

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

COMUNIDADES DE LEVEDURAS ASSOCIADAS COM
A FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DURANTE A
PRODUÇÃO ARTESANAL DA CACHAÇA DE
ALAMBIQUE EM MINAS GERAIS

Carla Pataro

BELO HORIZONTE

2000

CARLA PATARO

COMUNIDADES DE LEVEDURAS ASSOCIADAS COM
A FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DURANTE A
PRODUÇÃO ARTESANAL DA CACHAÇA DE
ALAMBIQUE EM MINAS GERAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciência.

Orientador: Prof. Dr. Valter Roberto Linardi

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais.

BELO HORIZONTE

2000

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valter Linardi, pela orientação, incentivo e apoio ao longo do desenvolvimento de todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, pela grande oportunidade de trabalhar com as leveduras da cachaça desde o início da linha de pesquisa, pelo auxílio nas coletas, atividades de laboratório, redação dos manuscritos e desta tese, e principalmente, pela paciência e amizade.

Ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, pelas condições logísticas para o desenvolvimento desta tese.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, nas pessoas do ex-coordenador Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira e atual Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli pelas facilidades recebidas para a execução deste trabalho.

À Cristina secretária do Programa pela dedicação e qualificada cooperação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, na pessoa de seu Chefe Prof. Dr. Luiz Macedo de Faria, pela colaboração e apoio.

Ao Prof. Ary Corrêa Júnior, revisor desta tese.

Aos funcionários e motoristas do Setor de Serviços Gerais do ICB (Sofia, Tavares, Geraldo, Lucio e Rominho) por todo o apoio e boa vontade ao longo das inúmeras coletas de campo.

Aos meus amigos, queridos, do Laboratório de Fermentação (Raquel, Soraya, Adriana, Maristela, Mara, Inayara, Bia, Fátima, Alice, Claudmeire, João, Almir, Luiz, Júlio, Rubio, Claudia, Elaine, Rita, Michele, Andreia, Nadia, Vera e Janaína) pela convivência “alto astral” ao longo destes 4 anos e principalmente pela amizade que desenvolvemos e, certamente, será por toda vida, mesmo que só de lembranças, se o destino insistir em nos afastar.

À querida Fatinha, que sempre me ajudou no dia-a-dia, lavando milhares de placas de petri e, principalmente, por ter sido sempre minha amiga.

Aos meus amigos inseparáveis, que inúmeras vezes ouviram minhas lamentações e sempre me apoiaram: Christiane, Lenora e Paulinho, Nadia, Mabel, Ângelo e Juliana.

À Juliana Guerra, pela companhia nas coletas e por toda a ajuda.

Ao Charles Anacleto, pelas inúmeras assessorias prestadas, principalmente no computador.

Aos proprietários de todas as destilarias onde foram realizadas as coletas que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao laboratório de Biologia de Microrganismos, Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Micologia, pelas facilidades proporcionadas, e principalmente à Gorete, eterna colaboradora.

Ao Marcos Callisto, pela inestimável ajuda prestada na digitação e elaboração desta tese. Mas principalmente, por ter tornado este momento difícil de finalização de tese o mais agradável possível, através de seu apoio incondicional, carinho e amor.

Ao Paulinho, Silvia e Mariana, minha família, pelo apoio e amor.

Às instituições financiadoras desta tese: Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico esta tese à minha mãe e ao meu pai, que através do apoio e amor incondicionais tornaram possíveis todas as conquistas da minha vida.

SUMÁRIO

	Pag.
Resumo	1
1- Introdução	3
2- Objetivos	17
3- Trabalho 1:	18
Morais, P.B.; Rosa, C.A.; Linardi, V.R.; Pataro, C. & Maia, A .B. R. A. 1997. Characterization and sucession of yeast populations associated with spontaneous fermentation during the production of the brazilian sugar-cane “aguardente”. <i>World Journal of Microbioloy and Biotechnoloy</i> 13 : 241-243.	
4- Trabalho 2:	22
Pataro, C., Santos, A., Correa, S. R.. Morais, P.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. <i>Rev. Microbiol.</i> 29 : 104-108.	
5- Trabalho 3:	28
Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000a. Yeast communities and genetic polymorphism of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains associated with artisanal fermentations in Brazil. <i>J. Appl. Microbiol.</i> , in press.	
6- Trabalho 4:	52
Pataro, C., Guerra, J.B., Gomes, F.C.O.; Neves, M.J.; Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000b. Acúmulo de trealose e sucessão de populações de leveduras durante o ciclo fermentativo de 24 horas em fermentações artesanais no Brasil. Manuscrito em preparação.	
7- Trabalho 5:	68
Pataro, C., Guerra, J.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000c. Comunidades de leveduras associadas a fermentações espontâneas para a produção de cachaça no Estado de Minas Gerais. Manuscrito em preparação.	
8- Discussão	82
9- Conclusões	87
10- Bibliografia	89
11- Lista de Abreviações	98

RESUMO

As comunidades de leveduras associadas à fermentação da cachaça foram estudadas em 19 destilarias no Estado de Minas Gerais. Foi realizado o acompanhamento da formação do pé-de-cuba e da fermentação de mosto, tanto durante o ciclo fermentativo de 24 horas quanto em diferentes épocas do ano (início, meio e final de produção da cachaça). Uma sucessão de espécies de leveduras foi observada durante a fermentação da cachaça com *Saccharomyces cerevisiae* dominando todo o processo. Espécies de leveduras transientes ou contaminantes como *Candida guilliermondii*, *C. stellata*, *Pichia membranifaciens*, *Kloeckera japonica* e *Kluyveromyces lactis* var *drosophilorum* foram encontradas em números variáveis, provavelmente devido à adição diária de caldo de cana fresco. Foi observado que alterações no mosto fermentado, como o aumento da acidez e do conteúdo alcoólico, juntamente com as altas concentrações de açúcar mantida pela adição diária de caldo de cana no fermento podem atuar na seleção de espécies de leveduras prevalentes. Os testes realizados em laboratório, visando avaliar a capacidade das linhagens de leveduras na produção de micocinas (“killer”) evidenciaram sua presença tanto no pé de cuba, quanto no mosto fermentado, sugerindo seu papel como responsáveis pela eliminação de algumas espécies contaminantes. No entanto, nenhuma linhagem “killer” dominou o fermentação do caldo de cana. Mais que 60% das linhagens foram neutras às toxinas produzidas pelos isolados “killer”. No pé-de-cuba, 56,5% dos isolados foram sensíveis às toxinas, enquanto que as linhagens sensíveis compreenderam, aproximadamente, 40% dos isolados nas dornas jovens (início da produção de cachaça) e 32,5% nas fermentações velhas (final da produção). A maioria dos isolados de *S. cerevisiae* foram capazes de crescerem em meio com alta concentração osmótica, entre 25 e 40% e, em concentrações de etanol entre 8-12%. Também foram consideradas termotolerantes apresentando crescimento entre 37 e 40⁰ C. A capacidade de produzir invertase e de acumular trealose em condições normais de crescimento (fase estacionária) foi variável entre os isolados estudados, sendo que as linhagens de *S. cerevisiae* foram as que apresentaram os maiores valores, com exceção de uma linhagem de *C. sake* que foi capaz de produzir mais que 200

$\mu\text{mol}/\text{açúcar redutor}/\text{mg células}/\text{minuto}$ a 30°C . Os resultados mostraram que as linhagens de *S. cerevisiae* testadas capazes de acumular trealose em condições de estresse térmico e de etanol apresentaram maior sobrevivência nestas condições. Análise de PFGE e PCR das linhagens predominantes de *S. cerevisiae* isolados do mosto fermentado mostraram alto nível de polimorfismo genético nas três destilarias amostradas. A alta variabilidade molecular das linhagens de *S. cerevisiae* foi observada em linhagens isoladas da mesma dorna e em fermentações com idades diferentes. Nossos resultados mostraram que há uma sucessão de linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente diferentes durante o processo de fermentação para a produção da cachaça.

