISSR nos três alambiques. A amplificação com o iniciador (GACA)₄ gerou perfis contendo cerca de 9 a 14 fragmentos e peso molecular variando entre 300 e 2800pb. Com o iniciador M13, a amplificação gerou 7 fragmentos para todas as linhagens e o peso molecular variou de 700 e 1800pb.

Análise de agrupamento genético dos isolados de *S. cerevisiae*

Representantes dos 5 perfis gerados pela amplificação com iniciador (GTG)₅ foram agrupados pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Simple Matching (SM). O dendrograma obtido apresentado na Figura 5 mostra o grau de similaridade entre eles. Todos os perfis puderam ser agrupados com cerca de 93% de similaridade. Cinco perfis foram

reunidos em dois grupos: o grupo A representado pelos perfis P1 e P1A com aproximadamente 97% de similaridade entre eles, por apresentar um único fragmento de 2600pb presente em P1A. O grupo B representado pelos perfis P5, P6 e P25 com 95% de fragmentos comuns entre si. Entretanto, os isolados P5 e P6 apresentaram menor distância genética com apenas 97% de similaridade, por conta da presença de um único fragmento de 750pb em P6.

DISCUSSÃO

Os isolados de *S. cerevisiae* apresentaram diferenças no padrão de perfis entre si na amplificação com o iniciador (GTG)₅ nas linhagens de todos os três alambiques. Silva-Filho et al. (2005), afirma que o alto grau de discriminação alcançado por (GTG)₅ permite a sua utilização para identificação de leveduras contaminantes em processos de fermentação. Vários autores já relataram a eficiência do iniciador (GTG)₅ relacionando com pesquisas de taxonomia, ecologia, biotecnologia e etc.

Sousa (2004) utilizou o método ISSR, aplicando (GTG)₅ e (GACA)₄ para analisar linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* e observou que o (GTG)₅ apresentou maior diversidade genética em relação à região complementar ao tetranucleotídeo (GACA)₄.

Baleiras Couto et al (1996) realizaram acompanhamento de leveduras presentes na produção de maionese, onde encontraram as espécies do gênero *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Pichia*, aplicaram os iniciadores (GAC)₅ e (GTG)₅. Entretanto, o (GTG)₅ foi o mais eficiente na discriminação intra e interespecífica das espécies analisadas.

Meyer e Mit Chell (1995) estudaram a espécie de *Cryptococcus neoformans* por meio da região ISSR, e observou que o iniciador (GTG)₅ apresentou resultados mais convincentes em relação ao (GACA)₄ na discriminação intraespecífica.

Caruso et al, (2002), estudaram a tipagem de espécies de *S. cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* do vinho anglicano, por meio dos iniciadores (GTG)₅ e (GAC)₅, onde o dendrograma gerado por meio do programa UPGMA mostrou a similaridade das espécies e detectou a discriminação intraespecífica da espécie *K. apiculata* e a determinação intraespecífica para a espécie de *S. cerevisiae*.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento à pesquisa CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro ao trabalho.

BIBLIOGRAFIA

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

Boza, Y.; Horii, J., 1998. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.391-396,

Cardello, H.M.A.B.; Isique, W.D.; Faria, J.B., 1998. Teores de enxofre e aceitabilidade de aguardentes de cana brasileiras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.1-9,.

Caruso, M. Salzano, G. Romano M., 2002. PTyping of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letter in Applied Microbiology*, p. 323-328

Gomes, L. H., et al., 2000. Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiol.*, v.17, p.217-223,

Meyer W. and Mitchell T.G. 1995. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 16: 1648–1656.

Nascimento, R. F., et al., 1999.. Mineral profile of Brazilian Cachaças and other international spirits. *J. Food Comp. Anal.*, v.12, p.17-25,

Oliveira, E. S., 2001. *Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da cachaça obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais*. Campinas, 135p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Pataro, C., et al., 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p.1-9,

Pérez, M.A., et al., 2001. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.33, p.461-466,

Pires, A.C.R., 2001. Cachaça análise de um empreendimento, Recife: SEBRAE/PE.

Rohlf, F. J., 2002. *NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.0*. Nova York: Exeter Software,

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniats, T., 1989. Molecular cloning a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York,

Silva-Filho,E.,A. Santos, S K B. Resende, A .Falca, J. O Moraes ,Moraes Jr M. A, Simões ,D,A ., 2005. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation processas sesssed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:13–23

Sousa, A C B., 2004. Analise da diversidade genética através de marcadores moleculares e características citomorfologicas de *Colletotrichum gloeosporioides*.Dissertação de Mstrado. Mestrado em Biologia de Fungos. UFPE.85p

Stropa, C.T.; Andrietta, S. A; Andrieta, M. G. S.; Serra, G. P., 2000. Dinâmica populacional de leveduras em processos de fermentação alcoólica. Anais do XIII sinaferm. 7-10 de agosto de, Teresópolis, Rio de Janeiro.

Vasconcelos, Y., 2003.Cachaça sem mistério. *Rev. Pesquisa Fapesp*, v. 87, p.74-77,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>- National Center for Biotechnology Information)

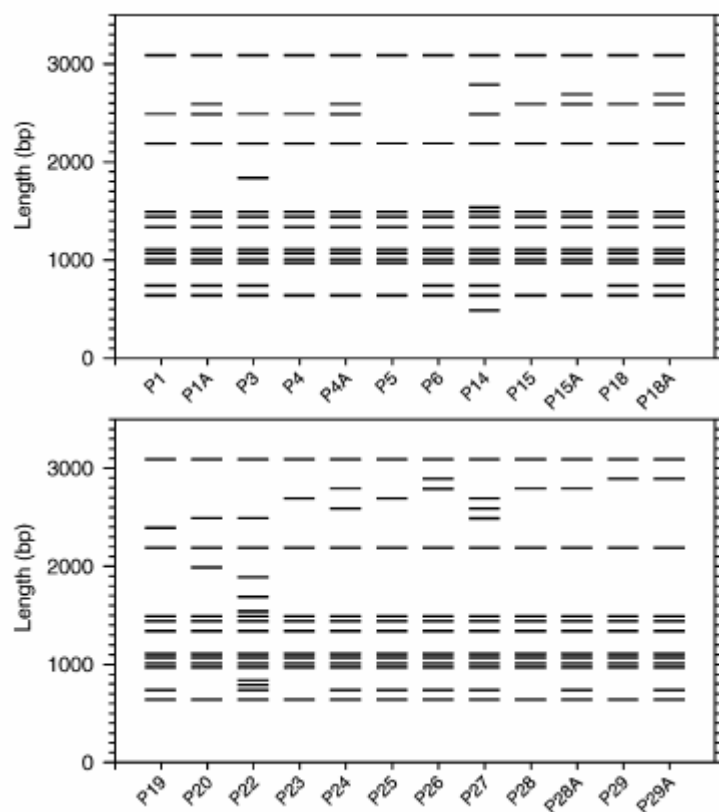


Figura 1 Eletroferograma dos perfis (GTG)₅ das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas do mosto fermentado de destilarias produtoras de álcool (SILVA-FILHO et al, 2005).

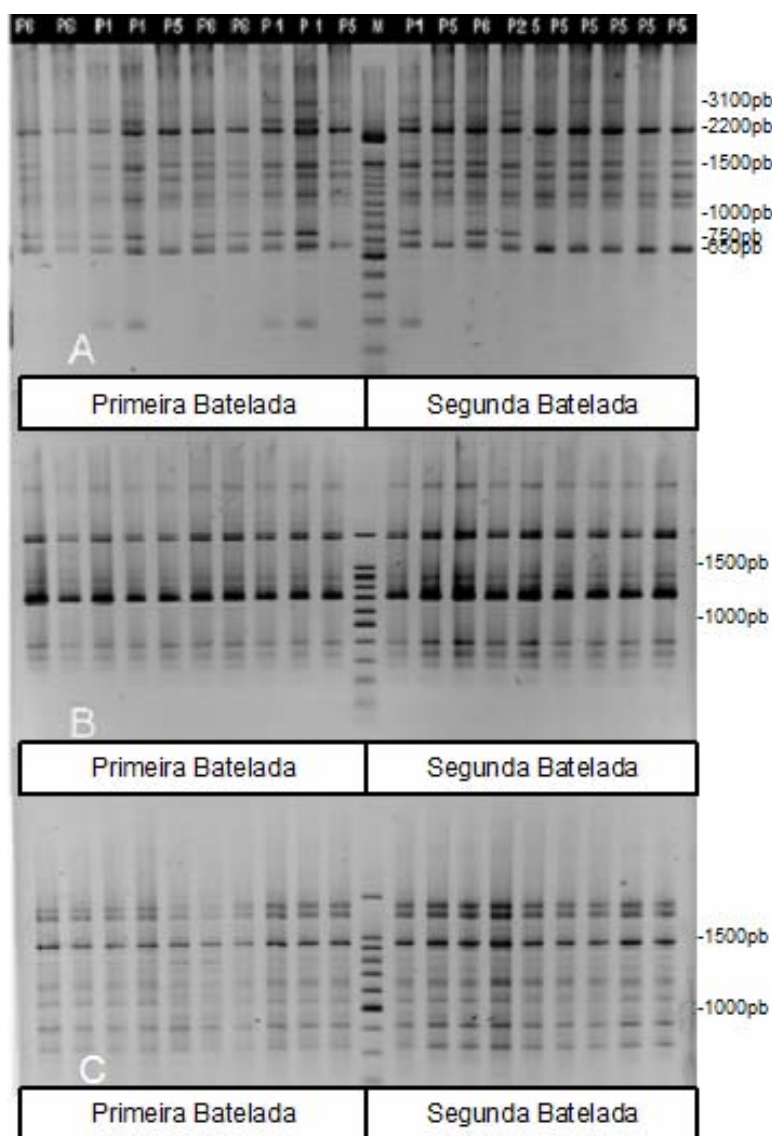


Figura 2. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores $(GTG)_5$ (A), $(GACA)_4$ (B) e M13 (C) das *Saccharomyces Cerevisiae*, encontradas no alambique Água Doce/PE, primeira e segunda batelada, safra 2005/2006, em gel de agarose. Pista M, marcador de peso molecular 100pb. Na terceira pista, encontra-se a levedura sequenciada.

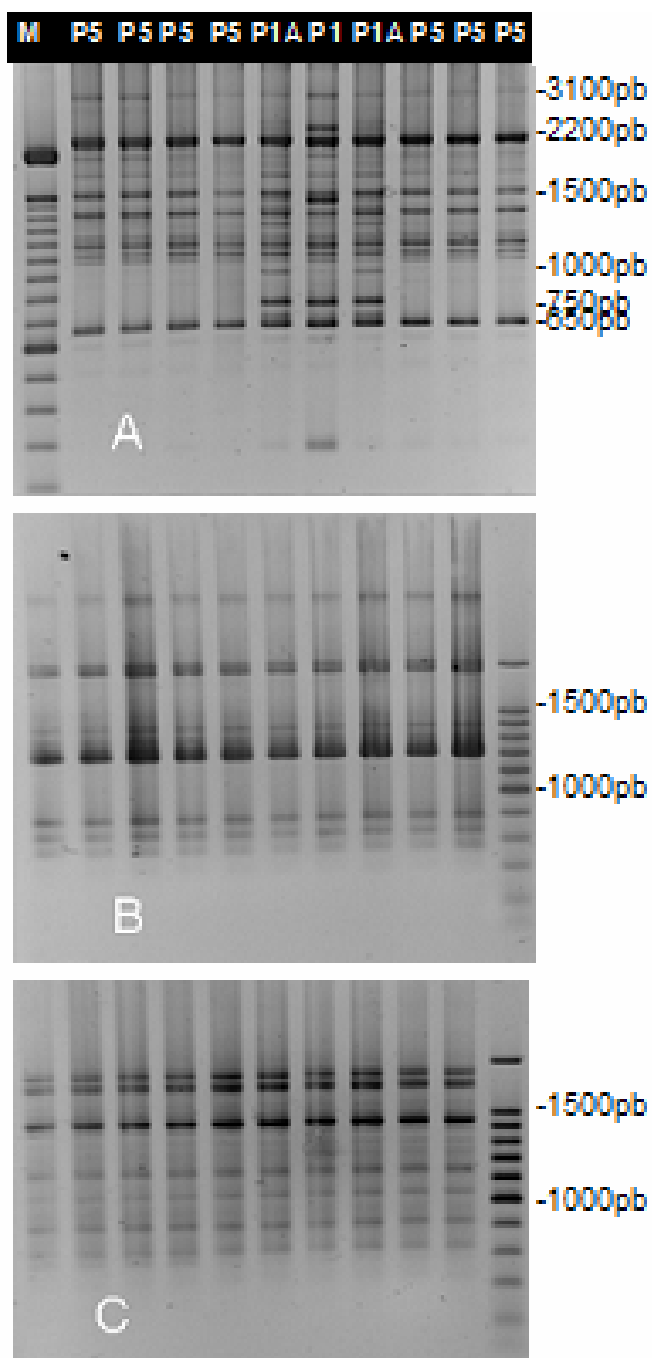


Figura 3. Perfís de amplificação de ISSR com os iniciadores $(GTG)_5$ (A), $(GACA)_4$ (B) e M13 (C) das *Saccharomyces Cerevisiae*, encontradas no alambique São Sarué/PE, safra 2005/2006, em gel de agarose. Pista M, marcador de peso molecular 100pb. Na segunda pista, encontra-se a levedura seqüenciada.

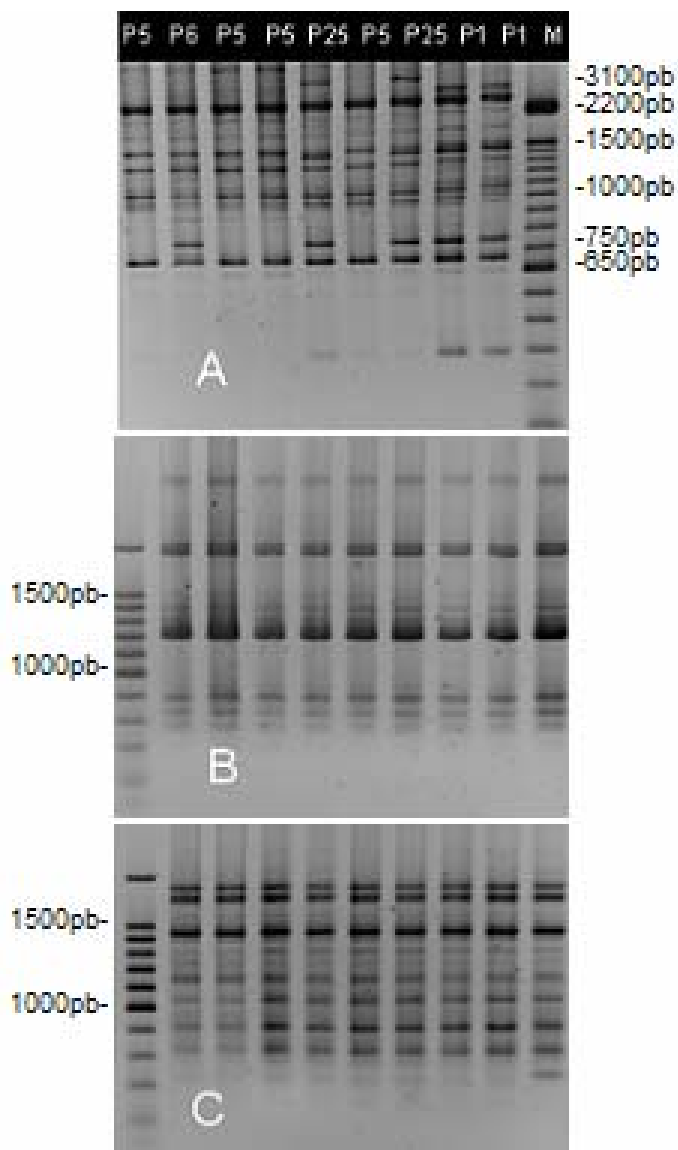


Figura 4. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores $(GTG)_5$ (A), $(GACA)_4$ (B), e M13 (C) das *Saccharomyces Cerevisiae*, encontradas no alambique O Mirante da Cachaça/PE, safra 2005/2006, em gel de agarose. Pista M, marcador de peso molecular 100pb. Na terceira pista, encontra-se a levedura sequenciada.

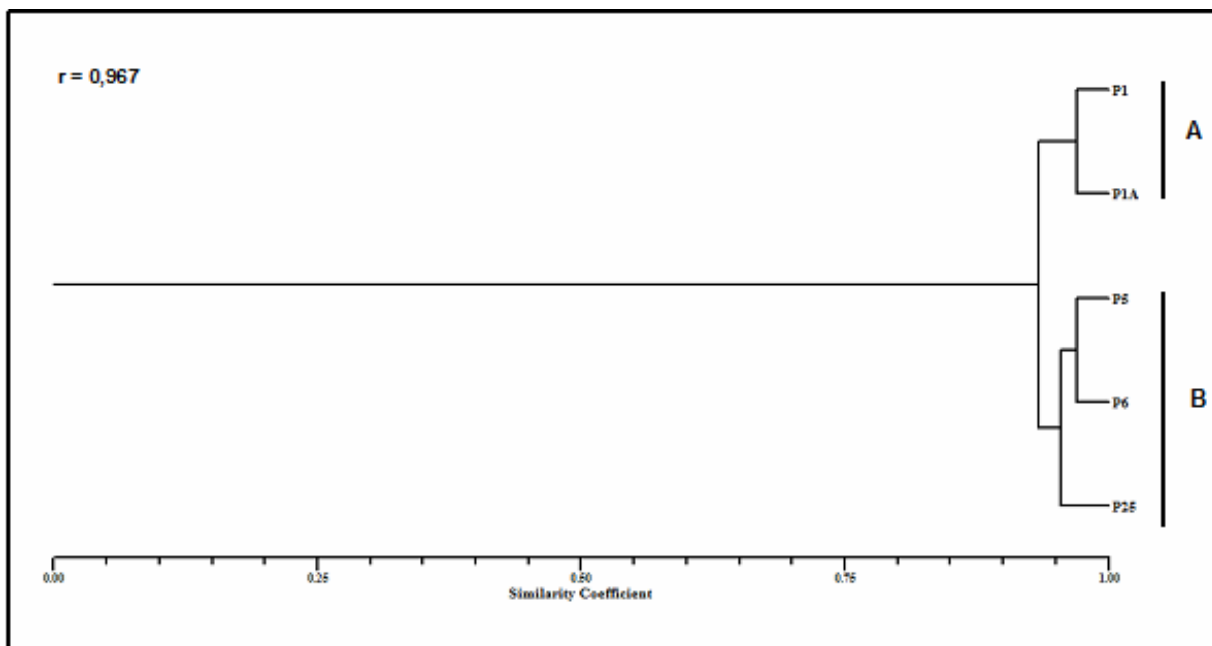


Figura 5. Dendrograma dos perfis resultantes da amplificação de ISSR com o iniciador $(GTG)_5$ das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas nos Alambiques do Engenho Água Doce - Vicência/PE, São Sarué - Igarassu/PE e O Mirante da Cachaça - Paudalho/PE, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Simple Matching (SM).

5.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA EXISTENTE NO MOSTO FERMENTADO DE ALAMBIQUES ARTESANAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Artigo a ser submetido para a revista International Journal of Food Microbiology

Meiriana Xavier Vila Nova

Departamento de Genética, UFPE.

meirianan@bol.com.br

Marcos Antonio Moraes Junior

Departamento de Genética, UFPE

marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro

CCBS, UNICAP

bereneuza@unicap.br

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS DO MOSTO FERMENTADO DE ALAMBIQUES ARTESANAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

RESUMO

Espécies de leveduras foram coletadas em alambiques artesanais que utilizam diferentes procedimentos de fermentação. Os isolados foram caracterizados quanto ao perfil de amplificação do locus ITS1-5.8s-ITS2 do DNA ribossomal e agrupados em ribotipos. A relação genética entre os isolados do mesmo ribotipo e a diferenciação entre os ribotipos foram comprovadas pela técnica de *DNA-fingerprinting* usando os iniciadores (GTG)₅, M13 e (GACA)₄. Um ou dois representantes de cada ribotipo foi posteriormente identificado por seqüenciamento da região D1/D2 do gene 26S de rDNA. Além de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram encontradas também as espécies *Pichia caribbica* (*Candida fermentati*), *Candida milleri*, *C. drosophilae*, *C. ubatubensis*, *C. guilliermondii* e *Zygosaccharomyces fermentati*. Os resultados de composição da população de levedura nos diferentes alambiques mostram que existe uma relação direta entre a assepsia do processo e o número de espécies diferentes, ou seja, quanto mais controlado menor o número de espécies.

Palavras chave: fermentação alcoólica (cachaça), caracterização genética, *Saccharomyces cerevisiae*, cachaça, ITS-rDNA, ISSR, (GTG)₅, (GACA)₄, M13, 26S de rDNA.

INTRODUÇÃO

A zona da mata do Estado de Pernambuco se caracteriza pela atividade canavieira relacionada à produção de açúcar, álcool combustível e aguardente. Esta última vem adquirindo importância econômica substancial devido à valorização do produto, principalmente para exportação (FALCÃO, 2003). Entretanto, a maior parte da produção ainda concentra-se em alambiques artesanais que continuam a utilizar técnicas tradicionais, principalmente na produção do fermento, chamado pé-de-cuba.(MAIA, et al 1994).

A utilização de leveduras selecionadas tem sido pesquisada, visando um aumento da produtividade, vantagens tecnológicas e melhoria das características sensoriais da cachaça (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001). Segundo MORAIS et al. (1997) foi observado que durante a multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para produção de aguardente de cana artesanal, a qual varia de 12 a 48 horas, há uma sucessão de espécies de leveduras, sendo as espécies predominantes *S. cerevisiae*. *Candida sake*, *Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilarum* e leveduras apiculadas também são freqüentes.

Pataro et al. (2000) mostraram uma sucessão de população de leveduras em diferentes períodos de fermentação da cachaça, em três alambiques no estado de Minas Gerais.

Saccharomyces servazzi, *Pichia anamala*, *S. uniporus* e *Torulaspora delbrueckii* foram exclusivamente isoladas de fermentações iniciais, *Candida glabrata*, *C. colliculosa* e *C. krusei* foram isoladas nas fermentações medianas; a maioria das linhagens de *S. pombe*, *S. cerevisiae* foram espécies predominantes em todo período da fermentação.

Segundo Oliveira (2001) fermentação artesanal da cachaça de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *S. cerevisiae*, leveduras apiculadas (*Kloeckera japonica*) e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são também, freqüentemente, isoladas. As leveduras presentes nessas fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também devido às condições de processo.

É de grande relevância o estudo molecular dessa microbiota, com a finalidade de identificar quais as possíveis leveduras presentes em todo processo de fermentação alcoólica, técnicas moleculares tem permitido nas ultimas décadas estudos de tipagem, identificação, classificação e ecologia microbiana, contribuindo para as áreas de ecologia e taxonomia microbiana.

Marcadores como os microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats), bastantes utilizados por serem de simples execução, apresentar alta resolução em matriz de poliacrilamida ou agarose, amplificarem regiões específicas do genoma, com uso de pequenas quantidades de DNA (RAMOS et al, 2006). A técnica pode ser utilizada para compor programas de controle de qualidade realizados em laboratórios de pesquisa, em programas de melhoramento genético e de análise de sementes (SMITH, 1998).

A partir do exposto, o presente trabalho tem como objetivo identificar e discriminar espécies de leveduras do processo fermentativo da cachaça por meio de marcadores ISSR.

METODOLOGIA

Coletas das amostras e isolamento das leveduras do mosto fermentado de cana-de-açúcar

As coletas para o acompanhamento das populações de leveduras produtoras de cachaça artesanal do processo fermentativo ocorreram nos Alambiques o Mirante da Cachaça - Paudalho/PE, São Sarué - Igarassu/PE e Engenho Água Doce - Vicência/PE. As amostras foram obtidas através de coletas de 30mL de mosto fermentado colhidas diretamente da dorna do pré-fermentador do processo de batelada.

Para o isolamento das leveduras foram realizados dois meios de cultura, um contendo o meio WLN sem actidione (ciclohexamida) e o outro meio WLN com actidione na concentração final de 5µg/mL para quantificar leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os meios contendo o corante verde de bromocresol, os antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico na concentração final de 50µg/mL para quantificar leveduras totais e inibir o crescimento bacteriano. O mosto foi diluído em solução salina 0,85% até 1:10⁷ e 0,1mL das diluições 1:10⁷ foram plaqueados em duplicata, de forma a se obter aproximadamente 10 a 20 colônias de leveduras por placa. A incubação foi realizada a 30°C por sete dias. As colônias formadas foram caracterizadas morfolologicamente quanto ao bordo, superfície, consistência, tamanho e cor.

Amostras das colônias foram suspensas em 1mL de salina 0,85% e semeadas por estrias em meio WLN para confirmação da pureza das culturas. As culturas puras foram mantidas em tubo com meio WLN sem corante, sob óleo mineral esterilizado.

As coletas do alambique do Engenho Água Doce (Vicência/PE), primeira batelada, foram realizadas durante o período de sete dias, no mês de outubro de 2005, nos intervalos de tempo zero, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas e 144 horas. Na segunda batelada, as coletas foram realizadas durante o período de dois dias, no mês de março de 2006, nos intervalos de zero hora e 24 horas com fermento reutilizado. O fermento utilizado no Engenho Água Doce é preparado com grãos triturados (milho 30kg, soja 5kg, arroz 10kg) e adicionado por sete dias, a cada 24 horas, 100L de caldo-de-cana com diferentes concentrações de Brix (6; 8; 10; 12; 14 e no sexto e sétimo dia em torno de 15). Sendo o mesmo reutilizado depois de sete dias de fermentação, por três meses. Depois dos sete dias de fermentação, retira todo material fermentado para destilar, este fermento natural permanece no pé de cuba e é utilizado para novas fermentações, as quais são realizadas em 24 ou 48 horas, assim que o Brix chega a zero. Foi assim que foi feita a coleta da segunda batelada.

No alambique São Sarué (Igarassu/PE), as coletas foram realizadas em tempo zero hora, uma hora, 24 horas e 48 horas, quando o Brix chegou a zero. O fermento é comercial e é utilizado caldo de cana diluído Brix 16.

No alambique O Mirante da Cachaça (Paudalho/PE), as coletas foram realizadas em tempo zero, 24 e 48 horas, o material para fermentação tem o mesmo procedimento do alambique São Sarué.

Extração de DNA Nuclear

As leveduras foram transferidas, separadamente, para frascos de Erlenmeyer de 150mL, contendo 40mL de meio YPD líquido e incubadas a 30°C por 16 horas a 150rpm. Amostras de 1,0mL de cada cultura foram transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugadas por três minutos a 5.900g. O sobrenadante foi descartado e 600µL de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25Mm; Dodecil Sulfato de Sódio 1%) foram adicionados, seguido de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada cinco minutos. Em seguida, foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio (24:1) e após breve homogeneização, as suspensões foram centrifugadas a 15.400g por 10 minutos. Após a centrifugação, foram transferidos 500µL do sobrenadante para microtubos novos de 1,5mL e a estes foram adicionados iguais volumes da solução clorofórmio/álcool isoamílico (1:1). As amostras foram centrifugadas mais uma vez por igual período e rotação e 400µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos novos. A estes microtubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por duas horas a -20°C para precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi coletado por centrifugação a 15.400g por 10 minutos, lavado em etanol a 70% por duas vezes e secado em estufa a 37°C por 30 minutos. Este precipitado foi ressuspensionado cuidadosamente com 100µL de tampão TE pH 8,0 (TRIS 10mM/EDTA 1mM) e mantido a -20°C.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA, foi utilizada a relação $1\text{ DO} = 50\mu\text{g/mL}$ (SAMBROOK et al.,1989).

Amplificação de DNA da Região ITS do DNA Ribossomal

As reações de amplificação das regiões ITS1, ITS2 e da subunidade 5.8S do rDNA com os iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-3') descritos por White et al. (1990), foram feitas no volume final de 25 µL nas seguintes condições: tampão de PCR 10X (Tris-HCl 20mM pH 8.4; KCl 50mM), MgCl₂ 1.5mM, BSA (Soro albumina bovina) 0,25µg/µL, dNTP 0.2mM, cada iniciador 12.5 pmols, *Taq* DNA polimerase 1.25 U (Operon Technologies CA), DNA 50 ng, utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE.

A amplificação foi programada para realizar uma desnaturação inicial de 6 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 20 segundos, pareamento a 53°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e finalmente, 5 minutos a 72°C para extensão final. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.3% a 7,5 volts/cm por 90 minutos em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) utilizando-se o marcador de peso molecular de 123-bp (Invitrogen Life Technologies), corados em brometo de etídio (TBE 1X/EtBr 0,5µg/mL), visualizados em transiluminador de luz U.V e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França).

Amplificação de DNA da Região ISSR – iniciadores (GTG)₅, (GACA)₄ e M13

As reações de amplificação do DNA da região ISSR com os iniciadores (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), (GACA)₄ (5'-GACAGACAGACAGACA-3') e M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3') descritos por Silva-Filho et al. (2005), foram feitas no volume final de 25 µL nas seguintes condições: tampão de PCR 10X (Tris-HCl 20mM pH 8.4; KCl 50mM), MgCl₂ 0.75Mm, BSA (Soro albumina bovina) 0,25µg/µL, dNTP 0.25mM, 0.25 µM do iniciador, *Taq* DNA polimerase 0.1U (Operon Technologies CA) e DNA 50 ng, utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE.