ABSTRACT

The yeast communities associated with the fermentation of cachaça were studied in 19 distilleries in the State of Minas Gerais. Was performed to monitor the formation of starter and fermentation of wine, both during the fermentation cycle of 24 hours and in different seasons (beginning, middle and end of production of cachaça). A succession of yeast species was observed during fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* dominating the process. Yeast species or transient contaminants as *Candida guilliermondii*, *C. stellata*, *membranifaciens Pichia*, *Kluyveromyces lactis* and *Kloeckera japonica var drosophilarum* were found in varying numbers, probably due to the daily addition of fresh sugar cane juice. It was observed that changes in fermented, such as increased acidity and alcohol content, along with high concentrations of sugar maintained by daily addition of sugar cane in yeast can act in the selection of yeast species prevalent. Tests conducted in the laboratory, to evaluate the ability of yeast strains to produce micocinas ("killer") showed their presence in both starter vat, and in fermented, suggesting their role as responsible for the disappearance of some species contaminants. However, no strain "killer" dominated the fermentation of sugarcane juice. More than 60% of the strains were neutral to the toxins produced by isolates "killer". In starter, 56.5% of the isolates were sensitive to toxins, while sensitive strains comprised approximately 40% of the isolates in the vats young (early production of cachaça) and 32.5% in the fermentation old (end of production). Most isolates of *S. cerevisiae* were able to grow on medium with high osmotic concentration between 25 and 40%, and ethanol concentrations between 8-12%. Were also considered a growth between 37 and 40⁰ C. The ability to produce invertase and trehalose accumulate in normal growth conditions (stationary phase) was variable among the isolates studied, with strains of *S. cerevisiae* showed the higher the values, with the exception of one strain of *C. sake* which was capable of producing more than 200 mmol / reducing sugar / mg cells / min to 30⁰ C. The results showed that strains of *S. cerevisiae* tested able to accumulate trehalose under conditions of heat stress and ethanol showed higher survival in these conditions. PFGE and PCR analysis of predominant lineages of *S. cerevisiae* isolated from fermented showed high level of genetic polymorphism in the three distilleries sampled. The high molecular variability of strains of *S. cerevisiae* was observed in strains isolated from the same fermentation vat and different ages. Our

results showed that there is a succession of strains of *S. cerevisiae* genetically different times during the fermentation process for producing the cachaça.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Definição e classificação das leveduras

As leveduras, assim como os fungos filamentosos, pertencem ao Reino Fungi. Estas se diferenciam dos fungos filamentosos por apresentarem-se, usual e predominantemente, sob a forma unicelular. A reprodução vegetativa faz-se geralmente, por esporulação, fissão ou brotamento, sendo esta última a mais comumente encontrada (Brock & Madigan, 1991; Martini, 1992). Normalmente não formam filamento ou micélio, e a população celular de leveduras apresenta-se como um conjunto de células individualizadas. As células leveduriformes diferem de outros organismos, como as algas, pois não efetuam fotossíntese, assim como dos protozoários, pois possuem uma parede celular rígida, além de serem facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. As leveduras possuem núcleo organizado com membrana nuclear (eucariótica), mas não têm qualquer meio de locomoção (flagelos ou cílios). As leveduras são fungos pertencentes a divisão Eumycota, classes Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes (ou fungos imperfeitos). Algumas espécies de leveduras não formam esporos sexuados, e são consideradas como Fungos Imperfeitos, outras produzem esporos sexuados e assim, apresentam clara relação com os ascomicetos ou com os basidiomicetos (Martini, 1992).

1.2- Aspectos ecológicos da distribuição das leveduras na natureza

Os estudos sobre ecologia de leveduras procuram conhecer o modo pelo qual esses microrganismos vivem e se propagam na natureza, investigando suas populações e interações com vários substratos que possam suportar seu crescimento, e com outros grupos de microrganismos (fungos filamentosos, bactérias e protozoários). As leveduras são amplamente distribuídas, sendo parte da dinâmica biológica e química no solo, no ar, em águas de lagos, rios, mares e em associação com outros grupos de microrganismos (fungos filamentosos, bactérias e protozoários). São encontradas sobre a pele e trato intestinal de

animais, em insetos, em plantas (folhas, flores e frutos), musgos, cogumelos, grãos de cereais e outros substratos que contenham açúcares. Nos ambientes aquáticos (água doce e do mar) são encontradas na coluna d'água, em sedimentos, plantas e animais (Morais, 1991; Araújo, 1994).

No entanto, a ecologia de leveduras mostra-se mais complexa do que apenas uma distribuição aleatória em substratos onde há açúcares em níveis detectáveis, pois estas não apresentam a ubiquidade das bactérias e, em geral, possuem um habitat mais específico. Muitas leveduras vivem de forma saprofítica, necessitando de um substrato orgânico em decomposição para o seu crescimento. Entretanto tipos parasíticos são conhecidos e dependem de um hospedeiro vivo para suprir suas necessidades nutritivas. Algumas poucas espécies parasitas estritas ou facultativas podem causar enfermidades no homem, animais e plantas (Ahearn, 1998).

O habitat original (primário) das leveduras são as frutas doces e maduras, e sucos de frutas (Brock & Madigan, 1991). No caso dos frutos tropicais, o teor de açúcares é elevado, sendo que na cana-de-açúcar a sacarose é o açúcar predominante (cerca de 80%). As alterações microbianas que ocorrem em sucos de frutas naturais, expostos à temperatura ambiente, são normalmente fermentações alcólicas ocasionadas por leveduras, seguidas de oxidação do álcool e de ácidos da fruta por leveduras formadoras de película e por bolores que crescem na superfície dos sucos de frutas (Furlanetto *et al.*, 1982).

Os estudos mais recentes em ecologia de leveduras em ecossistemas tropicais caracterizam-se pela grande diversidade de espécies encontradas, e a frequência elevada de biótipos desconhecidos e até novas espécies (Naumov *et al.*, 1995; Moraes *et al.*, 1995; Rosa *et al.*, 1999; Lachance *et al.*, 1998). Porém, apesar do reconhecido papel comercial das leveduras, nosso conhecimento sobre a diversidade deste grupo e do seu papel no ecossistema é reduzido. O conhecimento da biodiversidade pressupõe o inventário taxonômico das espécies; a determinação dos nichos ecológicos de linhagens de interesse e o entendimento do papel das espécies na estrutura da comunidade microbiana.

1.3- A fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica, tradicionalmente considerada como a transformação de açúcares em etanol e gás carbônico é efetuada por um grupo restrito de organismos. Além das leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces*, a indústria também utiliza a bactéria *Zymomonas mobilis*. A fermentação alcoólica caracteriza-se pelo catabolismo parcial do açúcar pela via Embden-Meyerhoff-Parnas. Na indústria, a fermentação desenvolveu-se de modo empírico para a obtenção de bebidas fermentadas. Somente a partir do século passado, foram feitas as primeiras tentativas para otimização do processo fermentativo, visando o aumento da produtividade em etanol. Em termos gerais, a fermentação alcoólica pode ser conduzida por três sistemas distintos: convencional, em batelada; descontínuo alimentado, e contínuo. O sistema convencional é feito a partir de mostos contendo 100 a 200 g/l de açúcar, com rendimento em torno de 80-90 g/l de etanol, e produtividade em torno de 0.5 g/l / hora. As limitações do processo utilizando linhagens usuais de *Saccharomyces* impõem concentrações máximas de açúcar e etanol no mosto com rendimento limitado. No entanto, este é o processo recomendado para a fermentação em pequena escala, caso da produção artesanal de cachaça, e ainda largamente empregado na indústria alcooleira, no Brasil (Maia *et al.*, 1994; Orelli *et al.*, 1991). Os sistemas contínuos e descontínuos alimentado não são usualmente empregados no Brasil. As pesquisas e o melhoramento da etapa fermentativa destinam-se a aumentar o rendimento da conversão de açúcar a etanol, otimizando o aproveitamento de matéria-prima; aumentar a produtividade em etanol, reduzindo o volume e custos operacionais dos reatores; e aumentar a concentração de etanol no mosto fermentado, reduzindo os custos de destilação.

Na busca de linhagens de leveduras para a aplicação em processos etanológicos, propriedades de tolerância ao etanol e altas concentrações de açúcar, bem como um maior rendimento da conversão de açúcar em álcool, são pré-requisitos importantes para um processo eficiente (Benitez *et al.*, 1983). O etanol, produto resultante da fermentação é um dos principais fatores que inibem a taxa de crescimento da levedura e a produção de um teor alcoólico máximo (Richer, 1986; Salgueiro *et al.*, 1988). Os efeitos inibitórios do etanol

podem ser atribuídos a ações específicas em membranas e enzimas (D'Amore & Stewart, 1987). Nos sistemas membranosos, o etanol altera a fluidez e transporte de glicose, maltose, nitrogênio e aminoácidos, e pode causar a re-entrada passiva de prótons (Loureiro & van Uden, 1986). A tolerância a açúcares é variável entre as linhagens fermentadoras, e o substrato é reconhecidamente um agente regulador do metabolismo de leveduras (Salmon & Maurício, 1994; Postma *et al.*, 1988). Em geral, a produção de etanol inicia-se em concentrações a partir de 100 a 200 mg/l de açúcar e, acima de 150 g/l, ocorre a inibição das vias metabólicas respiratória e fermentativa. Estes efeitos são atribuídos a uma depressão da atividade de água (Jones & Greenfield, 1986). Substâncias osmoprotetoras como glicina, betaína e prolina podem elevar a viabilidade e a taxa de fermentação em altas concentrações de açúcar (Thomas *et al.*, 1994). O oxigênio também é um fator da regulação do metabolismo de açúcares em leveduras, sendo que a maioria das espécies fermentativas não cresce bem na sua ausência (Visser *et al.*, 1990). Certas leveduras utilizam um determinado dissacarídeo somente aerobicamente, mesmo que possam fermentar uma ou mais de suas hexoses componentes (Weusthuis *et al.*, 1994). Isto parece ser devido a fatores como a inativação de hidrolases sob condições anaeróbicas, modificação da conformação do transportador pelo oxigênio, ou baixo suporte energético para o transporte em anaerobiose (Simms *et al.*, 1991). Já o uso de condições microaerófilas (0,5% de saturação) pode aumentar a utilização do substrato, aumentando a tolerância ao etanol, talvez pelo aumento do teor de ácidos graxos insaturados na membrana celular (Hoppe & Hansford, 1984). A temperatura de fermentação também é um fator importante na produção de etanol e a termotolerância parece relacionada com a alta produtividade alcoólica (D'Amore *et al.*, 1989; Laluce *et al.*, 1993). Geralmente, a temperatura ótima de crescimento é inferior em 5-10⁰ C à temperatura ótima para a produção de etanol. Esta diferença é tradicionalmente atribuída ao fato de que várias enzimas de cadeia respiratória são mais termossensíveis que as da via glicolítica (Blanchet & Ballerini, 1987). Os efeitos inibitórios do estresse térmico incluem desorganização da membrana celular e do transporte de nutrientes, levando à dissipação do gradiente de prótons através da membrana e queda do pH intracelular (Coote *et al.*, 1994; Siningaglia *et al.*, 1993; Viegas *et al.*, 1995). Efeito similar ocorre em linhagens

de *S. cerevisiae* submetidas a altas concentrações de etanol e temperaturas elevadas (Rosa & Sá-Correa, 1992; Salgueiro *et al.*, 1988).

Recentemente, várias evidências têm sugerido que o nível intracelular de trealose pode determinar a sobrevivência de leveduras em condições ambientais extremas (Alexandre *et al.*, 1998; Hounsa *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999). De acordo com Charlemagne *et al.* (1998), o acúmulo de trealose pela célula está diretamente associado à manutenção da viabilidade celular. A trealose age como protetor da membrana, regulador da concentração de solventes intracelulares em condições desfavoráveis como hiperosmolaridade (Hounsa *et al.*, 1998), além de estar associado a respostas celulares a estresse ambientais como choque térmico (Neves & François, 1992), altas concentrações de etanol e baixos níveis de atividade de água associados com a desidratação (Eleuthério & Panek, 1992; Mansure *et al.*, 1994; Banat *et al.*, 1998). A produção de etanol através da fermentação por leveduras, particularmente nos climas quentes, é dificultada pelas altas temperaturas ambientais, e linhagens termoestáveis, além de osmotorelantes e etanol-resistentes, têm sido buscadas (Fleming *et al.*, 1993). Desta forma, linhagens com habilidade de acumular trealose em condições de estresse são de interesse nas fermentações nos trópicos.

1.4- A ecologia do gênero *Saccharomyces*

A distribuição dos gêneros e espécies de leveduras nos substratos naturais depende da presença de compostos metabolizáveis, carbono e nitrogênio principalmente, da presença de compostos inibitórios e tóxicos; de fatores abióticos preponderantes como pH, temperatura e pressão osmótica, bem como da interação com dispersores e vetores (Phaff & Starmer, 1987; Morais *et al.*, 1992; Rosa *et al.*, 1994). O perfil nutricional de uma espécie ou grupo de espécies relacionadas indica os substratos passíveis de colonização, que serão aqueles que possuem os compostos assimiláveis pela espécie (Lachance & Starmer, 1986; Morais *et al.*, 1995). Assim, leveduras que assimilam muitos compostos são versáteis, e aquelas de perfil nutricional

restrito colonizam substratos com altas concentrações destes compostos (Lachance *et al.*, 1988). O gênero *Saccharomyces sensu strictu* possui um perfil nutricional restrito e especializado na fermentação de açúcares simples, e sua distribuição parece limitada ao microhabitat das fermentações, com a exceção de *S. paradoxus* que pode ocorrer naturalmente fora do ambiente das fermentações, tendo sido isolado de exudatos de coníferas, insetos, solos, entre outros (Cardinali & Martini, 1994). As espécies componentes do grupo *Saccharomyces sensu lato* são ubíquas, tendo sido isoladas de solo, conservas de pepino, soro de leite, e frutas fermentadas, incluindo uvas (Vaughan-Martini & Martini, 1993; Yarrow, 1984). Várias pesquisas na Europa e Ásia mostram que *S. cerevisiae* é raramente presente em microhabitats naturais não associados à fermentação (Phaff & Starmer, 1987; Naumov *et al.*, 1993). Mesmo as células que restam após a fermentação do vinho, quando espalhadas como fertilizantes nas vinhas, não são dispersas para outros substratos pelos vetores tradicionais de leveduras, as moscas do gênero *Drosophila*, e são predominantemente encontradas no mosto da uva (Rosini *et al.*, 1982).

S. cerevisiae também não é frequentemente isolada em ambientes tropicais não associados com fermentação. No Brasil, esta levedura foi obtida do mosto de uvas, porém não da própria uva, na região de São Paulo e, não sendo também, isolada de abacaxi, cajus ou mangas no Estado do Rio de Janeiro (de Oliveira, 1980; Robbs *et al.*, 1989) ou de 66 diferentes frutos amazônicos (Batista *et al.*, 1961). No entanto, foi isolada de rios e estuários contaminados com resíduos de usinas de álcool e em lagoas de resíduos da fabricação de farinha de mandioca (Laluce *et al.*, 1988), e de caldo de sorgo sacarino (Cereda *et al.*, 1989). Morais *et al.* (1992) isolaram linhagens de *S. cerevisiae* de *Drosophila* em ecossistemas de Mata Atlântica. Além disso, um isolado raro foi obtido das águas do estuário da Baía de Guanabara (Hagler & Mendonça - Hagler, 1981). Corrêa (1999) isolou 360 linhagens de leveduras durante o período de entressafra da produção de cachaça e obteve 4 isolados de *S. cerevisiae*, sendo 3 do solo e 1 da moenda.

As linhagens de *Saccharomyces* estudadas, até agora, têm origem em coleções de cultura européia, e não incluem isolados tropicais. Além disso, segundo Bull *et al.* (1992), substratos naturais são a maior fonte de

microrganismos para inovações tecnológicas. A caracterização e o uso de linhagens isoladas do ambiente para a produção de etanol são de interesse em biotecnologia (Ezeogu & Okolo, 1994). As linhagens de *Saccharomyces* isoladas em áreas de Mata Atlântica (Morais *et al.*, 1992) podem representar biótipos com constituição genética diferente das linhagens conhecidas de *Saccharomyces*, e demonstram que, embora raro, *S. cerevisiae* pode ser isolado de substratos tropicais. Isto requer um esforço de pesquisa que busca a biodiversidade como fenômeno e instrumento da criação de tecnologias nacionais. Portanto, fermentações não usuais, como aquelas empregadas na produção de aguardente podem fornecer novas linhagens, com características de interesse para a indústria (Aquarone *et al.*, 1983; Morais *et al.*, 1997).

1.5- Bebidas obtidas por fermentação etanológica

As bebidas alcólicas são tão antigas quanto a humanidade, e tão numerosas como as suas etnias. A principal característica de uma bebida alcóolica é o fato dela ser obtida por fermentação. A produção de substâncias nobres em proporção harmônica é que dão os caracteres organolépticos da bebida. Estas se completam, conforme o tipo de bebida, com as que se formam durante o envelhecimento. Daí a importância fundamental que tem a matéria-prima, sua origem, a maneira de preparação do mosto, e em alguns casos, o armazenamento do produto neste tipo de indústria. Segundo a legislação brasileira, as bebidas alcólicas podem ser classificadas em fermentadas, fermento-destiladas e destilo-retificadas. As bebidas fermentadas incluem cervejas, vinho, sake e vinho de frutas. As bebidas destiladas são as aguardentes, rum, uísque, arac, conhaque, graspa ou bagaceira, pisco, tequila e aguardente de frutas como a cidra. Além destas bebidas de distribuição mundial, existem aquelas restritas a determinados povos ou regiões, como os vinhos e cervejas de arroz da Tailândia, Índia, Havaí; os destilados de milho; de mandioca, como a tiquira (Maranhão, Brasil); vinhos de palmeiras como o lughbi e o toddy (África); e as bebidas alcool-ácidas como o kefir de leite de cabra (Turquia) (Aquarone *et al.*, 1983). As bebidas destiladas são as obtidas

pela destilação de um líquido contendo álcool etílico como os vinhos de frutas, de fermentados de grãos, tubérculos e raízes, de diversas substâncias açucaradas, como o caldo de cana-de-açúcar e de subprodutos da indústria do açúcar, de agave e de mel. O teor do álcool do líquido original varia, mas quase todo ele é separado pela destilação. Nessa operação, inevitavelmente, são destiladas algumas substâncias que acompanham o álcool e que são chamadas de impurezas. Elas contribuem para conferir aos diferentes destilados suas características de aroma e sabor, que são modificadas ou intensificadas pela maturação, ou envelhecimento em tonéis de madeira, sob condições adequadas (Aquarone *et al.*, 1983).