A amplificação para (GTG)₅ foi programada para um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente, 6 minutos a 72°C para extensão final. Para o iniciador (GACA)₄ foi utilizado a mesma programação alterando a temperatura de anelamento para 45°C e o iniciador M13 para 50°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.3% a 7,5 volts/cm por 2 horas e 30 minutos em tampão TBE 0,5X, utilizando-se como marcador *S. cerevisiae*, corados em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 µg/mL - SAMBROOK et al., 1989), visualizados em transiluminador de luz U.V. e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França).

Seqüenciamento

Para a amplificação dos domínios divergentes D1/D2 da subunidade 26S do rDNA foram utilizados, tampão de PCR 10X, BSA (Soro albumina bovina) 0,25µg/µL, dNTP 2,0 mM, iniciador NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 10,0pmol/µL, iniciador NL-4 (5'-GGT3.3.2 CCGTGTTCAGACGG-3') 10,0pmol/µL, MgCl₂ 50mM, *Taq* DNA

polimerase 5U/ μ L e DNA 50ng/ μ L, como descrito por O'Donnel, (1993), utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE.

A reação de amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, com um ciclo de extensão final a 72°C durante cinco minutos.

A eletroforese dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose a 1,3% em tampão TBE 0,5X, durante 40 minutos. O produto diretamente da amplificação foi purificado com o Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega). A eletroforese dos fragmentos purificados foi feita em gel de agarose a 1,3% com TBE 0,5X por 90 minutos, juntamente com o marcador λ DNA/*Hind*III. Os fragmentos foram corados em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 μ g/mL - SAMBROOK et al., 1989), visualizados em transiluminador de luz U.V. e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart.

Os domínios D1/D2 da região 26S de rDNA das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* foram seqüenciados no Laboratório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando o BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para a identificação de cada isolado foi feito um BLAST nucleotídeo a nucleotídeo. As seqüências destas leveduras foram comparadas com as seqüências D1/D2 de fungos e leveduras disponíveis no Genbank. (Tabela 1)

RESULTADOS

Tipagem das leveduras de alambiques produtores de aguardente artesanal na Zona da Mata do Estado de Pernambuco

Todas as espécies não-*Saccharomyces cerevisiae* encontradas no processo de fermentação dos alambiques produtoras de aguardente artesanal caracterizadas pelo tamanho diferente do fragmento típico de 850 pares de base (pb) da levedura de processo *S. cerevisiae* foram identificadas através do seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S de rDNA. Uma linhagem de *S. cerevisiae* foi seqüenciada e usada como controle, e as seqüências obtidas foram comparadas às disponíveis no Genbank por um procedimento de BLAST.

A Figura 1 mostra a amplificação do locus ITS1-5.8s-ITS2 do DNA ribossomal das leveduras isoladas em sete dias de fermentação da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce, safra 2005/2006. Esta amplificação gerou fragmentos de aproximadamente 550, 600, 700 e 850pb para todas as amostras do mosto fermentado da primeira batelada. Este resultado aponta a presença de pelo menos quatro espécies de leveduras. Os ribotipos foram agrupados nas diferentes amostras coletadas do processo, a partir do qual se pode determinar a proporção de cada um deles ao longo da produção de cachaça.

Estas amostras foram submetidas a amplificações com três diferentes tipos de iniciadores de ISSR. Os resultados mostrados na Figura 2 mostram que de fato cada perfil ITS apresentou um padrão específico de amplificação para os três marcadores. As amostras foram agrupadas então em quatro grupos fenóticos representados pelos perfis de ribotipo: o grupo 1 (550pb), grupo 2 (600pb), grupo 3 (700pb) e grupo 4 (850pb).

Um representante de cada grupo de isolados foi submetido à análise de sequência de nucleotídeos da região D1/D2 do gene 26S-rDNA. As seqüências foram submetidas à análise de alinhamento local (BLAST) no banco de dados genéticos NCBI. O único isolado do grupo de 550pb, isolado SADB1C1(4), foi identificado como *Candida* sp, ou seja, a seqüência obtida não apresentou similaridade acima de 99% com nenhuma seqüência previamente identificada no banco de dados, e pode representar uma nova espécie de levedura. O representante do grupo 600 pb, isolado SADB1C1(1), foi identificado *Pichia caribica*, teleomorfo de *Candida fermentati*, o de 700pb, isolado CADB1C3(1), como *Candida milleri* e o do grupo 850pb, isolado SADB1C4(3), foi identificado como pertencente à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, estando último de acordo com resultados anteriores para o perfil de amplificação de *S. cerevisiae* do locos ITS do rDNA e para os três marcadores de ISSR (SILVA-FILHO et al, 2005a; SILVA-FILHO et al, 2005b).

Para o acompanhamento da segunda batelada (safra 2006/2007) do alambique do Engenho Água Doce foram realizadas apenas duas coletas para caracterização do fermento reutilizado da primeira. Inicialmente as amostras foram agrupadas segundo o tamanho do fragmento produzido pela amplificação dos locos ITS, e dois grupos foram definidos: 600pb e 850pb (Figura 3). Os isolados destes grupos foram submetidos à amplificação com os iniciadores (GACA)₄, (GTG)₅ e M13 e os resultados mostraram perfis de amplificação semelhantes aqueles dos grupos correspondentes aos isolados da primeira batelada (Figura 4), indicando que estes isolados pertencem às espécies *P. caribica* e *S. cerevisiae*. Esta

identificação foi posteriormente confirmada pelo sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S-rDNA.

A amplificação do *locus* ITS1-5.8s-ITS2 do DNA ribossomal das leveduras isoladas tempo zero hora 1 hora, 24 e 48 horas após a colocação do fermento no Alambique da Cachaça São Sarué, safra 2006/2007, gerou fragmentos de aproximadamente 600 e 850pb (Figura 5) para todas as amostras do mosto fermentado. Estas amostras foram submetidas a amplificações com três diferentes tipos de iniciadores de ISSR. Os resultados mostrados na Figura 5 ilustram que de fato cada perfil ITS apresentou um padrão específico de amplificação para os três marcadores. Estas amostras foram agrupadas então em dois grupos fenéticos distintos representados pelos perfis de ribotipo: o grupo 1 (600pb) e grupo 2 (850pb).

Um representante de cada grupo de isolados foi submetido à análise de sequência de nucleotídeos da região D1/D2 do gene 26S-rDNA e estas sequências foram submetidas à análise de alinhamento local (BLAST) no banco de dados genéticos NCBI. O único isolado do grupo de 600 pb, isolado SAIB1C1(41), foi identificado como *P. caribbica* e o representante do grupo 850 pb, isolado (SAIBIC2(51), como *S. cerevisiae*. Este último resultado está de acordo como nossos resultados anteriores para o perfil de amplificação de *S. cerevisiae* do locos ITS e para os três marcadores de *PCR-fingerprinting* (SILVA-FILHO, 2003)

A Figura 7 ilustra a amplificação do locus ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA das leveduras isoladas em tempo zero, 24 e 48 horas após a colocação do fermento no Alambique O Mirante da Cachaça, safra 2005/2006. Esta amplificação gerou fragmentos de aproximadamente 500, 600, 700 e 850pb para todas as amostras do mosto fermentado. Este resultado aponta a presença de pelo menos seis espécies de leveduras. Os ribotipos foram agrupados nas diferentes amostras coletadas do processo, a partir do qual se pode determinar a proporção de cada um deles ao longo da produção de cachaça.

Estas amostras foram submetidas a amplificações com três diferentes tipos de iniciadores de ISSR. Os resultados mostrados na Figura 8 mostram que de fato cada perfil ITS apresentou um padrão específico de amplificação para os três marcadores. Amostras foram agrupadas então em quatro grupos fenéticos representados pelos perfis de ribotipo: o grupo 1 (500pb), grupo 2 (600pb), grupo 3 (700pb) e grupo 4 (850pb).

Um representante de cada grupo de isolados foi submetido à análise de sequência de nucleotídeos da região D1/D2 do gene 26S-rDNA e estas sequências foram submetidas à análise de alinhamento local (BLAST) no banco de dados genéticos NCBI. Dois isolados do grupo de 500pb, o isolado CPDC2(2) foi identificado como *C. drosophilae* e o isolado CPDC2(5) como *C. ubatubensis*. Os representantes do grupo 600pb, o isolado SAPDC1(13) foi identificado como pertencente à espécie *P. caribbica*, teleomorfo de *C. fermentati* e isolado CPDC2(3) como *P. guilliermondii*. O representante do grupo 700pb, isolado SPDC2(7), foi identificado como pertencente o gênero *Zygosaccharomyces*, isolado CPDC2(4) como *Z. fermentati*. E finalmente, o representante do grupo 850pb, isolado SPDC1(1), foi identificado como pertencente à espécie *S. cerevisiae*. Este último resultado está de acordo com nossos resultados anteriores para o perfil de amplificação de *S. cerevisiae* do locos ITS e para os três marcadores de PCR-fingerprinting (SILVA-FILHO 2003).

DISCUSSÃO

Além de *Saccharomyces cerevisiae* foram isolados também as espécies *Pichia caribbica* teleomorfo de *Candida fermentati*, *Candida milleri*, *C. drosophilae*, *C. ubatubensis*, *C. guilliermondii*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Candida* sp e *Zygosaccharomyces* sp.

Utilizando os primers ITS4 e ITS5 para amplificar a região do rDNA, foi identificado diferentes espécies de leveduras encontradas em alambiques da Zona da Mata no Estado de Pernambuco, assim foio possível confirmar através do iniciador (GTG)₅ a presença de *S. cerevisiae*. Concordando com este trabalho, Xufre et al. (2000) utilizando os mesmos iniciadores para seis espécies do gênero *Saccharomyces*, observaram na amplificação que não houve variações de perfis entre nas linhagens de *S. cerevisiae*. McCullough et al. (1998) por meio de amplificação da região ITS, conseguiram discriminar espécies do gênero *Saccharomyces* e *Candida*, onde *S. cerevisiae*, *S. pasteurinus*, *S. paradoxus*, obtiveram fragmentos de 850pb e espécies de *C. albicans* e *C. clabrata*, obtiveram 520 e 640 pb respectivamente. Vinnere et al. (2002), por meio da região ITS1-5.8s-ITS2 distinguir por meio de fragmentos espécies de *Colletotrichum*.

Na amplificação com ISSR aplicando os iniciadores (GTG)₅, M13 e (GACA)₄ em leveduras dos alambiques Água Doce (1ª e 2ª bateleda), São Sarué e O Mirante da Cachaça foi

possível detectar as diferenças e o agrupamento repetido em cada iniciador da mesma espécie isolada. Silva-Filho (2003), utilizou o iniciador (GTG)₅ observou perfis distintos para cada uma das espécies estudadas, indicando o poder de discriminação interspecífico do iniciador. Cardoso et al (2002) investigaram através dos iniciadores (GAC)₅ e (GTG)₅ o polimorfismo das leveduras *Kloeckera apiculata* e *S. cerevisiae* isoladas do vinho, onde observaram nos resultados a separação das duas espécies apresentando perfis diferentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento à pesquisa CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro ao trabalho.

BIBLIOGRAFIA

Capece A., Salzano G. and Romano P., 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-Saccharomyces wine species. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 33–39.

Caruso, M., Salzano, G., Romano M., 2002. PTyping of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letter in Applied Microbiology*, p. 323-328

Falcão, D., A., 2003. O poder de negociação dos envasadores de cachaça junto aos fornecedores de cachaça: o caso das indústrias do estado de Pernambuco. XXIII Encontro Nac. de Eng. de Produção Ouro Preto, MG.

GUERRA, J.B., et al., 2001 Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.33, p.106-111.

MAIA, A.B.R.A.; PEREIRA, A.J.; SCHWABE, W.K., 1994. 2^o *Curso de Tecnologia para Produção de Aguardente de Qualidade*. Fundação Christiano Ottoni, 74p

McCullough et al., 1998. "Characterization of a novel cis-syn and trans-syn-II pyrimidine dimer glycosylase/AP lyase from a eukaryotic algal virus, *Paramecium bursaria chlorella virus-1*," *J Biol Chem.* May 22,;273(21):13136-42.

MORAIS, P.B., et al., 1997. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.13, p.241-243.

OLIVEIRA, E. S., 2001. *Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da cachaça obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais*. Campinas, 135p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

PATARO, C., et al., 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p.1-9,

RAMOS. N.P. BRUNELLI, K.R. CAMARGO, E.A. J. MARCOS FILHO, M., 2006. Sensibilidade Dos Microsatélites Para Determinar A Pureza Varietal Em Sementes De Milho 1. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 28, nº 1, p.99-105,

SMITH, J.S.C.; REGISTER III, J.C., 1998. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. *Seed Science Research*, Wallingford, v.8, n.2, p.285-293,

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

Silva-Filho, E., A. Santos, S K B. Resende, A. Falca, J. O. Morais, Morais Jr M. A. Simo, D. A., 2005 Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation processes assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:13–23

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

Vinnere O, Fatehi J, Wright SAI, Gerhardson B., 2002 The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. *Mycol Res* 106:60-9

Tabela 1. Tamanho do fragmento da região ITS-rDNA das espécies de leveduras encontradas em três alambiques produtoras de cachaça artesanal no Estado de Pernambuco

ALAMBIQUES	ITS (pb)	ESPÉCIES
ÁGUA DOCE (primeira batelada)	550	<i>Candida</i> sp
	600	<i>Pichia caribbica</i>
	700	<i>Candida milleri</i>
	850	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ÁGUA DOCE (segunda batelada)	600	<i>Pichia caribbica</i>
	850	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SÃO SARUÉ	600	<i>Pichia caribbica</i>
	850	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
O MIRANTE DA CACHAÇA	500	<i>Candida ubatubensis</i>
	500	<i>Candida drosophilae</i>
	600	<i>Pichia caribbica</i>
	600	<i>Pichia guilliermondii</i>
	700	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>
	700	<i>Zygosaccharomyces</i> sp
	850	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