A fermentação espontânea, isto é, conduzida pela ação da microbiota indígena que acompanha os substratos e equipamentos, é prática tradicional na indústria de vinhos da Europa, assim como de diversas bebidas africanas, brasileiras e mexicanas (Lachance, 1995; Morais *et al.*, 1997; Sanni & Lonner, 1993; Thornton, 1991). A fermentação do suco de uva em vinho é uma reação microbiana complexa envolvendo o desenvolvimento sequencial de várias espécies de leveduras e bactérias do ácido lático (Fleet *et al.*, 1984; Thornton, 1991). A qualidade do vinho é dependente da ecologia microbiana destas fermentações, pois as diferentes espécies e suas populações determinam os tipos e concentrações das várias substâncias que contribuem para o sabor e aroma do vinho (Rankine & Bridson, 1971). Estudos da fermentação do vinho sugerem que a sucessão de leveduras culmina na dominância de *S. cerevisiae*, responsável pela maior parcela da fermentação. Leveduras apiculadas do gênero *Hanseniaspora* e seu anamorfo *Kloeckera* dominam o estágio inicial de colonização do mosto, mantendo populações entre 10^6 a 10^7 células/ml durante a etapa inicial, e declinam após a concentração de etanol alcançar entre 5 e 6% (Fleet *et al.*, 1984; Thornton, 1991). *Candida stellata* e espécies de *Saccharomyces sensu stricto* também dominam no mosto inicial em diferentes fermentações, além de populações menores de *C. pulcherrima*, *C. colliculosa*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. terricola*, e *Rhodotorula glutinis* que logo desaparecem. *Candida krusei*, *C. valida*, *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomycodes ludwigii* podem ocorrer (Fleet *et al.*, 1984). *S. cerevisiae* domina a fermentação em seu curso medial e final, principalmente

em temperaturas mais elevadas (20⁰ a 25⁰C), enquanto que *C. stellata* e *C. krusei*, com tolerância ao etanol semelhante a *Saccharomyces* (10%), podem manter populações similares a 10⁰ C. A presença de *P. membranifaciens* no final da fermentação pode ser prejudicial, porque esta levedura parece degradar o vinho, produzindo ácidos e ésteres indesejáveis (Thornton, 1991). O número total de leveduras no mosto de uva varia entre 10⁵-10⁶ células/ml e sobe para 10⁷-10⁸ rapidamente, durante a fermentação tumultuosa, mantendo-se constante até o final, quando cai para 10⁵ células/ml (Pardo *et al.*,1989). A microbiota associada à produção de tequila pela fermentação espontânea do mosto de agave (*Agave americana*) é restrita a este nicho, e provém dos equipamentos e dornas, exceto *P. membranifaciens*. O suco de agave é inicialmente colonizado por espécies de *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces marxianus*, e *Torulaspota delbrueckii*, que são substituídos por espécies de *Bretanomyces*, *C. milleri*, *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* (Lachance, 1995). A produção de aguardentes nigerianas é resultado da colonização espontânea de substratos como milho malteado e sorgo (pito, burukutu, sekete), polpa de arroz (agadagidi) e exsudatos de palmeiras como *Eleais guineensis* e *Raphia hookeri* (vinho de palma). A tipificação da flora complexa dessas fermentações resultou na obtenção de várias linhagens osmotolerantes e termorresistentes de leveduras, cujo papel no processo fermentativo deve ser esclarecido como parte do estabelecimento de tecnologias de culturas iniciadoras (Sanni & Oso, 1988; Sanni & Lonner, 1993). As leveduras incluem *C. fructus*, *C. intermedia*, *C. castelli*, *Geotrichum candidum*, *K. apiculata*, *P. ohmeri* e *S. cerevisiae* como espécies mais frequentes.

1.6- Leveduras micocinogênicas ('killer') associadas à fermentação de bebidas

Uma característica importante das linhagens fermentadoras é a resistência a toxinas produzidas por leveduras contaminantes. Toxinas "killer" ou micocinas são moléculas proteicas ou glicoproteicas codificadas por determinantes genéticos plasmidiais, virais ou cromossômicos. Linhagens de

leveduras produtoras são imunes à própria toxina, enquanto podem atuar sobre linhagens taxonomicamente relacionadas (Polonelli *et al.*, 1991; Radler & Schmitt, 1987; Woods & Bevan, 1968; Young, 1987). Tem sido sugerido que o fenômeno micocinogênico é um mecanismo de antagonismo entre leveduras durante fermentações espontâneas, e leveduras produtoras podem dominar o final das fermentações, principalmente em vinhos (Cansado *et al.*, 1991; Longo *et al.*, 1990; van Vuuren & Jacobs, 1992). A prevalência de linhagens produtoras de micocinas e com características inadequadas de fermentação pode estar relacionada ao atraso no tempo de fermentação e alto índice de açúcares residuais, além de maiores concentrações de acidez volátil, acetaldeído e ácido lático e bem como diferenças na produção de etanol e glicerol (Heard & Fleet, 1987; Jacobs *et al.*, 1988; Rosini, 1983). Em vinhos espanhóis, a frequência de leveduras micocinogênicas aumenta durante a fermentação sendo *S. cerevisiae* a mais frequente, além de *P. anomala*, *K. thermotolerans*, *S. exiguus* e *Torulaspora delbrueckii* (Hidalgo & Flores, 1994). Vinhos das regiões francesas de Gard e Beaujolais apresentam sistemas colonizados somente por linhagens produtoras de micocinas (Cuinier & Gros, 1983). Linhagens produtoras de micocinas também ocorrem em vinícolas da região de Toscana, Itália, e sua dinâmica populacional indica o aumento no final das fermentações, e maiores populações em final de safra (Vagnoli *et al.*, 1993). Já foi proposto que linhagens neutras ou produtoras de micocinas sejam utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo (Jacobs *et al.*, 1988).

Esta linha de trabalho tem amplas perspectivas em ecologia e biotecnologia de leveduras. A produção de micocinas (toxinas “killer”) por leveduras suscita questões acerca da competição entre leveduras desta microbiota, e como esta atividade micocinogênica afeta a cinética das fermentações. A fermentação é um modelo interessante para o estudo da interação entre leveduras micocinogênicas, sensíveis e resistentes à toxina, já que é um substrato líquido e suas características são seletivas para determinadas, e não todas, leveduras. Além disso, micocinas de leveduras podem ter potencial aplicação seja como sistema de modelo para o estudo da regulação, processamento, secreção e interação com a célula, de polipeptídeos de eucariotos; como controle biológico de contaminantes de alimentos e

processos fermentativos; na biotipagem de leveduras patogênicas, com sugestões de seu uso terapêutico contra infecções fúngicas em plantas, animais e mesmo no homem.

1.7- Contribuição das leveduras para a qualidade das bebidas

O “bouquet” ou seja, o conjunto dos aromas primários (frutais), secundários (da fermentação) e terciários (da maturação) é a essência da degustação de um bom vinho ou destilado, definindo a qualidade da bebida artesanal e o grau de apreciação e aceitação pelo mercado consumidor. A qualidade da bebida está fortemente relacionada à ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante o processo de fermentação e maturação, sendo determinantes tanto do rendimento em etanol como a formação e proporções dos compostos secundários (Romano *et al.*, 1994). Dentre as frações e compostos cuja síntese é dependente da atividade microbiana estão incluídos o glicerol, aldeídos, álcoois superiores, etilacetato, isoamilacetato, entre outros (Thornton, 1991).

O uso de diferentes linhagens fermentadoras não afeta significativamente a acidez, que equivale à presença de ácidos málico, láctico, succínico e tartárico, e principalmente de ácido acético durante a fermentação de vinhos (Romano *et al.*, 1994). Entre os produtos da fermentação, além do etanol, o glicerol é, quantitativamente, o principal produto da fermentação, e sua presença dá as características de consistência e viscosidade próprias ao corpo de cada bebida. Diferenças significantes no conteúdo de glicerol podem ser encontradas em vinhos fermentados por diferentes linhagens de *Saccharomyces* (Rankine & Bridson, 1971). Leveduras apiculadas produzem mais glicerol e ésteres que *S. cerevisiae*, contribuindo significativamente para a composição do “bouquet” de vinhos (Lafon Lafourcade *et al.*, 1984). Os álcoois superiores ou óleo fúsel são produtos de fermentações secundárias, e incluem álcoois alifáticos como n-propanol, 1-butanol, 1,3-butediol, e álcoois aromáticos, dos quais o feniletanol é o mais importante (Nykanen, 1986). Concentrações elevadas de alcóois

isoamílicos, iso-butanol e n-propanol alteram as propriedades sensoriais do vinho, introduzindo um sabor ardente ou cáustico e aroma desagradável (Thornton, 1991). Entre os compostos carbonílicos, o acetaldeído é o maior componente, geralmente constituindo 90% do conteúdo total de aldeídos em vinhos e bebidas destiladas (Longo *et al.*, 1992; Nykanen, 1986). Sua produção está relacionada às condições aeróbicas durante a fermentação, à maturação da bebida ou à atividade de filmes de leveduras (“flor yeasts”) em vinhos Jerez (Delfim & Costa, 1993). *Saccharomyces cerevisiae* produz altos níveis de acetaldeído, entre 50 a 120 mg/l, enquanto que as leveduras não-*Saccharomyces*, *K. apiculata*, *C. krusei*, *C. stellata*, *Metschnikowia pulcherrima* e *P. anomala* produzem menos de 40 mg/l (Fleet & Heard, 1993; Longo *et al.*, 1992). Os ésteres de ácidos graxos são compostos relacionados com o aroma e sabor da bebida, e *P. anomala* e *C. krusei* parecem produzir mais éster acetílicos que *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *P. membranifaciens* (Nykanen, 1986). Os monoterpenos originados da clivagem enzimática de complexos glicosídicos também compõem o conjunto do “flavoreamento” de frutas e bebidas fermentadas (Rosi *et al.*, 1994). Glicosidases microbianas e vegetais parecem ser responsáveis pela liberação destes compostos a partir de glicosídeos do substrato. O metanol, um composto sem relevância para o sabor final, é considerado prejudicial em concentrações acima de 0,25 ml/100 ml de álcool anidro na cachaça (Maia *et al.*, 1994). É produto da clivagem de pectinas através da hidrólise enzimática microbiana, durante o processo fermentativo. A detecção de propriedades enzimáticas, como a secreção de pectinases, proteases e glicosidases é de relevância na ecologia das leveduras fermentadoras. A aguardente brasileira (Cachaça) não mereceu ainda estudos aprofundados de suas características organolépticas.

1.8- A cachaça

A aguardente de cana é a principal bebida fermento-destilada brasileira. Possui graduação alcoólica entre 38 e 54^o GL, sendo produzida em diversos estados, através de produtores artesanais e industriais.

A cachaça é obtida pela destilação do mosto fermentado proveniente do caldo de cana-de-açúcar. A extração do caldo de cana é feita por esmagamento direto nas moendas. Este caldo é filtrado e clarificado por decantação que retira parte das impurezas em suspensão e algumas vezes diluído até cerca de 16^o Brix. Normalmente, não se faz tratamento ácido para reduzir o pH, embora mostos com pH entre 4,0 e 5,0 sejam os mais favoráveis ao desenvolvimento de fermentações completas e rápidas, com baixos níveis de contaminação por microrganismos prejudiciais, especialmente por bactérias lácticas e acéticas. Um dos aspectos mais característicos da produção artesanal de aguardente é a fermentação espontânea, usando exclusivamente a microbiota que acompanha o caldo, após uma etapa de propagação, feita dentro da própria dorna. A matéria prima, a cana-de-açúcar, é cultivada em quase todo o país, com muitas variedades conhecidas. Em termos gerais, a cana-de-açúcar constitui-se de fibras (8-14%), que são celulose, pentosanas e ligninas; e caldo (86-92%), composto de água (65-75%) e cerca de 11-18% de sacarose; a glicose e frutose encontram-se em menor percentagem. As variedades de cana podem ser classificadas como precoces quando atingem o teor satisfatório de açúcar no início da safra (maio a junho), médias colhidas entre julho e agosto, e tardias, colhidas no fim da safra (setembro a dezembro). Não há pesquisas sistemáticas sobre a micobiota da cana, embora já tenham relatado a presença de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* (= *Candida*) e *Pichia* na superfície da cana, e dos gêneros *Rhodotorula* e *Candida* após 24 h de queima de cana (Aquarone *et al.*, 1983). Azeredo (1996) verificou que ocorrem sucessões das espécies de leveduras ao longo do desenvolvimento da planta, caracterizando comunidades distintas em cada substratos. As espécies prevalentes em todas as amostras foram: *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii*. A comunidade de leveduras presente nas folhas foi a mais diversificada, com 27 espécies distintas. O caldo de cana é viscoso, devido a albuminas e pectinas, referidas usualmente como gomas. A cor verde deve-se a clorofilas, e compostos fenólicos. Neste caldo, a contaminação natural envolve bactérias do ácido láctico como *Leuconostoc diastaticus* e *L. mesenteroides*, e *Streptococcus* spp, além de leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*. Shehata (1960) isolou 26 espécies de leveduras no caldo de cana e água de lavagem, incluindo *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *C. krusei*, *C. stellata*, *P. fermentans*,

P. membranifaciens e *S. cerevisiae*. Lima *et al.* (1974) detectaram a presença de *C. didensii*, *C. fabiani*, *C. intermedia*, *C. norvergica*, *C. santamariae*, *Cryptococcus kuetzingii*, *K. corticis*, *P. polymorpha*, *R. pallida*, *R. rubra*, *S. bayanus* e *Trichosporon cutaneum* nas moendas de usina, que podem contribuir na colonização do mosto.

Em Minas Gerais por razões históricas e culturais, a produção da cachaça ainda segue as práticas artesanais utilizadas por vários séculos. Nestas fermentações, o inóculo é realizado naturalmente, por contaminação dos microrganismos indígenas presentes na cana, solo, maquinários e equipamentos utilizados durante o preparo do mosto. Nestas destilarias a produção da bebida inicia-se com a preparação do fermento (pé-de-cuba), que visa a propagação da microbiota presente no caldo. A composição do fermento pode variar conforme a “receita” de cada produtor, havendo casos em que ocorre a mistura de arroz, milho moído, frutas e outros substratos ao caldo de cana. A adição de farinha de soja, rica em ácidos graxos insaturados, aumenta a resistência celular a metabólitos tóxicos como o ácido hexanóico. O caldo de laranja ou limão é adicionado para acidificação do substrato. Este tipo de fermento é conhecido como “caipira”, e juntamente com o processo de fermentação espontânea e a produção artesanal caracteriza a aguardente produzida em Minas Gerais. Decorrido um período de 7 a 30 dias da preparação do fermento, alíquotas do mesmo são distribuídas às demais dornas, com posterior adição do caldo de cana (14⁰ BRIX); essa mistura constitui o mosto de cana-de-açúcar. Após o processo fermentativo, que dura aproximadamente 24 h, as células da microbiota depositam no fundo da dorna, e o mosto fermentado é então destilado. O fermento presente no fundo das dornas é reutilizado nas fermentações seguintes. Somente quando ocorrem contaminações é necessário a preparação de um novo fermento. Os microrganismos naturalmente desenvolvidos incluem leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera* e *Pichia* sendo que a espécie *S. cerevisiae* é apontada com predominante e principal responsável pela maior parcela da fermentação (Morais *et al.*, 1997).

O melhoramento da qualidade da cachaça passa, necessariamente, pela seleção de uma ou mais linhagens apropriadas, como ocorre na produção de

vinho. Propriedades fisiológicas específicas, como a resistência aos teores de açúcar e etanol no mosto, e produção de compostos aromáticos em níveis adequados são relevantes. Outra característica importante é a resistência à micocinas de leveduras contaminantes. O espectro de linhagens sensíveis e resistentes, e produtoras de micocinas em fermentações espontâneas para produção de cachaça artesanal poderá fornecer linhagens potencialmente aplicáveis como iniciadoras do processo fermentativo, e evidenciar os mecanismos que levam a fermentações defeituosas, ou à eliminação da população fermentadora, provocando prejuízos à indústria. A maioria dos componentes do aroma básico das bebidas forma-se durante a fermentação e são comuns ao vinho, conhaque, uísque, e outros destilados, independe da origem do substrato. De acordo com a literatura, as maiores diferenças na produção de compostos secundários corresponde a diferentes espécies de leveduras (Fleet & Heard, 1993; Zironi *et al.*, 1993), e dentro das espécies, a diferentes linhagens (Zea *et al.*, 1994). A influência da linhagem é, portanto, fundamental, e o papel das diferentes leveduras associadas à fermentação deve ser determinado para seleção das linhagens iniciadoras (Longo *et al.*, 1992; Romano *et al.*, 1994). O fenótipo da produção de álcoois superiores, aldeídos e outros compostos aromáticos assume importância tecnológica como caráter desejável na fermentação de cachaça. A partir do estudo da ecologia e taxonomia das leveduras fermentadoras, poderemos evidenciar o requerimento e as características desejáveis em leveduras iniciadoras da fermentação de aguardente, contribuindo para o avanço tecnológico da indústria aguardenteira que mostra grande receptividade à introdução de padrões e técnicas que elevem sua qualidade.