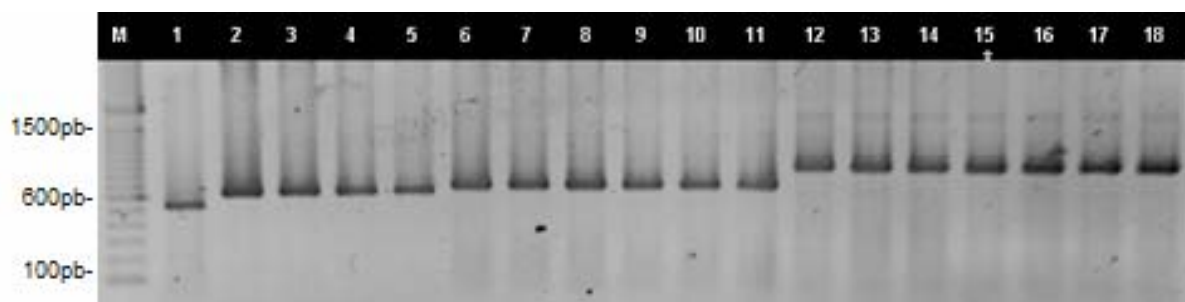
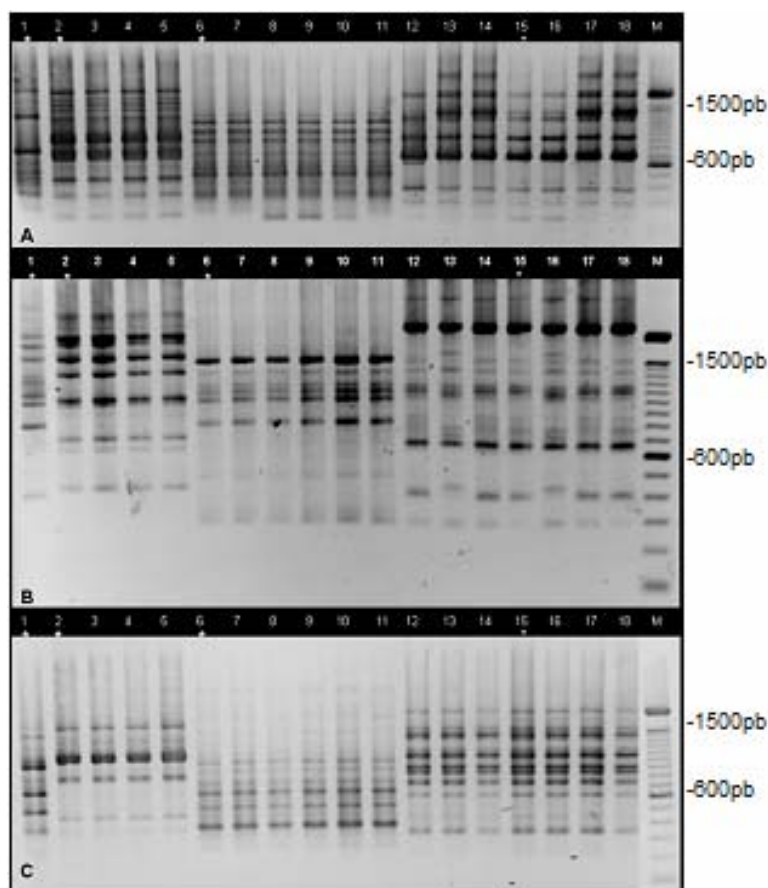


Figura 1. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA dos isolados de leveduras obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas de 1 a 18 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce – Vicência/PE, safra 2005/2006: 1 - SADB1C1(4), 2 - SADB1C1(2), 3 - SADB1C3(20), 4 - CADB1C5(4), 5 - CADB1C6(1), 6 - SADB1C1(8), 7 - CADB1C3(1), 8 - SADB1C4(1), 9 - CADB1C5(1) 10 - SADB1C6(7), 11- SADB1C7(13), 12 - SADB1C1(5), 13 - SADB1C2(1), 14 - SADB1C3(13), 15 - SADB1C4(3), 16 - SADB1C5(1), 17 - SADB1C6(2), 18 - SADB1C7(1).



* Levedura sequenciada

Figura 2. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores $(GACA)_4$ (A), $(GTG)_5$ (B) e M13 (C) das leveduras do Alambique do Engenho Água Doce – Vicência/PE, safra 2005/2006, em gel de agarose. Na pista M, o marcador de peso molecular 100bp; Na pista 1, encontra-se o DNA de *Candida* sp. SADB1C1(4); nas pistas de 2 a 5, encontram-se os DNAs de *Pichia caribbica*: 2. SADB1C1(2), 3. SADB1C3(20), 4. CADB1C5(4) e 5. CADB1C6(1); Nas pistas de 6 a 11, encontram-se os DNAs de *Candida miller*: 6. SADB1C1(8), 7. CADB1C3(1), 8. SADB1C4(1), 9. CADB1C5(1) 10. SADB1C6(7) e 11. SADB1C7(13); Nas pistas de 12 a 18, encontram-se os DNAs de *Saccharomyces cerevisiae*: 12. SADB1C1(5), 13. SADB1C2(1), 14. SADB1C3(13), 15. SADB1C4(3), 16. SADB1C5(1), 17. SADB1C6(2) e 18. SADB1C7(1).

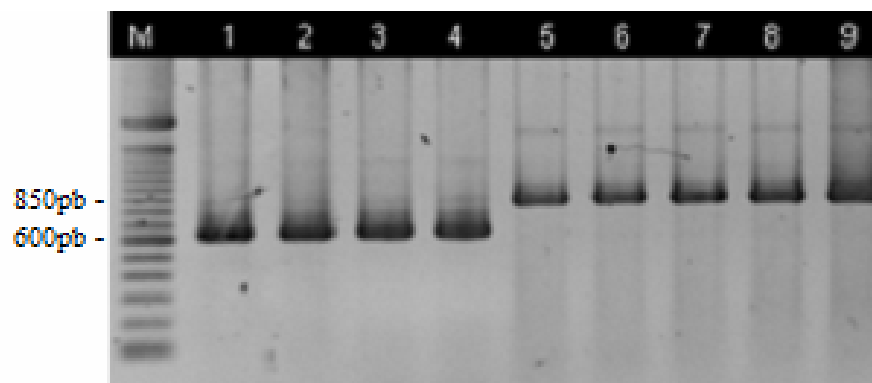
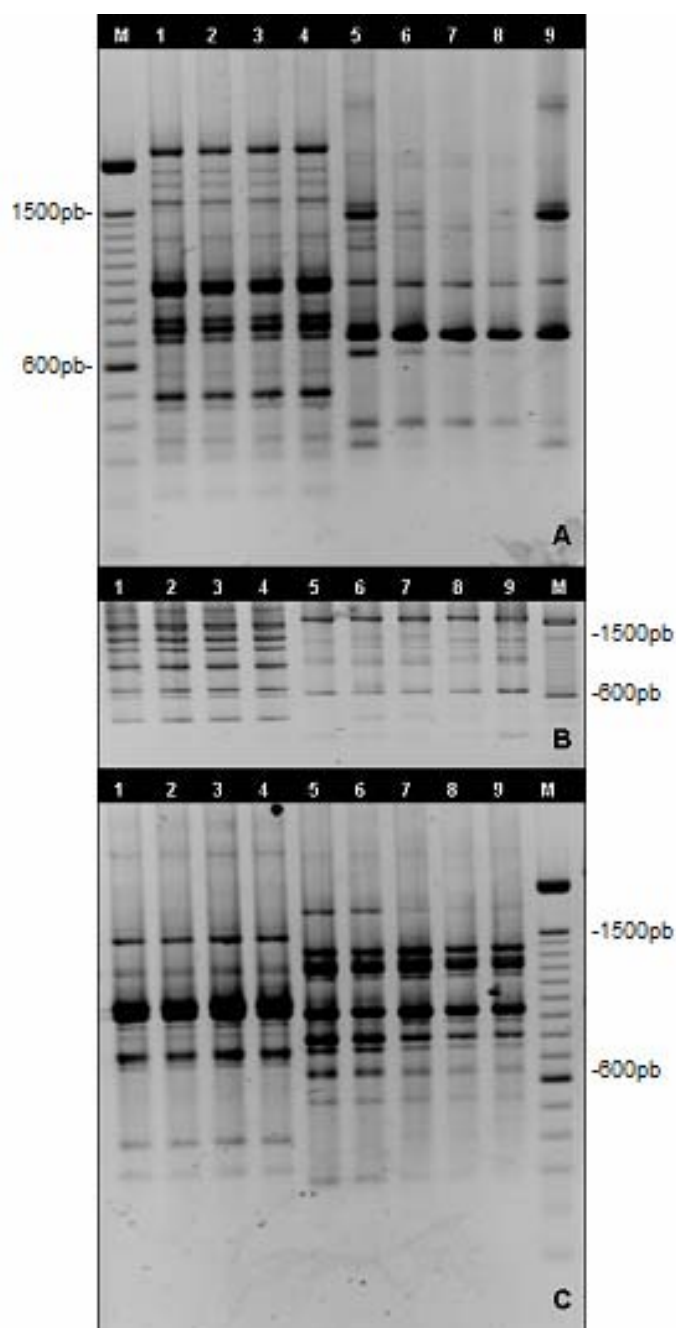


Figura 3. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, encontra-se o marcador de peso molecular 100bp e na pista 5, DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Nas pistas de 1 a 4 e de 6 a 9 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce - Vicência/PE, safra 2006/2007: 1. SADB1(1), 2. SADB2C1(4), 3. SADB2C1(5), 4. SADB2C1(9), 6. SADB2C1(14), 7. SADB2C2(8), 8. SADC2(9), 9. SADC2(11).



* Levedura seqüenciada

Figura 4. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores (GACA)₄ (A), (GTG)₅ (B) e M13 (C). Na pista M, encontra-se o marcador de peso molecular 100bp e na pista 5, DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Nas pistas de 1 a 4 e de 6 a 9 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do Engenho Água Doce - Vicência/PE, safra 2006/2007, em gel de agarose: 1. SADB1(1), 2. SADB2C1(4), 3. SADB2C1(5), 4. SADB2C1(9), 6. SADB2C1(14), 7. SADB2C2(8), 8. SADC2(9), 9. SADC2(11).

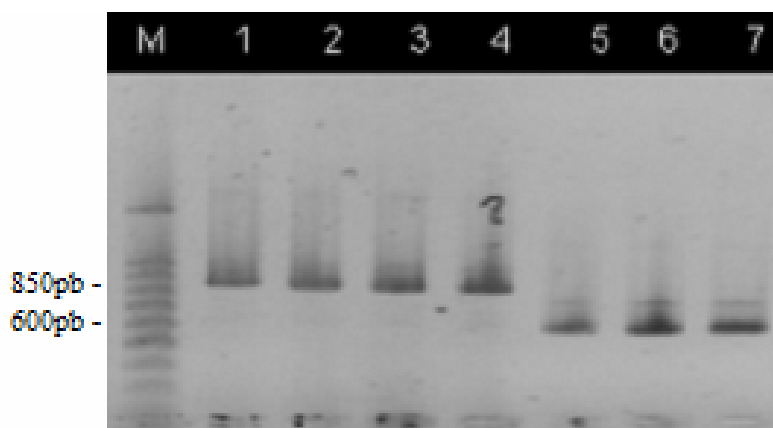
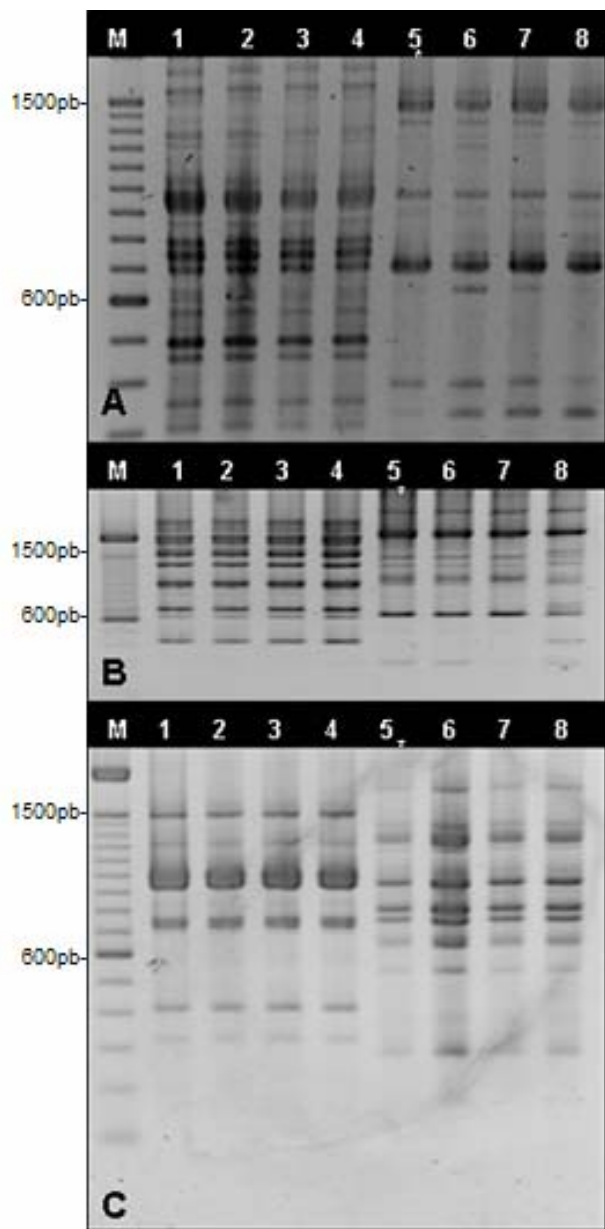


Figura 5. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pista 1, encontra-se o DNA de *Saccharomyces cerevisiae* e nas pistas de 2 a 7 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique do São Sarué. 1. CAIB1(1), 2. CAIB1(8), 3. CAIBIC2(13), 4. CAIB1C3(21), 5. SAIB1C1(41), 6. (SAIB1C2(51), 7. SAIB1C3(61).



* Levedura sequenciada

Figura 6. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores $(GACA)_4$ (**A**), $(GTG)_5$ (**B**) e M13 (**C**) das leveduras do Alambique Alambique São Saruê - Igarassu/PE, da safra 2005/2006, em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas 1 a 4 os DNAs dos isolados: 1. CAIB1(1), 2. CAIB1(8), 3. CAIB1C2(13), 4. CAIB1C3(21), 5. SAIB1C1(41), 6. (SAIB1C2(51), 7. SAIB1C3(61), 8. SAIB1C4(67).