1.9- A sistemática de leveduras

Os critérios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, ecológicos, sorológicos e sexuais dos microrganismos são empregados, quando existentes, na taxonomia convencional. Este tipo de taxonomia confere aos fenótipos pesos diferenciados, o que significa considerar alguns testes mais importantes que

outros. O perfil fisiológico de uma comunidade de levedura é resultado da soma das habilidades fisiológicas das espécies individuais da comunidade. Esta conclusão advém da observação de que comunidades de leveduras com habilidades fisiológicas similares estão usualmente associadas com habitats filogeneticamente similares. Conseqüentemente, as fontes de carbono predominantes no habitat são, em geral, refletidas nos padrões fisiológicos das leveduras (Morais, 1991). A taxonomia convencional é importante para o trabalho de rápida identificação de microrganismos, entretanto apresenta dificuldades de aplicação na classificação de linhagens atípicas, de forma que a análise de ácidos nucléicos tem exercido impacto na taxonomia molecular microbiana (Vaughan-Martini & Martini, 1993).

A sistemática de leveduras baseada em critérios morfológicos e fisiológicos provou ser inadequada para a determinação de espécies, principalmente em grupos de leveduras de perfil nutricional restrito, como é o caso do gênero *Saccharomyces*. A introdução de técnicas moleculares possibilitou, de modo simples, a separação de taxons através da comparação de suas macromoléculas (Martini, 1992).

Nas últimas décadas com o rápido desenvolvimento da Biologia Molecular, novas técnicas para caracterização, identificação e classificação de microrganismos têm surgido. A introdução de técnicas moleculares possibilitou, de modo simples, a separação de *taxa* através da comparação de suas macromoléculas (Martini, 1992). Dentre todas as técnicas moleculares de identificação empregadas, a análise de cariótipo tem sido uma ferramenta de grande utilidade para estudos genéticos, taxonômicos, e melhoramento de linhagens industriais (Mortimer & Török, 1995). A ocorrência de polimorfismos cromossômicos pode permitir o reconhecimento e controle de linhagens comerciais e industriais de leveduras (Westhuizen & Pretorius, 1994). Desde que os métodos de cariotipagem por bandas eletroforéticas foram definidos, os estudos mostram que diferentes *S. cerevisiae* estão envolvidas simultânea ou sucessivamente na fermentação espontânea do vinho, e variam segundo fatores tais como região geográfica, condições climáticas e substratos (Veziñhet *et al.*, 1992). O estudo do cariótipo descreve o comportamento das populações particulares e permite intervir no processo fermentativo, elucidando

o caráter individual de cada fermentação espontânea ou por linhagem iniciadora específica (Schuzt & Gafner, 1992; 1994; Sabate *et al.*, 1998). Associada a hibridação, com sondas moleculares originadas de sequências genéticas clonadas, essa técnica constitui-se em um poderoso instrumento analítico que permite detectar polimorfismo quanto ao número, tamanho e intensidade das bandas cromossômicas, resultantes, provavelmente, de fenômenos como translocação, deleção e amplificação de sequências de DNA (Códon *et al.*, 1998). Técnicas empregando reações de PCR têm sido utilizadas para a separação das espécies *Saccharomyces sensu stricto* que são consideradas expressões variáveis de cromossomos integra ou fragmentariamente trocados durante as sucessivas gerações na fermentação. O conjunto das espécies *Saccharomyces sensu stricto* até agora foi estudado utilizando-se um pequeno número de linhagens de coleções, enquanto que o número real de linhagens poderia ser estimado em milhares (Cardinali & Martini, 1994). Isto torna a caracterização genômica dos isolados tropicais não só relevante, mas absolutamente necessária para a taxonomia destas leveduras.

Fundamentalmente, nosso trabalho busca o estudo da diversidade das leveduras tropicais, adotando como modelo as leveduras associadas à fermentação alcoólica. Pretende entender as interações que permitem a colonização do substrato e a sucessão de espécies durante a fermentação, definindo os requerimentos necessários para a fermentação satisfatória, do ponto de vista industrial, nas condições climáticas do Brasil. E finalmente, obter um banco de linhagens para extenso uso na seleção de linhagens fermentadoras, e na obtenção de novos produtos e processos utilizáveis. Como afirmam Ingledew & Hysert (1994), a fermentação de bebidas, por longo tempo considerada uma arte, tornou-se uma indústria rentável, que assegura a longevidade e rentabilidade das pesquisas multidisciplinares acerca da microbiologia, engenharia e química do processo fermentativo.

Bebidas e produtos fermentados, além da cachaça, têm grande interesse cultural e econômico no Brasil, e este estudo pode ser o modelo para o conhecimento e melhoramento de outras fermentações artesanais no país. O melhoramento da qualidade da cachaça passa, necessariamente, pela seleção de uma ou mais linhagens apropriadas, como ocorre na produção de alguns vinhos.

Propriedades fisiológicas específicas, como resistência aos teores de açúcar, etanol e altas temperaturas encontradas no mosto fermentado, e produção de compostos aromáticos em níveis adequados são relevantes. Duas razões importantes devem ser destacadas para o uso de linhagens iniciadoras: controle de qualidade através da garantia de que o produto final irá apresentar características específicas, fornecidas pela linhagem usada e o controle do processo pelo acompanhamento das linhagens inoculadas (Querol *et al.*, 1992). A partir do estudo da ecologia e taxonomia das leveduras fermentadoras, poderemos evidenciar o reconhecimento e as características desejáveis em linhagens iniciadoras da fermentação da cachaça, contribuindo para o avanço tecnológico da indústria aguardenteira que mostra grande receptividade à introdução de padrões e técnicas que elevem sua qualidade e representa um mercado que movimenta 6 bilhões de dólares ao ano.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

- Estudar a composição e algumas características fisiológicas e genéticas da microbiota durante a produção da cachaça artesanal, colocando à disposição do setor aguardenteiro informações e linhagens de leveduras potencialmente úteis para produção da cachaça.

2.2- Objetivos específicos

- Isolar, identificar e verificar a sucessão das leveduras mais frequentes durante o processo de fermentação espontânea na produção da cachaça artesanal.
- Verificar a eficiência dos meios de cultura empregados (Agar WL, SCY e Lisina) no isolamento de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* a partir do mosto fermentado
- Verificar a variação sazonal das linhagens de leveduras durante o período de produção da cachaça em diferentes regiões do Estado.
- Caracterizar a sucessão de leveduras durante o ciclo fermentativo de 24 horas.
- Caracterizar as linhagens isoladas do mosto fermentado quanto à resistência a toxinas “Killer”, tolerância à altas temperaturas, altas concentrações osmótica e de etanol, atividade invertásica e capacidade de acumular trealose em condições de estresse.
- Diferenciar, através de técnicas moleculares a diversidade das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* presentes nas destilarias estudadas.
- Montar uma coleção de linhagens potencialmente úteis para a produção de cachaça e colocá-las à disposição do setor aguardenteiro.

3- Trabalho 1:

Morais, P.B.; Rosa, C.A.; Linardi, V.R.; Pataro, C. & Maia, A .B. R. A. 1997.

Characterization and sucession of yeast populations associated with spontaneous fermentation during the production of the brazilian sugarcane “aguardente”. *World Journal of Microbioloy and Biotechnoloy* **13**: 241-243.

Short Communication: Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane *aguardente*

P.B. Morais*, C.A. Rosa, V.R. Linardi, C. Pataro and A.B.R.A. Maia

A succession of yeasts was observed during fermentation of *aguardente* with *Saccharomyces cerevisiae* being the predominant species. *Candida sake*, *Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilorum* and apiculate yeasts were also frequent. Transient yeast species were found in variable numbers, probably due to the daily addition of sugar-cane juice. Killer yeasts were isolated and may have a role in the exclusion of some transient and contaminant species.

Key words: Killer yeasts, spontaneous fermentations, sugar-cane *aguardente*, yeast populations.