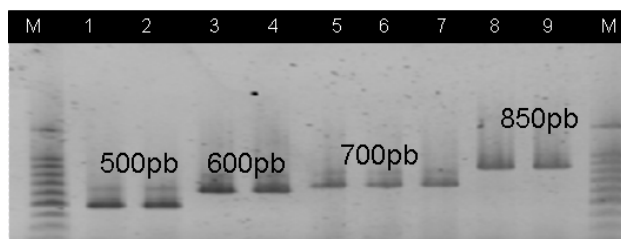
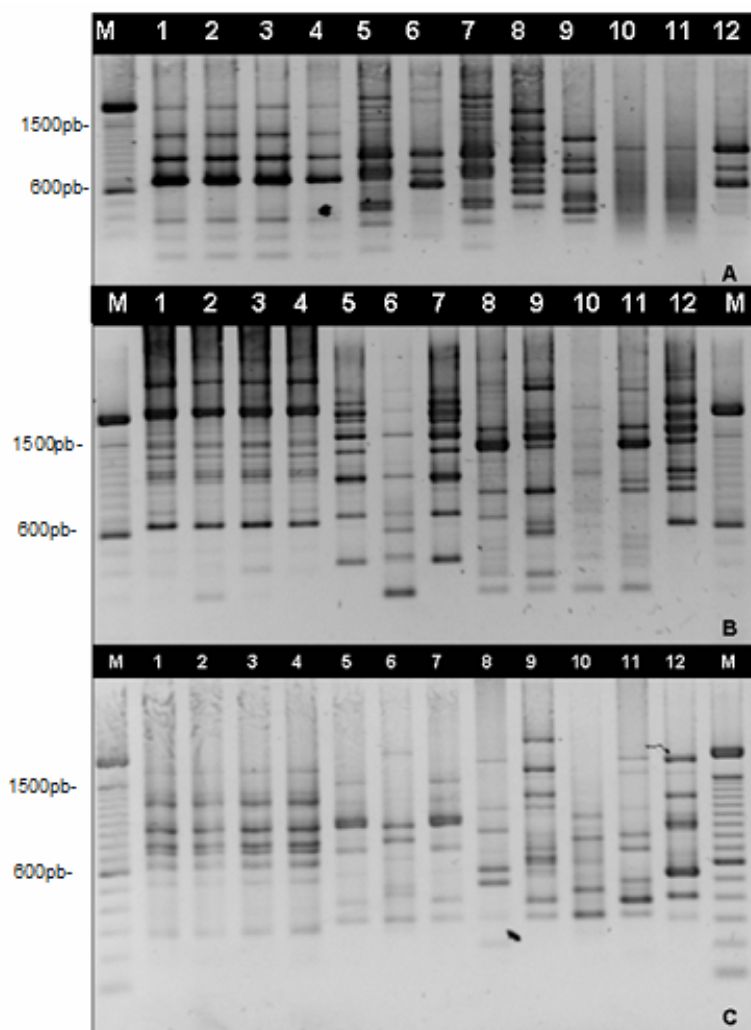


Figura 7. Perfis de amplificação da região ITS do rDNA obtidos com os iniciadores ITS4 e ITS5, em gel de agarose. Na pista M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas de 1 a 8 encontram-se os DNAs das leveduras da cachaça do Alambique O Mirante da Cachaça – Paudalho/PE, safra 2005/2006: **1.** CPDC2(5) (*Candida ubatubensis*), **2.** CPDC2(2) (*Candida drosophilae*), **3.** SPDC1(13) (*Pichia caribbica*), **4.** CPDC2(3) (*Pichia guilliermondii*), **5.** SPDC2(7) (*Zygosaccharomyces* sp), **6.** CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), **7.** CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), **8.** (NOME ISOLADO) *Sacharomyces cerevisiae*. **9.** (NOME ISOLADO) *Sacharomyces cerevisiae*.



* Levedura seqüenciada

Figura 8. Perfis de amplificação de ISSR com os iniciadores $(GACA)_4$ (A), $(GTG)_5$ (B) e M13 (C) das leveduras do Alambique do Mirante da Cachaça – Paudalho/PE, da safra 2005/2006, em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp. Nas pistas 1 a 5 encontram-se os DNAs de *Saccharomyces cerevisiae* (ITS/850pb): 1. SPDC1(1), 2. SPDC1(2), 3. SPDC2(1), 4. SAQPDC2(2), 5. SPDC1(13) (*Pichia caribbica*), 6. SPDC2(7) (*Zygosaccharomyces* sp), 7. SPDC2(11) (*Pichia caribbica*), 8. CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), 9. CPDC2(2) (*Candida drosophilae*), 10. CPDC2(3) (*Pichia guilliermondii*), 11. CPDC2(4) (*Zygosaccharomyces fermentati*), 12. CPDC2(5) (*Candida ubatubensis*).

5.3 METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Artigo a ser submetido para a revista International Journal of Food Microbiology

Meiriana Xavier Vila Nova

Departamento de Genética, UFPE.

Email meirianan@bol.com.br

Marcos Antonio Moraes Junior

Departamento de Genética, UFPE

marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro

CCBS, UNICAP

bereneuza@unicap.br

METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA NO ESTADO DE PERNAMBUCO

RESUMO

Foi avaliada a produção de metabólitos secundários de interesse para a qualidade organoléptica da cachaça a partir de culturas puras das leveduras isoladas e identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida drosophilae*, *C. milleri*, *C. ubatubensis*, *Pichia caribbica*, *P. guilliermondii*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Zygosaccharomyces sp* e *Candida sp*. As células foram cultivadas em meio YPD, coletadas e reinoculadas em meio de caldo de cana filtrado para concentração final de células de 10% (m/v). Os inóculos foram incubados até o final da fermentação, indicado pela parada na produção de CO₂ e os metabólitos presentes nos sobrenadantes foram determinado por cromatografia gasosa. As linhagens isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros fermentativos de rendimento da fermentação e na formação dos principais compostos voláteis. Não foi observada a produção de metanol nos ensaios fermentativos. Entretanto, alguns problemas foram evidenciados. Por exemplo, os isolados de *P. guilliermondii* produziram acetaldeído e álcool n-propílico nas faixas de 50 mg/L e 35 mg/L, respectivamente. Estes valores estão acima do recomendado para a produção de cachaça. Portanto, a presença dessas células no processo fermentativo pode comprometer a produção do alambique, reforçando a necessidade de controle microbiológico do processo.

Palavras chave: fermentação alcoólica, metabólitos secundários, *Saccharomyces cerevisiae*, cachaça.

INTRODUÇÃO

A cachaça, bebida tipicamente brasileira, vem conquistando parcela crescente do mercado internacional de bebidas destiladas por ser considerada exótica e de sabor especial. (TRINDADE, 2006). A cachaça artesanal é considerada um produto de maior qualidade pelos apreciadores da bebida, quando comparada com a cachaça industrial, mas ocupa um espaço que ainda não chega a 20% da produção total da bebida no Brasil (SEBRAE, 2001).

A produção de cachaça no país destina-se quase totalmente ao mercado interno; contudo, a bebida vem conquistando novos mercados. Em 2002, foram exportados 14,8 milhões de litros (1% da produção) para 70 países. (VASCONCELOS, 2003). Os maiores produtores no Brasil são, Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo (CARDELLO & FARIAS, 1998). Em Pernambuco a relação com a cachaça é muito forte, além de possuir alambiques artesanais há fabricas que distribui em todo Norte e Nordeste e exporta para diversos países.

Há também programas de cooperação e parcerias com produção locais da cana-de-açúcar (Camara, 2004).

O processo para fabricação de cachaça de alambique constitui-se do preparado do inóculo, chamado também pé-de-cuba, onde basicamente os microrganismos são multiplicados em condições apropriadas, para garantir o desenvolvimento adequado, que corresponde à conversão de açúcar em álcool e gás carbônico, fase que é chamada fermentação (PATARO et al., 2002).

Espécies de leveduras apresentam propriedades fisiológicas diferentes, levando à variação no produto final da fermentação. Dentre as propriedades fisiológicas de importância neste processo podemos citar o rendimento de fermentação e metabólitos secundários (ANTONINI & PIRAZZY, 2000). A fermentação alcoólica pode ser influenciada por diversos fatores, tais como o microrganismo utilizado, o tamanho do inóculo, o tipo de substrato, temperatura, pH e fatores genéticos de cada microrganismo (SOUZA, 1994). O acompanhamento da dinâmica de populações de leveduras em processos fermentativos artesanais podem trazer valiosas informações com relação à seleção de leveduras nativas com alto potencial fermentativo, à adequação do processo às necessidades fermentativas e correções de condutas operacionais inadequadas, os quais podem resultar em ganhos de rendimento e produtividade (Alves et al., 2005).

O processo artesanal, carece de procedimentos tecnológicos mais refinados que tornem o produto competitivo no mercado, tanto em termos de produtividade quanto em qualidade. Essas características estão diretamente relacionadas com a qualidade da população de leveduras envolvidas no processo fermentativo da cachaça. A análise desta população poderá fornecer subsídios para a identificação de linhagens específicas para os diferentes alambiques, as quais deverão unir o maior rendimento com a produção de metabólitos que qualificam o produto em termos de aroma e sabor (Camara, 2004).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras do processo fermentativo de alambiques artesanais na zona da mata de Pernambuco que utilizam três métodos de produção distintos e relacionar aos metabólitos secundários produzidos por essas leveduras.

MATERIAL E METODOS

Coletas das amostras e plaqueamento do mosto fermentado de cana-de-açúcar

As coletas para o acompanhamento das populações de leveduras produtoras de cachaça artesanal do processo fermentativo ocorreram nos Alambiques do Mirante da Cachaça - Paudalho/PE, São Saruê - Igarassu/PE e Engenho Água Doce - Vicência/PE. As amostras foram obtidas através de coletas de 30mL de mosto fermentado colhidas diretamente da dorna do pré-fermentador do processo de batelada.

Foram realizados dois tipos de plaqueamento, um contendo o meio WLN sem actidione (ciclohexamida) e o outro meio WLN com actidione na concentração final de 5µg/mL para quantificar leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os meios contendo o corante verde de bromocresol, os antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico na concentração final de 50µg/mL para quantificar leveduras totais e inibir o crescimento bacteriano. O mosto foi diluído em solução salina 0,85% até 1:10⁷ e 0,1mL das diluições 1:10⁷ foram plaqueados em duplicata, de forma a se obter aproximadamente 10 a 20 colônias de leveduras por placa. A incubação foi realizada a 30°C por sete dias. As colônias formadas foram caracterizadas morfológicamente quanto ao bordo, superfície, consistência, tamanho e cor.

Amostras das colônias foram suspensas em 1mL de salina 0,85% e semeadas por estrias em meio WLN por no mínimo duas vezes para confirmação da pureza das culturas. As culturas puras foram mantidas em tubo com meio WLN sem corante, sob óleo mineral esterilizado.

Descrição das coletas e do alambique Engenho Água Doce

As coletas do alambique Água Doce (Vicência PE), primeira batelada, foram realizadas durante o período de sete dias, no mês de outubro de 2005, nos intervalos de zero hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas e 144 horas. Na segunda batelada, as coletas foram realizadas durante o período de dois dias, no mês de março de 2006, nos intervalos de zero hora e 24 horas com fermento reutilizado. O fermento utilizado no Engenho Água Doce é preparado com grãos triturados (milho 30kg, soja 5kg, arroz 10kg) e adicionado por sete dias, a cada 24 horas, 100L de caldo-de-cana com diferentes concentrações de Brix (6; 8; 10; 12; 14 e no sexto e sétimo dia em torno de 15). Sendo o mesmo reutilizado depois de sete dias de fermentação, por três meses. Depois dos sete dias de fermentação, retira todo material fermentado para destilar, este fermento natural permanece no pé de cuba e é utilizado para novas fermentações, as quais são realizadas em 24 ou 48 horas, assim que o Brix chega a zero. Foi assim que foi feita a coleta da segunda batelada (Figura 1).

Descrição das coletas e do alambique São Sarué

No alambique São Sarué (Igarassu – PE), as coletas foram realizadas em zero hora, uma hora, 24 horas e 48 horas, quando o brix chegou a zero. O fermento é comercial e é utilizado caldo de cana diluído Brix 16.

Descrição das coletas e do alambique Mirante da Cachaça

Alambique o Mirante da Cachaça (Paudalho – PE), as coletas foram realizadas em zero, 24 e 48 horas, o material para fermentação tem o mesmo procedimento do alambique São Sarué (Figura 3).

Sequenciamento de DNA

Para a amplificação dos domínios divergentes D1/D2 da subunidade 26S do rDNA foram utilizados, tampão de PCR 10X, BSA (Soro albumina bovina) 0,25µg/µL, dNTP 2,0 mM, iniciador NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 10,0pmol/µL, iniciador NL-4 (5'-GGT3.3.2 CCGTGTTCACAGACGG-3') 10,0pmol/µL, MgCl₂ 50mM, Taq DNA polimerase 5U/µL e DNA 50ng/µL, como descrito por O'Donnel, (1993), utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE.

A reação de amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, com um ciclo de extensão final a 72°C durante cinco minutos.

A eletroforese dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose a 1,3% em tampão TBE 0,5X, durante 40 minutos. O produto diretamente da amplificação foi purificado com o Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega). A eletroforese dos fragmentos purificados foi feita em gel de agarose a 1,3% com TBE 0,5X por 90 minutos, juntamente com o marcador λ DNA/HindIII. Os fragmentos foram corados em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 µg/mL - SAMBROOK et al., 1989), visualizados em transiluminador de luz U.V. e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart. Os domínios D1/D2 da região 26S de rDNA das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* foram seqüenciados no Laboratório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando o BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para a identificação de cada isolado foi feito um BLAST nucleotídeo a nucleotídeo. As seqüências destas leveduras foram comparadas com as

seqüências D1/D2 de fungos e leveduras disponíveis no Genbank.(
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>- National Center for Biotechnology Information)

Ensaio Fermentativo

Para cada ensaio foi necessário obter caldo de cana fresco, ou seja, moído no mesmo dia. O caldo foi filtrado em papel de filtro e a este foram adicionados os antibióticos ampicilina (50µg/mL) e ácido nalidíxico (100µg/mL), com o pH de 5.0, para minimizar a contaminação bacteriana. O caldo de cana filtrado foi diluído com água destilada autoclavada a fim de padronizar a concentração inicial de açúcar em torno de 160g/L. O valor de referência utilizado para determinar a diluição foi o observado na escala do refratômetro. Para isso, admitiu-se que o valor observado corresponde à porcentagem de açúcar presente no meio, por exemplo, o valor 24 corresponde a 240g/L de açúcar.

Inicialmente foi feito um inóculo das células em meio YPD, para o crescimento das células procurando obter cerca de 10% de células para inocular no meio de fermentação. Depois das células crescidas no meio YPD em placa de Petri durante 16 horas, foram raspadas com uma lamina estéril e centrifugadas com água destilada autoclavada, obtendo 10g de células o equivalente a 10% do volume de meio utilizado para fermentação já que a fermentação foi realizada em 100mL do meio de caldo de cana.. Assim tivemos o domínio ecológico de células sobre as que já existem no caldo de cana.

A fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 250mL com 100mL do meio de caldo de cana padronizado em 160g/L, incubados a 32°C em anaerobiose e observados os seus pesos em alguns momentos da fermentação, pois estava sendo liberado dióxido de carbono, quando não houve mais variação de peso, significava que a fermentação chegou ao fim.

Determinação de Glicerol

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

A concentração de glicerol em g/L foi obtida multiplicando-se a DO pela diluição da amostra (quando houve) e pelo fator da curva de calibração.

Determinação do °Brix e Açúcares Redutores Totais (ART)

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

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

Determinação dos Metabólicos Secundários da Fermentação Alcoólica

A composição dos metabólitos produzidos nas amostras de mosto fermentado nos alambiques de Engenho Água Doce, O Mirante da Cachaça e São Saruê foram determinados por cromatografia gasosa no Laboratório Analítico do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco. Após calibração do equipamento, 1µL do mosto fermentado centrifugado foi injetado para análise do teor alcoólico.