Sugar-cane *aguardente* is a traditional Brazilian alcoholic beverage, with an alcohol content of 38 to 54 ° GL at 20 °C. Brazilian production of *aguardente* reaches more than a 10⁹ l/year during the sugar cane harvesting period, from May to December. The preparation of *aguardente* is a traditional art in the Minas Gerais State, where there are about 6000 distilleries individually producing 100 to 1000 l of the beverage daily by spontaneous fermentation of the sugar-cane juice. In these distilleries, a starter ferment ('*pé de cuba*') is prepared by various methods, including the development of the fermentative microbiota in the sugar-cane juice alone, or mixing of sugar-cane juice with rice, rotting fruits, crushed corn, and other substrates. This starter ferment is added to the sugar-cane juice, and after 18 to 48 h the fermented must is distilled and fresh juice is added to start a new cycle. Although the production of the beverage is a result of mixed and spontaneously occurring microorganisms, yeasts are responsible for the alcoholic content of the beverage (Lima 1983). The quality of the *aguardente* could be affected by the ecology of the microbial types, and by fluctuations in population counts during the fermentation process. We studied the occurrence and succession of yeasts involved in the fermentation of sugar-cane must during *aguardente* production, and examined the frequency of killer strains.

P.B. Morais, C.A. Rosa, V.R. Linardi and C. Pataro are with the Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, C.P. 486, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil; fax: 55 31 441 1412. A.B.R.A. Maia was with the Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil. A.B.R.A. Maia is now with ABM Consultoria, Rua São Paulo 824/1108, Belo Horizonte, MG, 30170-131, Brazil. *Corresponding author.

© 1997 Rapid Science Publishers

Methods

Yeast collections were carried out in an *aguardente* distillery. The sugar-cane juice is extracted in a mill, filtered and diluted to 10 to 12 °C BRIX and then added to the starter ferment, previously formed in the vat. The starter ferment was prepared by daily additions of 1:5 (v:v) aliquots of sugar-cane juice allowed to ferment in the vat for 5 d. Daily samples were taken to determine the yeast succession during colonization of the must. After 18-24 h the sugar concentration reaches zero BRIX and four fifths of the fermented must are collected for distillation of the *aguardente*. Cells are recycled in the vat for sequential fermentations for approximately 40 to 70 d. These fermentations were sampled at the beginning (0 to 6 h after juice addition), in the middle (10 to 15 h after juice addition) and at the end of the process (18 to 24 h after juice addition), in early (from 7 to 30 d of formation of the ferment), middle (from 31 to 45 d) and old (from 46 to 70 d) fermentations.

Samples were collected in sterile flasks and pH, total acidity and alcohol content were determined. Serial 10-fold dilutions of the samples were inoculated (0.1 ml) in triplicate on yeast extract-malt extract agar plus chloramphenicol (10 mg/100 ml) WL nutrient agar (Difco), and SCY agar (10% sugar-cane juice, 0.1% yeast extract, 2% agar and 10 mg chloramphenicol/100 mls). Plates were incubated at room temperature (25 ± 3 °C) for 3 to 10 d.

Each morphological yeast type was counted and representative colonies were isolated, purified, characterized according to standard methods, and identified by the keys present in Kreger-van Rij (1984) and Vaughan-Martini & Martini (1993). The detection of killer and sensitive strains was according to Young (1987), using *Candida glabrata* NCYC 388 and *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 as sensitive reference strains. To screen the killer yeasts, about 40 colonies from the highest dilution plates were inoculated on YM agar (about 10 colonies per plate) and tested for killing activity by the replica plating method using sterile velveteen cloth. An imprint of the colonies grown in YM agar plates for 24 h was made onto YM agar

containing 0.003% methylene blue pH 4.2, previously seeded with the sensitive strains, and incubated at 22 °C for 4 d.

Results and Discussion

The formation of the starter ferment corresponded to a succession of yeast species and to a rise in the population counts from 6.6×10^6 at 24 h to 3.2×10^7 c.f.u./ml at 48 h and reached a peak of 3.6×10^9 c.f.u./ml at 5 d. The number of species was high at 24 and 48 h but had decreased by days 4 and 5. *Saccharomyces cerevisiae* was the dominant species after 5 d of fermentation, and together with *Candida sake* presented high population counts at the end of starter culture formation (Table 1). *Saccharomyces cerevisiae* is also the dominant yeast in spontaneous fermentations for the preparation of Nigerian alcoholic beverages (Sanni & Lonner 1993), tequila (Lachance 1995), and wine (Thornton 1991). During the formation of the starter ferment, microbial activity pro-

moted the acidification of the must from pH 5.2 on the day 1 to 3.59 on day 5. Total acidity corresponded to 0.110 grams of acetic acid/l at the start of fermentation and to 0.461 grams acetic acid/l on day 5. The alcohol content was 0.12 grams/l on day 1 and 6.5 grams/l on day 5. On day 3, these three parameters reached maximum values and may have promoted the disappearance of some species such as the apiculate yeasts by day 4. The changes in the acidity, ethanol content and the high sugar concentrations maintained by the daily addition of sugar cane juice to the must may act together to select the prevalent yeasts that carry out the process.

Saccharomyces cerevisiae and *Candida sake* were the starters of the 24 h cycle for beverage production. The addition of juice to the ferment usually introduced four to seven species to the vats in the first phase of the process (T₁). The rise in yeast counts, mainly *S. cerevisiae*, corresponded to the disappearance of most yeasts inoculated with the juice, including the *Kloeckera* species at

Table 1. Yeast species counts and succession during the formation of the starter ferment, in 24-h fermentations, and according to the age of the vats during the spontaneous fermentations for Brazilian *aguardente* production.

Species	10 ⁻⁴ × Population counts (c.f.u./ml)										
	Formation of alcoholic ferment*					Fermentation (24 h) [†]			Fermentation age [‡]		
	1	2	3	4	5	T ₁	T ₂	T ₃	Y	M	O
<i>Candida citrea</i>						2				5	20
<i>Candida guilliermondii</i>						2	40				
<i>Candida maltosa</i>					10						
<i>Candida karawaiewii</i>						1					
<i>Candida sake</i>	70	30	220		100	10			5700	430	70
<i>Candida sake</i> killer			30	10			10		100		10
<i>Candida sorbosa</i>	2	1				1		1		10	20
<i>Candida sorboxylosa</i>		80									110
<i>Candida stellata</i>						1					200
<i>Geotrichum</i> sp.	1	1	2								
<i>Hanseniaspora</i> spp.	4	450				3					
<i>Kloeckera japonica</i>	30	80	40		20	10			4500		110
<i>Kloeckera javanica</i>		1560				3					
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i>						1					
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>drosophilaram</i>	1					1			12000	250	100
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>drosophilaram</i> killer						1			10000	100	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91	1410	4780	1930	374000	3353	134000	35600	140000	1740	4160
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> killer										20	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mal ⁻				194		105			18400	1380	2740
<i>Saccharomyces kluyveri</i> -like		30	220								
<i>Saccharomyces servazzii</i> -like			6				1000			10	
<i>Pichia etchellsii</i>	40		30								
<i>Pichia guilliermondii</i>										10	
<i>Pichia kluyveri</i>	1										
<i>Pichia membranaefaciens</i>		1								10	100
<i>Pichia</i> sp.	6						21				

* Days after first addition of juice. † Time in hours: T₁, 6–7 h; T₂, 10–15 h; T₃, 18–24 h. ‡ Y, young; M, medial; O, old fermentations.

the end of the fermentation cycle (T_3). Vats containing young fermentations produced high alcohol yields and presented higher population numbers (2×10^9 c.f.u./ml) than medial (4×10^7 c.f.u./ml) and old vats (7×10^7 c.f.u./ml). The average number of yeast species per vat was similar among vats of different ages, although older fermentations had higher diversity of species than younger ones.

Killer strains in these fermentations included *C. sake*, *Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilarum*, *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*-like and *S. servazzii*-like strains. The killer isolates of *C. sake* and *S. kluyveri*-like strains obtained from the starter ferment killed all species regarded as transient or contaminants: *C. sorbosa*, *C. stellata*, *C. guilliermondii*, *C. karawaiewii*, *P. membranaefaciens*, *Pichia* sp., *P. guilliermondii*, *Geotrichum* sp. and *C. citrea*. Some sensitive species disappeared after day 3 or 4 following starter ferment formation, probably as a result of the killing activity of *Candida sake* and the *S. kluyveri*-like strain that colonized the must by days 2 and 3. None of the killer yeasts dominated the fermentative process for *aguardente* production. More than 60% of the strains were neutral to the toxins produced by the killer isolates. In the starter ferment, 56.5% of the isolates were sensitive to killer toxins whereas sensitive strains comprised about 40% of the isolates in young vats and 32.5% in old fermentations.