Cromatografia Gasosa

O cromatografo utilizado foi GC 1000 e os compostos foram detectados em coluna, CG745(30mx0,54MM), utilizando a temperatura de vapor a 150°C. Programação de temperatura inicial de 50 °C a 8 minutos final de 80 °C a 5 minutos. Volume inicial de 2µL.

RESULTADOS

Segundo Gobo (2006) os requisitos de qualidade e composição química para cachaça no Brasil fixados pela instrução normativa número 13 de 29 de junho de 2005, são: a) somatório de componentes secundários produzidos a partir do metabolismo secundário das leveduras que fazem a fermentação das bebidas alcoólicas, b) aldeídos (em acetaldeído), c) ésteres totais (acetato de etila), d) álcoois superiores (n-propílico, iso-butílico e isoamílico).

A Figura 5 mostra o resultado da concentração destes referidos subprodutos de fermentação alcoólica produzidas por sete espécies de leveduras isoladas de três alambiques da zona da mata do Estado de Pernambuco.

Não foram detectadas concentrações significantes dos álcoois n-metílico e n-butílico. Os isolados das *C. ubatubensis*, *P. guilliermondii*, *C. miller*, *P. caribbica*, *S. cerevisiae* e *C. drosophilae* não produziram álcool n-amilíco em quantidade significativa (Figura 5D).

Segundo Gobo (2006) aldeídos formados com até oito átomos de carbono tem aromas penetrantes, geralmente enjoativos, sendo indesejáveis para os produtores. Neste trabalho o acetaldeído foi produzido em maior quantidade por *Z. fermentati* com cerca de 5,22mg/100mL e menor por *S. cerevisiae* com 0,37mg/100mL (Figura 18A).

Acetona (Figura 5B) foi pouco produzida por todas as espécies, porém a espécie *C. ubatubensis* foi a espécie que menos produziu.

Para a produção de álcool iso-amilíco (Figura 5C), os maiores produtores foram *P. caribbica* e *Z. fermentati*, com aproximadamente 8,5 e 4,54mg/100mL, respectivamente. Segundo Benítez t & Isabel (1986), a espécie *Z. fermentati* não é boa produtora de álcoois.

Apresentaram a maior produção de álcool iso-butílico (Figura 5E) os isolados *P. guilliermondii* e *P. caribbica*, com cerca de 6,87 e 5,99mg/100mL, respectivamente, e a menor produção por *C. ubatubensis* com 0,55 mg/100mL.

O n-propílico (Figura 5F) foi produzido de forma significativa e semelhante por todas as espécies, exceto *P. guilliermondii* e *C. drosophilae* não produziram. Cleto (1997) verificou que a adição de fubá de milho no processo fermentativo, prática comum nos alambiques artesanais, reduz a concentração de n-propanol. Esse fato esta deacordo com o presente trabalho, pois as espécies *C. miller*, *P. caribbica* e *S. cerevisiae* isoladas do alambique Água Doce, produzem o fermento apartir da farinha do milho, a espécie *P. guilliermondii* foi isolada do alambique O Miirante da Cachaça, o qual usa caldo de cana, água para atingir o brix de 16 e fermento de pão. Giudici et al. (1973) verificaram que a produção de álcool n-propílico esta relacionada ao

metabolismo de metionina e treonina ambos aminoácidos; e esses são reguladores das rotas metabólicas de compostos sulfurados.

O acetato de etila corresponde a cerca de 80% de conteúdo total de ésteres da aguardente (GOBO, 2006), por isso teores baixos destes compostos são sempre desejáveis em bebidas alcoólicas (MAIA et al., 1991). Neste trabalho todas as espécies apresentaram uma baixa produção e as espécies *C. ubatubensis* e *Z. fermentati* apresentaram a mesma quantidade com 0,63mg/100mL (Figura 5G).

Com relação ao teor de etanol, todas as espécies obtiveram resultados satisfatórios, pois todas as espécies produziram etanol. Segundo Gobo et al (2006) durante a fermentação da cachaça ocorre o desdobramento dos açúcares do caldo-de-cana com a formação do álcool etílico e dióxido de carbono.

A Figura 6A mostra o consumo do ART, onde podemos observar a absorção de cada espécie, em gramas por litro (g/L). A espécie *P. guilermundii* e *C. drosophilae* *Candida sp* *Zygosaccharomyces sp* foram as que absorveram açúcar em menor quantidade, em torno de 0,87 a 0,70 g/L. As demais espécies obtiveram a mesma concentração, abaixo de 0,2g/L. Grande parte do açúcar residual é utilizada no metabolismo das células para produção do etanol, havendo o teor de açúcar residual pequeno, indica o esgotamento do substrato em todas as espécies.

A Figura 6B mostra o gráfico estressando a quantidade de glicerol produzida em gramas por litro (g/L) das espécies de leveduras isoladas e identificadas através do sequenciamento. Podemos observar que os isolados de *C. drosophilae*, *C. ubatubensis*, *Candida sp* e *Zygosaccharomyces sp* produziram glicerol em menor quantidade em relação às demais espécies, com 1,50 e 0,9g/L, respectivamente. *Z. fermentati*, *P. guilermundii*, *P. caribbica* e *S. cerevisiae*, produziram em maior quantidade o glicerol com 3,1; 2,3; 3,0; 4,0 e 4,2g/L, respectivamente..

DISCUSSÃO

As linhagens isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros fermentativos de rendimento da fermentação e na formação dos principais compostos voláteis. Não foi observada a produção de álcool metílico e n-butilico nos ensaios fermentativos por nenhuma linhagem. Miranda et al.

(1992), que encontraram níveis de metanol acima do permitido por lei em cinco amostras de aguardente proveniente do Estado da Bahia. O metanol é formado principalmente quando não tem o cuidado de separar por filtração, os fragmentos da cana-de-açúcar originados no momento da moagem ou passagem pela prensa. Esses fragmentos são ricos em substâncias pécnicas com unidades metóxicas liberadas pelas enzimas das leveduras fermentativas (CLERO, 1997).

Em Guterrez (1993) observou que leveduras aplicadas em fermentação com aumento do pH no meio, reduz a produção de álcoois principalmente álcoois superiores, no presente trabalho as leveduras foram fermentadas em pH 5,0, portanto não foi utilizado o pH elevado.

Entretanto, alguns problemas foram evidenciados. O álcool iso-butílico, foi formado significativamente pelas espécies *P. guilhermondii* e *C. caribbica* (Figura 5E) e o álcool n-propílico teve uma boa concentração na espécie *P. guilhermondii* e foi pouco produzido na espécie *P. caribbica*, esses resultados não concordam com Daudat e Hough (1975) quando verificaram através da fermentação que a redução dos álcoois n-propílico e iso-butílico ao mesmo tempo. Contrasta com os resultados de Rankine (1967), que verificou o decréscimo de álcool n-propílico e aumento de álcool iso-butílico em temperatura e pH mais elevados, ou seja, acima do pH 5 o qual foi utilizado na fermentação desse trabalho. O n-propílico foi pouco produzido por *Zygosaccharomyces* sp, *Candida* sp, e *C. drosophilae*. Boza e Horii (1998) relatam que a produção de n-propílico esta diretamente relacionada com a concentração de açúcar no meio, pH, fonte de nitrogênio, pelo grau de aeração e principalmente pelas espécies e linhagens de leveduras. Concordando nesse aspecto com esse trabalho, pois só a *P. guilhermondii* produziu bem o n-propílico, apesar de todas as espécies receberem as mesmas condições de fermentação.

O álcool n-amílico só foi produzido significativamente por *Z. fermentati* e *S. cerevisiae* (Figura 5B), não concordando com Pereira et al. (2003), pois relatam que a fermentação em anaerobiose promove a boa produção de todos os álcoois superiores.

O acetaldeído não foi produzido pela espécie de *S. cerevisiae* e apresentou maior concentração pelas espécie *P. guilhermondii* e *Z. fermentati*. Esses resultados são de grande relevância para o trabalho, pois o acetaldeído quando produzido em grande quantidade pode apresentar modificações indesejáveis sobre o aroma da cachaça e também provoca para o consumidor náuseas, vômitos, cefaléia, decréscimo de pressão cardíaca e taquicardia (GOBO, 2006).

O acetato de etila só foi produzido significativamente por *C. ubatubensis* e *Z. fermentati*. Segundo Maia et al. (1994) o acetato de etila corresponde à cerca de 80% do conteúdo total de ésteres da aguardente, participa de qualidade negativa no produto final.

A acetona foi produzida por todas as espécies de leveduras porém as que mais produziram foram *Candida millerii*, *Zygosacharomyces sp*, *Candida sp*, *C. drosophilae*. Segundo Cleto (1997), a acetona produzida em grande quantidade prejudica o produto final, provocando odor desagradável.

O etanol é um dos principais álcoois da fermentação e o composto necessário na produção da cachaça (Daudat & Hough, 1975). No presente trabalho, a produção de etanol foi observada de forma significativa, para todas as espécies utilizando na fermentação o brix de 16. Esses resultados concordam com Boza e Horii (1998), pois utilizam o brix em torno de 16 para produção de cachaça e obtiveram em todas as destilarias analisadas por eles bom percentual de produção do etanol.

Segundo Maia et al (1994) o consumo de ART na fermentação esta relacionada com a produção de metabolitos e etanol. Há leveduras de grande eficiência que tem menor produção de etanol e menor consumo de açúcar no meio, devido ao desvio de açúcar para a formação de material celular. No presente trabalho as espécies *P guilhermondii*, *Z. fermentat e*, *S.cerevisiae* foram as que produziram maior concentração de etanol.

O glicerol é um composto produzido que está diretamente relacionado com o crescimento celular e aeração da fermentação (Walker, 1998) e tem importância na composição do “bouquet” e textura das bebidas destiladas. No presente trabalho, todas as leveduras produziram bem o glicerol com exceção da espécie *C. drosophilae* *Zygoscharomyces sp* e *Candida sp*. Dependendo das condições de fermentação cerca de quatro a 10% de carbono pode ser convertido em glicerol (Costenoble et al, 2000). A síntese de glicerol é diretamente proporcional a concentração do substrato no mosto em condições de pH inicial 5,0, havendo menor produção de glicerol. Costenoble et al (2000) relata que em elevada temperatura há o aumento de 0,25 a 0,60% na produção de glicerol. Ferreira, (2002), afirma que a síntese de glicerol pode ser reduzida pela baixa concentração de oxigênio. Essa afirmação concorda com o presente resultado, pois a fermentação foi realizada sem aeração.

Na figura 4 mostra as concentrações de produtos secundários, representados nas diversas coletas de cada alambique. Pode-se observar que as concentrações variam em cada

coleta, e que os metabolitos presentes foram os mesmo que apareceram na fermentação de laboratório, só que de forma alterada.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento à pesquisa CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro ao trabalho.

BIBLIOGRAFIA

Antoni, S.R.C & Parazzi, C., 2000. Monitoramento microbiológico Fermentação etanólico. *Jornal Cana*. Araras v 4. 25-26,

Alves, J.G.L.F.; Stroppa, C.T.; Pulzatto, M.E.; Luna, H.G.S.; Oliveira, E.S.; Abreu-lima, T.L., 2005. Desenvolvimento de equipamentos para Otimização da produção e melhoria da qualidade da cachaça artesanal. Relatório parcial de resultados obtidos à FAPEMIG, , processo nº CAG-678/04. UFMG/ Faculdade de Farmácia, UNI-BH/ Departamento de Ciências Exatas e Tecnologia

Benítez T & Isabel, L., 1986. Intergeneric Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* Obtained by Protoplast Fusion. *Applied and environmental Microbiology*, maio, p. 995-1003.

Boza, Y.; Horii, J., 1998. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana de açúcar. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. v. 18, n. 4, p. 391-396,

Câmara, M., 2004. *Cachaça Prazer Brasileiro*. Rio de Janeiro: Mauad.

Cardello, H.M.A.B.; Faria, J.B. 1998. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus Alba* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.169-175.

Cleto.F.V. G., 1997. Influência da adição de ácido sulfúrico e de fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição do aguardente de cana. Jaboticabal, 1997, 109 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”

Costenoble, R.; Valadi, H.; Gustafsson, L.; Niklasson, C. E Franzén, C.J., 2000. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.16, p.1483-1495.

Daudt, C.E.; Hough, C.S., 1975. Efeitos da variedade de microorganismos, temperatura, SO₂ e de álcoois superiores. *Revista Brasileira de Tecnologia*, São Paulo, v.6, n.4, p.301-305,

Ferreira, Vascos Ferreira., 2002 Estudo da fermentação alcoólica em fracos agitados. Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos. Campinas – UNICAMP, 266p.

Gobo, A.B; Boguz,S.J;Ketzer, C M; Gubert, R; Andrade,L. ,2006. Composição química da cachaça produzida na Região Noroeste Do Rio Grande do sul, Brasil. Ciências tecnológicasAlimentar. Campinas, 26(4): 793-798

Giudici,p.;Zambonrlli,.;Kunkee, R.E. Increased production of n propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. Am. J. enol.vitic. davis. V. 30 n. 4, p. 301-305, 1973

Gutierrez, L.;E., 1993. Produção de alcoois superiores por linhagens de *Saxxharomyces* durante a fermentação alcoólica. Sci Agri., Piracicaba, 50(3): 464-472.

Maia. A.B.R.A.; Nelson,D., 1991. Fermentação alcoólica semicontinua destinada a produção de aguardente. Biologia Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia e Alimentos. Campinas. V. 25 n.1. p. 33-36.

Maia, A. B. et al., 1994. Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade. Ed. Escola de Engenharia da UFMG e Fundação Cristiano Otoni. 65p.

Miranda,M.P.;Dantas,V.P.;DEL Corral, F. S. D., 1991.Graus alcoólico e níveis de metanol em aguardentes do comercio (Estado da Bahia). Biologia Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos . campinas. V.26.n.2 p. 104-107.

Pataro, C., et al., 2002Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the artisanal Brazilian cachaça. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, p.202-208,.

Pereira, N. E.; Cardoso, M. G.; Azevedo, S.M.; Moraes, A R.; Fernandes, W.; Aguiar, P. M., 2003Compostos secundários em cachasa produzidas no estado de minas gerais. Ciências Agrotec. Larvas. V 27 n. 5. p 1068-1075.

Rankine, B.C., 1967.Formation of higher alcohols by wine yeasts relationship to taste thresholds. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, v.18, p.583-589,

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. <http://asn.interjornal.com.br/noticia.kmf?noticia=6015385&canal=288>

Souza, C.M., 1994Caracterização das amostrass de *Saccaromyces* Neyerex Reess (1838) estocadas na micoteca –URM, quanto a fermentação e Floclulação.1994. 87f. Dissertação. (Mestrado em Biologia de Fungos) Universidade Federal de Pernambuco,.

Trindade. A G., 2006. Cachaça um amor brasileiro.Ed Melhoramento Ltda.166p.

Vasconcelos, Y., 2003.Cachaça sem mistério. *Rev. Pesquisa Fapesp*, v. 87, p.74-77,

Walker, G.M. ., 1998 Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons Publishers. London, UK. 250P.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>- National Center for Biotechnology Information)

Tabela 1. Espécies de leveduras encontradas nos alambiques produtores de cachaça artesanal no Estado de Pernambuco.

ALAMBIQUES	ESPÉCIES
ÁGUA DOCE (primeira batelada)	<i>Candida</i> sp
	<i>Pichia caribbica</i>
	<i>Candida milleri</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ÁGUA DOCE (segunda batelada)	<i>Pichia caribbica</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SÃO SARUÉ	<i>Pichia caribbica</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
O MIRANTE DA CACHAÇA	<i>Candida ubatubensis</i>
	<i>Candida drosophilae</i>
	<i>Pichia caribbica</i>
	<i>Pichia guilliermondii</i>
	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>
	<i>Zygosaccharomyces</i> sp
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabela 2. Cálculo da concentração de subprodutos de fermentação alcoólica por cromatografia a gás. Onde Cp = Concentração do padrão (mg/100 mL), Ap = Área do padrão, F = Fator de resposta, Aa = Área da amostra, Ca = Concentração da amostra (mg/100 mL). Fator de correção é 1

Analito	Cp	Ap	F
Acetaldeído	0,74	4580	1,62E-04
Acetona	0,36	4264	8,44E-05
Acetato de etila	0,97	8740	1,11E-04
Álcool metílico	0,72	4904	1,47E-04
Álcool n-propílico	0,97	12198	7,95E-05
Álcool iso-butílico	0,60	10460	5,74E-05
Álcool n-butílico	0,24	3923	6,12E-05
Álcool iso-amílico	0,60	10621	5,65E-05
Álcool n-amílico	0,24	4384	5,47E-05



Figura 1. Alambique do Engenho Água Doce - Vicência/PE: **A)** Começo da fermentação; **B)** Fim da fermentação; **C)** Engenho de moer cana; **D)** Dorna de cobre de fermentação; **E)** Destilador; **F)** Alambique; **G)** Produto final da Cachaça.



Figura 2. Alambique São Sarué - Igarassu/PE: **A)** Engenho de moer cana; **B)** Dorna metálica de fermentação; **C)** Fermento de corte; **D)** Barris de carvalho para envelhecimento da cachaça.



Figura 3. Alambique do Mirante da Cachaça – Paudalho/PE: **A)** Engenho de moer cana; **B)** Dornas de ferro de fermentação e destilador de ferro; **C)** Dorna de ferro; **D)** Fim da fermentação.

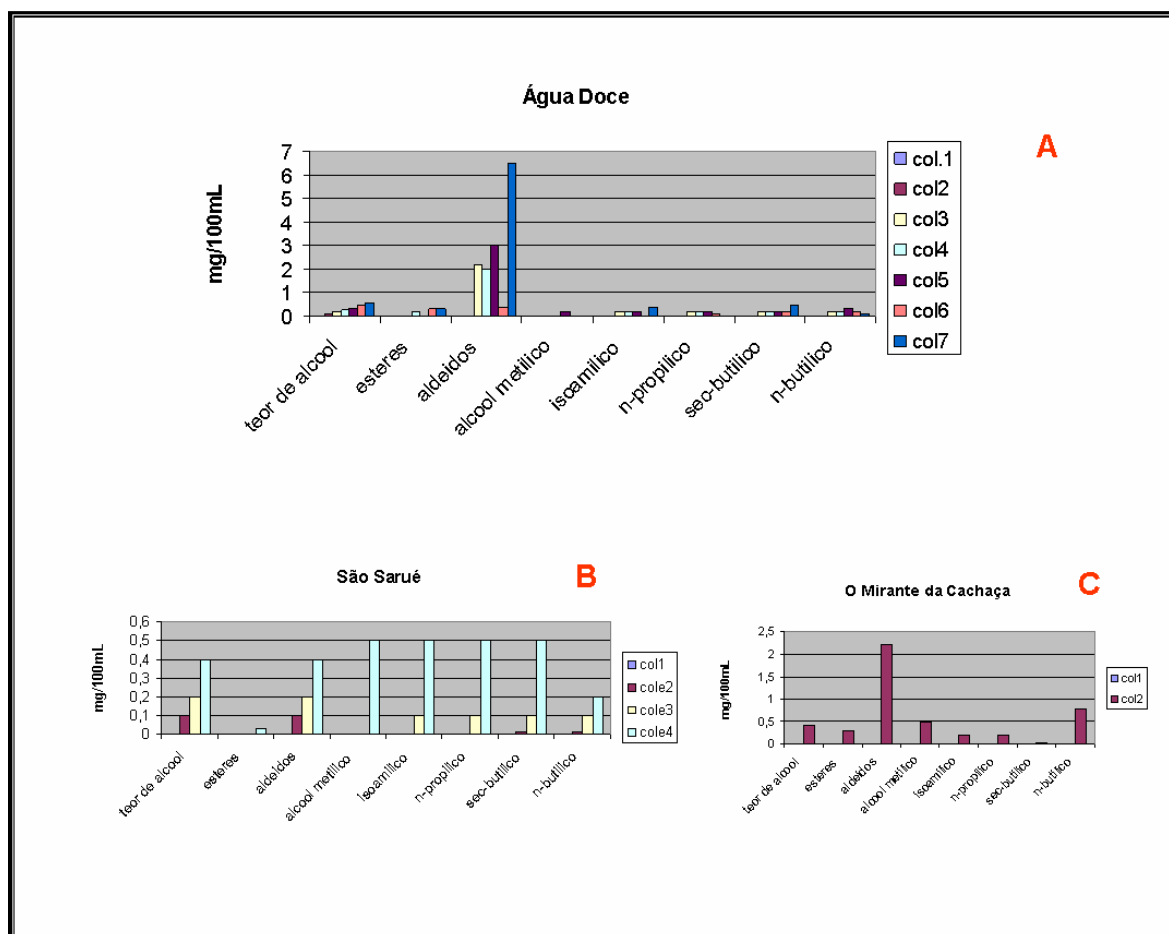


Figura 4. Concentração de metabólitos secundários de fermentação alcoólica nas respectivas coletas das amostras dos três Alambiques: Água doce (A), São Sarué (B) e O Mirante da Cachaça (C).

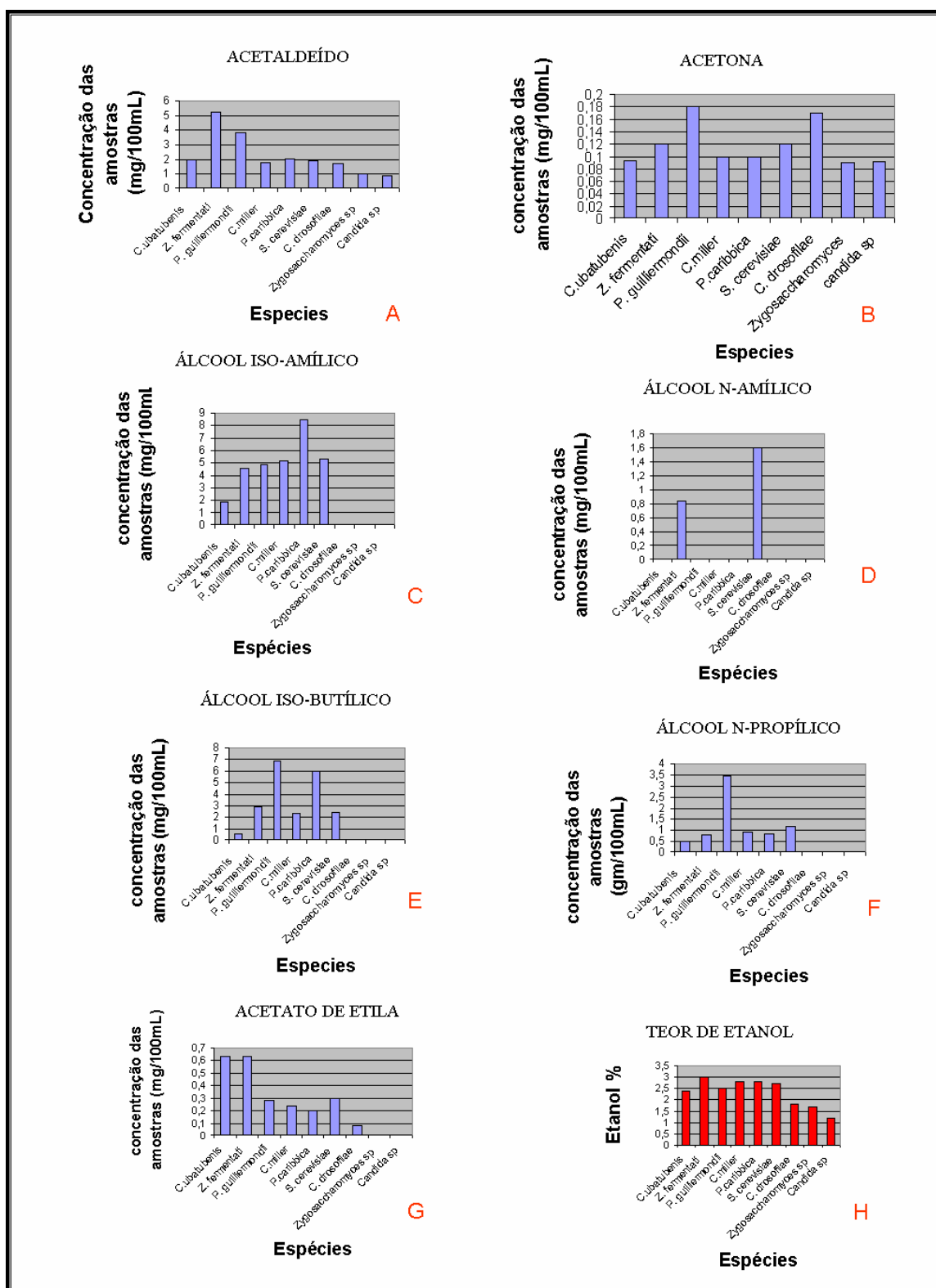


Figura 5. Concentração de metabólitos Secundários de Fermentação Alcoólica (mg/100mL/24horas): A) Acetadeido, B) Acetona, C) Álcool Iso-Amílico, D) Álcool N-Amílico, E) Álcool Iso-Butílico, F) Álcool N-

Propilico, **G**) Acetato de Etila e **H**) Teor de Álcool, formados por sete espécies de leveduras isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal na Zona da Mata do Estado de Pernambuco.

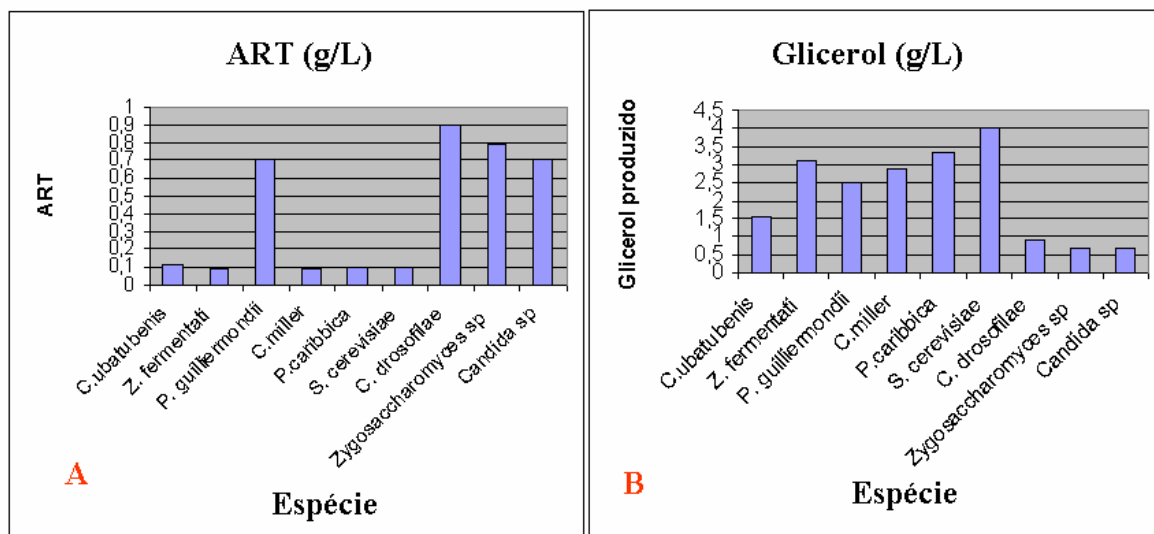


Figura 6. Análise de sete espécies de leveduras isoladas de alambiques produtores de aguardente artesanal na Zona da Mata do Estado de Pernambuco. **A)** Consumo de açúcares redutores totais. **B)** Produção de glicerol.

6. CONCLUSÕES

A amplificação de seqüências simples entre repetições (ISSR) com o iniciador (GTG)₅ foi mais eficiente gerando perfis com polimorfismo no padrão de bandas que permitiu a discriminação de espécies de leveduras nativas de *S. cerevisiae* em amostras de mosto fermentado coletadas em três alambiques artesanais no Estado de Pernambuco.

A amplificação com os iniciadores (GACA)₄, (GTG)₅ e M13 de cada perfil de ribotipo do locus ITS1-5.8s-ITS2 do DNA ribossomal apresentou um padrão específico permitindo a discriminação de espécies de leveduras não-*Saccharomyces* de *Saccharomyces* em amostras de mosto fermentado coletadas em alambiques produtores de aguardente ;

O marcador molecular ISSR utilizado com três diferentes tipos de iniciadores mostrou-se eficiente no acompanhamento de populações envolvidas no processo de produção de cachaça, podendo ser utilizado como ferramenta no controle microbiológico do processo, no acompanhamento de leveduras inoculadas e na seleção de leveduras nativas com maior poder de dominância.

As leveduras *Candida milleri* e *Pichia caribbica* foram boas fermentadoras em ensaios de laboratório nas condições de temperatura, concentração de células e de açúcares, semelhantes às aquelas encontradas nas dornas.

Os valores de acetaldeído, álcool n-propílico e iso-butílico produzidos por *Pichia guilliermondii* estão acima do recomendado para a produção de cachaça. Portanto, a presença dessas células no processo fermentativo pode comprometer a produção do alambique, reforçando a necessidade de controle microbiológico do processo.

Os produtos secundários álcool n-propílico, álcool iso-butílico, acetaldeído e acetato de etila não foram produzidos pelas espécies de *C. drosophilae*, *Zygosaccharomyces* sp *Candida* sp.

APÊNDICES

MEIOS DE CULTURA

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

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

* componentes adicionados na forma de soluções previamente preparadas.

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

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

Extrato de levedura (Biobrás).....	10,0g
Peptona (Difco)	20,0g
Glicose (Nuclear).....	20,0g
Agar	16 a 18g

Caldo de cana fresco pH 5.0 (p/ 1L)

Ampicilina 50µg/mL

Ácido nalidixico 100µg/mL

Soluções

Glicose Pesar 500g e dissolver em 1000mL de água destilada

Fosfato de potássio Pesar 5,5g e dissolver á 100mL de água destilada

Cloreto de potássio Pesar 4,25g e dissolver á 100mL de água destilada

Cloreto de Cálcio Pesar 1,25g e dissolver á 100mL de água destilada

Sulfato de Magnésio Pesar 1,25g e dissolver á 100mL de água destilada

Cloreto de Ferro Pesar 0,5g e dissolver á 200mL de água destilada

Sulfato de Manganês Pesar 0,5g e dissolver á 200mL de água destilada

Verde de Bromocresol Pesar 0,22g e dissolver em 5ml de álcool , completar para 100mL de água destilada.

Ácido Nalidixico Triturar um comprimido de ácido nalidixico farmacêutico .

Dissolver em solução de NaOH á 0,05 N ($\pm$ 10mL), completar para 100mL água destilada.

Ampicilina Triturar um comprimido de 500mg de ampicilina farmacêutico , Dissolver em 100mL com água destilada.

Obs.: na hora do uso, colocar 10mL da glicose para 100mL de meio de cultura.

Solução de Actidiona (Solução Estoque/20 mg/mL)

Dissolver 0,2g de actidiona em 1,0mL de acetona e completar para 10mL de água destilada esterilizada.

Solução de Actidiona (Solução Trabalho/5ppm)

Transferir 5mL da solução de estoque e adicionar 95mL de água destilada esterilizada. Essa solução terá concentração de 1mg/mL.

Usar 0,5mL para cada 100mL de meio já esterilizado e fundido. Guardar essa solução em geladeira.

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

SOLUÇÕES E TAMPÕES

Solução Estoque de Tris 1M (Tris [Hidroximetil] Aminometano)

Trizma base (SIGMA) 24.2g

Água destilada q.s.p..... 200mL

O pH foi ajustado para 8.0, a solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

Solução de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS (MERCK) 5g

Água destilada autoclavada q.s.p..... 50mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

Solução de NaCl 0,5M (Cloreto de Sódio)

NaCl (Vetec) 29,25g

Água destilada q.s.p..... 100mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

Solução Estoque de EDTA 0,5 M (Ácido Etileno Diamino Tetraacético)

EDTA (MERCK) 37,22g

Água destilada q.s.p..... 200mL

O pH foi ajustado para 8.0, a solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

Tampão Tris/EDTA (TE) pH 8,0

Tris-HCl 1M pH 8,0 (Sigma) 1,0mL

EDTA 0,5 M pH 8,0 (Sigma) 0,2mL

Água destilada q.s.p..... 100mL

O tampão foi autoclavado e mantido a 4 °C.

Tampão Tris-Borato (TBE) 5X (p/ 1L)

Trizma base (Sigma) 54,0g

Ácido bórico 27,5g

EDTA 0,5 M 20,0mL

Água destilada q.s.p..... 1000mL

O pH foi ajustado para 8,0, o volume foi completado com água destilada para 1000mL e estocado a 4°C. No momento de uso, 100 mL do tampão foi diluído em água deionizada esterilizada para obter uma concentração de 0,5X.

Tampão de Amostra Para Eletroforese de DNA

Azul de bromofenol 250mg

Ficol (Tipo 400 Pharmacia) 15g

Água destilada q.s.p..... 100mL

O tampão foi aquecido sem atingir o ponto de ebulição e estocado em alíquotas a 4°C.

Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK et al., 1989)

Brometo de Etídio 1g

Água destilada 100mL

A solução foi preparada a partir de 1g de Brometo de Etídio em 100mL de água destilada e agitada durante uma hora em um agitador magnético, fazendo uma solução de estoque de 10ng/μL. Posteriormente, estocada a 4°C em frasco escuro. No momento de uso, 10μL dessa solução foram adicionados a 200mL de tampão TBE 1X.

Tampão de Extração de DNA (RAEDER & BRODA, 1985)

Tris-HCl 1M pH 8,0 2,0mL

EDTA 0,5M pH 8,0 0,5mL

SDS 10% 1,0mL

NaCl 5 M 0,5mL

Água destilada autoclavada..... 6,0mL

O tampão foi preparado somente no momento de uso.

dNTPs

Os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) liofilizados (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) utilizados foram fornecidos separados em concentrações de 100mM pela Invitrogen Life Technologies. Para uso, foram misturadas partes iguais obtendo uma concentração final de 2,5 mM de cada dNTP. A solução foi mantida a -20°C.

Solução de Ácido Dinitrossalicílico (p/500mL)**Solução A**

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

Solução B

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

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

TABELA DISCRIMINADO AS 7 COLETAS DA SAFRA 2005/2006

ITS	Coletas - ÁGUA DOCE 2005						
	1	2	3	4	5	6	7
550	SADB1C1 (4), Candida sp. Confere ITS Confere GTG5 Confere M13						
600	SADB1C1 (2), SADB1C1 (5) SADB1C1 (7) O isolado SAB1C1(1) de 600 pb (400+200) foi identificado como Pichia caribbica Os isolados C1(2), C3(20), C5(4) e C6(1) são idênticos no GTG5		CADB1C3 (17) CADB1C3 (18) CADB1C3 (19) CADB1C3 (20) CADB1C3 (21) CADB1C3 (22) CADB1C3 (23) CADB1C3 (24) CADB1C3 (25) CADB1C3(26) SADB1C3 (20) SADB1C3 (21) SADB1C3 (22) SADB1C3 (23) SADB1C3 (26)		CADB1C5 (4) CADB1C5 (5) CADB1C5 (6) <u>CADB1C5 (7) C31</u> CADB1C5 (8) CADB1C5 (9) CADB1C5 (10) CADB1C5 (11) SADB1C5 (23) SADB1C5 (31) <u>SADB1C5 (35) C31</u> SADB1C5 (36) <u>SADB1C5 (40) C32</u>	CADB1C6 (1) CADB1C6 (2) CADB1C6 (3) CADB1C6 (4) CADB1C6 (5) CADB1C6 (6) CADB1C6 (7) CADB1C6 (8) CADB1C6 (9) CADB1C6 (10) CADB1C6 (11) CADB1C6 (12) CADB1C6 (13) CADB1C6 (14) CADB1C6 (15) CADB1C6 (16) CADB1C6 (17) CADB1C6 (18) CADB1C6 (19) CADB1C6 (20)	
700	SADB1C1 (8) Os isolados C1(8), C2(1), C3(1), C4(1), C5(1) e C6(7)		CADB1C3 (1) CADB1C3 (2) CADB1C3 (3) CADB1C3 (4) CADB1C3 (5) CADB1C3 (6) CADB1C3 (7) CADB1C3 (8) CADB1C3 (9) CADB1C3 (10) CADB1C3 (11) CADB1C3 (12) CADB1C3 (13) CADB1C3 (14) CADB1C3 (15) SADB1C3 (1) SADB1C3 (3) SADB1C3 (6) SADB1C3 (7) SADB1C3 (11)	SADB1C4 (1) SADB1C4 (5) CADB1C4 (2) CADB1C4 (3)	CADB1C5 (1) Candida miller CADB1C5 (2) CADB1C5 (3)	SADB1C6 (7) SADB1C6 (11) SADB1C6 (15) SADB1C6 (16) CADB1C6 (20) CADB1C6 (21) CADB1C6 (22) CADB1C6 (23) CADB1C6 (24) CADB1C6 (25) CADB1C6 (26) CADB1C6 (27) CADB1C6 (28) CADB1C6 (29)	SADB1C7 (13) SADB1C7 (14) CADB1C7 (1) CADB1C7 (2) CADB1C7 (3) CADB1C7 (4) CADB1C7 (5) CADB1C7 (6)
850	<u>SADB1C1 (3)- P25</u> SADB1C1 (5) SADB1C1 (8) SADB1C1 (9) SADB1C3 (13) <u>SADB1C3 (14)- P25</u> <u>SADB1C3 (16)- P25</u> SADB1C3 (18) SADB1C3 (19)	SADC2(1) SADC2(2) SADC2(4) SADC2(5) SADC2(6) SADC2 (7) Cadblc2(1)	SADB1C3 (13) SADB1C3 (14) SADB1C3 (16) SADB1C3 (18) SADB1C3 (19) SADB1C3(24) <u>SADB1C3(25) P25</u> SADB1C3 (27)	SADB1C4(3)Saccharomyce cerevisiae SADB1C4 (4) SADB1C4(1)	SADB1C5 (1) SADB1C5 (2) SADB1C5 (3) SADB1C5 (4) SADB1C5 (5) SADB1C5 (6) SADB1C5 (7) SADB1C5 (8) SADB1C5 (9) SADB1C5 (10) SADB1C5 (11) SADB1C5 (12) SADB1C5 (13) SADB1C5 (14) SADB1C5 (15) SADB1C5 (16) SADB1C5 (17) SADB1C5 (18) SADB1C5 (19) SADB1C5 (20) SADB1C5 (21) SADB1C5 (24) SADB1C5 (26) SADB1C5 (27) SADB1C5 (28) <u>SADB1C5 (29) P18</u> SADB1C5 (30) SADB1C5 (33) SADB1C5 (34) SADB1C5 (37) SADB1C5 (38)	<u>SADB1C6 (1) P6</u> <u>SADB1C6 (2) P6</u> SADB1C6 (5) <u>SADB1C6 (6) P6</u> SADB1C6 (8) SADB1C6 (9) SADB1C6 (10) <u>SADB1C6 (12)P6</u> <u>SADB1C6 (13)P6</u> <u>SADB1C6 (14)P6</u> SADB1C6 (17) SADB1C6 (18) SADB1C6 (19) SADB1C6 (20) SADB1C6 (21) SADB1C6 (22) SADB1C6 (23) SADB1C6 (24) SADB1C6 (25) <u>SADB1C6 (26)P5</u> SADB1C6 (27)	<u>SADB1C7 (1)P25</u> <u>SADB1C7 (2)P25</u> SADB1C7 (3) <u>SADB1C7 (4)P6</u> <u>SADB1C7 (5)P6</u> <u>SADB1C7 (6)P6</u> <u>SADB1C7 (7)P6</u> <u>SADB1C7 (8)P6</u> <u>SADB1C7 (9)P6</u> SADB1C7 (10) SADB1C7 (11) SADB1C7 (12)P6 SADB1C7 (15) <u>SADB1C7 (16)P25</u> <u>SADB1C7 (17)P6</u> <u>SADB1C7 (18)P6</u> <u>SADB1C7 (19)P25</u> <u>SADB1C7 (20)P6</u>

TABELA MOSTRANDO A 2 BATELADA DE AGUA DOCE .SAFRA 2006/2007

ITS	COLETAS – AGUA DOCE 2006		
	1	2	Digestão Hae III
600	SADC1(1), SADC1(4) SADC1(5) SADC1(6) SADC1(8) <i>Pichia caribbica</i> SADC1(9) <i>Picchia caribbica</i> SADC1(10) SADC1(11) SADC1(12) SADC1(15) SADC1(16)		200+400
850	SADC1(2)P6 SADC1(3)P6 SADC1(7) P6 SC SADC1(13) SADC1(14)	SADC2(8), SADB2C2 (1)-P4A SADB2C2 (2) P6 SADB2C2 (3)- SC SADB2C2 (4)-P18 SADB2C2 (6)-P4A SADC2(7) SADC2(9) SADB2C2 (10) SADB2C2 (11)-P6 SADB2C2 (12)-P5 SADB2C2 (13)-P15 SADC2(14)SC SADC2(15) SADB2C2 (16)-P5	200+300+350

Tabela descrição dos isolados do alambique São Sarué em quatro coletas

ITS	COLETA ALAMBIQUE IGARASSU CACHAÇA SÃO SARUÉ			
	1- fermento de corte	2 – 1 hora de pois de colocar o fermento	3- 24 horas	4 – 48 horas
600pb	CAIB1C1(1) CAIB1C1(2) CAIB1C1(3) CAIB1C1(4) CAIB1C1(5) CAIB1C1(6) CAIB1C1(7) <i>Pichia caribbica</i> CAIB1C1(8) <i>Pichia caribbica</i> CAIB1C1(9) CAIB1C1(10)	CAIB1C2(13)	CAIB1C3(21) <i>Pictia caribbica</i> CAIB1C3(22) CAIB1C3(23) CAIB1C3(24) CAIB1C3(25) CAIB1C3(26) CAIB1C3(27) CAIB1C3(28) CAIB1C3(29) CAIB1C3(30)	CAIB1C4(31) CAIB1C4(32) CAIB1C4(33) CAIB1C4(34) CAIB1C4(35) CAIB1C4(36) CAIB1C4(37) CAIB1C4(38) CAIB1C4(39) CAIB1C4(40)
850pb	SAIB1C1(41) Sc SAIB1C1(42) SAIB1C1(43) SAIB1C1(44) SAIB1C1(45) SAIB1C1(46) SAIB1C1(47) SAIB1C1(48) SAIB1C1(49) SAIB1C1(50)	SAIB1C2(51) SAIB1C2(52) SAIB1C2(53) SAIB1C2(54) SAIB1C2(55) SAIB1C2(56) SAIB1C2(57) SAIB1C2(58) SAIB1C2(59) SAIB1C2(60)	SAIB1C3(61) SAIB1C3(62) SAIB1C3(63) SAIB1C3(64) SAIB1C3(65)	SAIB1C4(66) SAIB1C4(67) SAIB1C4(68) SAIB1C4(69) SAIB1C4(70)

Tabela Mostra isolados da fermentação do alambique o Mirante da cachaça

ITS	1 coleta	2 coleta
500		CPDC2(2) <i>Candida drosophilae</i> CPDC2(5) <i>Candida ubatubeniss</i>
600	SPDC1(13) <i>Pichia caribica</i>	SPDC2(11) <i>Pichia caribica</i> CPDC2(3) <i>Pichia quillermondii</i>
700		SPDC2(7) <i>Zyqsaccharomyces sp</i> CPDC2(4) <i>Zyqsaccharomyces fermentati</i> CPDC2(1) <i>Zyqsaccharomyces fermentati</i>
850	SPDC1(1) <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SPDC1(2) SPDC1(3) SPDC1(4) SPDC1(5) SPDC1(6) SPDC1(7) SPDC1(8) SPDC1(9) SPDC1(10) SPDC1(11) SPDC1(12) SPDC1(13) SPDC1(14) SPDC1(15) SPDC1(16) SPDC1(17) SPDC1(18) SPDC1(19)	SPDC2(1) SPDC2(2) SPDC2(3) SPDC2(4) SPDC2(5) SPDC2(6) SPDC2(8) SPDC2(9) SPDC2(10)