Acknowledgements

We thank the Vale Verde Distillery for allowing us to use its plant facilities and Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq)-UFMG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Kreger-van Rij, N. J. W. 1984 *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Lachance, M.-A. 1995 Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**, 151–160.
- Lima, U. A. 1983. Aguardentes. In *Biotecnologia - Alimentos e bebidas produzidas por fermentação*, eds Aquarone, E., Lima, U. A. & Borzoni, W. pp. 79–103. São Paulo: Edgard Blucher Ltda.
- Sanni, A. I. & Lonner, C. 1993 Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* **10**, 517–523.
- Thornton, R. J. 1991 Wine yeast research in New Zealand and Australia. *Critical Reviews of Biotechnology* **11**, 327–345.
- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 1993 A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, 113–119.
- Young, T. W. 1987 Killer yeasts. In *The yeasts*, eds Rose, A. H. & Harrison, J. J. pp. 131–164. London: Academic Press.

(Received in revised form 30 May 1996; accepted 21 June 1996)

4- Trabalho 2:

Pataro, C., Santos, A., Correa, S. R., Morais, P.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A.

1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Rev. Microbiol.* 29: 104-108.

PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF YEASTS ISOLATED FROM ARTISANAL FERMENTATION IN AN *AGUARDENTE* DISTILLERY

Carla Pataro¹; Alessandra Santos¹; Soraya R. Correa¹; Paula B. Morais²; Valter R. Linardi¹;
Carlos A. Rosa^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; ²Laboratório de Microbiologia e Bioremediação, Fundação Universidade do Tocantins, Palmas, TO, Brasil

Submitted: October 29, 1997; Returned to authors for corrections: March 12, 1998; Approved: April 02, 1998

ABSTRACT

The physiological characteristics of 210 yeast isolates from an *aguardente* distillery of the State of Minas Gerais were studied. Among these isolates, 186 were able to grow at 35°C, and 23 at 42°C. All isolates were able to grow in medium containing 25% of glucose, except for an isolate of *Candida karawaiewii*. The majority of the isolates grew in medium with 5% ethanol, a concentration similar to that of the fermented must. Killer toxin production was detected in isolates of *Candida sake*, *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilaram*, *Saccharomyces kluyveri*-like and *Saccharomyces servazzii*-like. Forty-two isolates, which showed measurable growth in medium containing 10% (V/V) ethanol and were also sugar-tolerant, thermotolerant, and neutral or killer toxin producers, were tested for invertase production. Ten isolates of *S. cerevisiae* and one of *C. sake* showed the highest invertase activity.

Key words: Yeast physiology, spontaneous fermentation, *aguardente* production.

INTRODUCTION

Brazilian sugar-cane *aguardente* is made by spontaneous fermentation using the microbiota that develops spontaneously in a starter. The starter is prepared with sugarcane juice, crushed corn, lemons, rice, and other substrates, and allowed to ferment naturally for 5-20 days. Typical conditions during starter formation are the high concentration of fermentable sugars (between 16 and 25° BRIX) and amounts of ethanol increasing to 5 to 7 g/l in the end of the process (8). The yeast flora arises from equipment, vats and the sugarcane. After this, the starter is added to the vats and sugarcane juice is added. The fermentation cycles normally last 18-48 hours, after which 4/5 of the fermented must is distilled and fresh sugarcane juice is added to the

remainder to begin a new fermentation cycle. The fermentations are carried out at temperatures around 28°C. In the state of Minas Gerais, more than 8,000 distilleries produce about 130 million's liters/year, from May to December, and the production is completely artisanal.

The short fermentation cycles, the daily addition of sugarcane juice, and the low amounts of ethanol in the must are the usual characteristics of artisanal *aguardente* production. The yeast communities present in such fermentations are in constant succession, and the species present in the fresh sugarcane juice are constantly introduced in the microenvironment of the fermentation vat. *Saccharomyces cerevisiae* is the prevalent species, but apiculate yeasts (mainly *Kloeckera japonica*), *Candida*, *Kluyveromyces* and *Pichia* species are

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil; E-mail: carlrosa@mono.icb.ufmg.br

Table 1. High temperature growth and ethanol tolerance levels of yeasts isolated from an *aguardente* distillery.

Species	Number of isolates	Temperatures (°C)				Alcohol concentration (%)		
		35	37	40	42	5	8	10
<i>Candida citrea</i>	6	6	4	-	-	6	5	2
<i>Candida maltosa</i>	1	1	1	1	1	1	-	-
<i>Candida sake</i>	27	27	24	8	-	27	22	3
<i>Candida sorbosa</i> -like*	9	9	7	-	-	9	8	4
<i>Candida sorboxylosa</i>	5	4	4	-	-	4	4	3
<i>Candida stellata</i>	3	2	1	-	-	3	3	1
<i>Candida karawaiewii</i>	2	1	1	-	-	2	2	1
<i>Geotrichum</i> sp.	5	4	4	-	-	4	4	-
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	1	1	1	-	-	1	1	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2	1	-	-	-	2	2	1
<i>Kloeckera japonica</i>	30	15	9	3	1	22	17	7
<i>Kloeckera javanica</i>	4	4	2	-	-	2	2	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2	2	2	1	-	2	1	1
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilum</i>	12	12	8	4	3	12	11	1
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>Pichia etchellsii</i>	2	2	2	1	1	2	2	-
<i>Pichia guillermoidii</i>	2	2	2	2	2	2	2	-
<i>Pichia kluyveri</i>	2	2	2	2	-	2	2	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	6	2	2	-	-	6	4	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76	76	57	35	11	76	76	57
<i>Saccharomyces kluyveri</i> -like	3	3	3	3	2	3	3	1
<i>Saccharomyces servazzi</i> -like	8	8	5	3	1	8	8	4
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1	1	1	1	-	1	1	1
TOTAL	210	186	143	64	23	198	181	90

* Probable new species similar to the species indicated.

of the killer yeasts species dominated the fermentative process for *aguardente* production. The four killer isolates of *C. sake* obtained from the starter killed 64 isolates of 23 species (Table 2), including two isolates of *S. cerevisiae* and all species considered transients or contaminants (8). Killer isolates of *C. sake* from the fermentation vats had a narrower spectrum of activity than those of the

starter. *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilum*, isolated from the *aguardente* fermentation, had two different killer phenotypes. Four isolates killed 13 species, including *S. cerevisiae* and *C. sake*, whereas another isolate killed solely *P. kluyveri* var. *kluyveri*, *C. stellata*, *K. japonica*, *P. membranaefaciens* and *K. marxianus*. Radler et al. (10) isolated four different killer phenotypes of *Hanseniaspora uvarum* and

Table 2. Frequency of isolation and detection of yeast producing killer toxins and sensitive isolates from the starter and fermentation vats.

Species	Killer isolates*	Origin	Spectrum of Activity		
			Species n=23	Isolates n=210	<i>S. cerevisiae</i> n=76**
<i>Candida sake</i>	4 (6)	Starter	23	64	16
	5 (21)	Fermentation vat	13	47	12
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilum</i> A	4 (12)	Fermentation vat	13	49	15
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilum</i> B	1 (12)	Fermentation vat	6	10	-
<i>Pichia kluyveri</i>	1 (2)	Starter	4	11	1
<i>Saccharomyces kluyveri</i> - like	2 (3)	Starter	14	54	11
<i>Saccharomyces servazzi</i> - like	1 (8)	Starter	6	9	-

* Number in parenthesis represent the total number of isolates tested for killer activity.

** Number of *Saccharomyces cerevisiae* isolates are included in the total number of isolates, and represent the number of isolates of this species that are sensitive to killer toxins.

frequently isolated (8). Other important characteristic of spontaneous fermentations is the presence of killer yeasts (13). It has been suggested that the killer phenomenon is a mechanism of antagonism among yeasts during spontaneous fermentations and that killer strains may dominate the end fermentations in wineries (1, 4). Morais et al. (8) have shown that the majority of the strains isolated from an *aguardente* distillery were neutral to toxins produced by killer yeasts.

The physiological abilities of the yeast strains isolated from fermented must have a special relevance in understanding the mechanisms involved in must colonization, and determining the optimum conditions to maintain healthy fermentations. In this work, osmotolerance, ability to grow at high temperatures and high alcohol concentrations, patterns of killer toxin resistance and sensitivity among prevalent yeasts and invertase activity from strains isolated of an *aguardente* distillery in the State of Minas Gerais were studied.

MATERIALS AND METHODS

Two hundred and ten yeasts were isolated from one *aguardente* distillery in State of Minas Gerais, as described in Morais et al. (8). The strains were characterized according to standard methods (12), and identified by the keys of Kreger-van Rij (5), Barnett et al. (2) and Vaughan-Martini and Martini (14).

The yeast isolates from the fermentation vats were grown on modified Sabouraud agar (glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, and agar 2%) at room temperatures for 24 hours, and 0.1 ml of a suspension containing 1×10^7 cells was inoculated in the following media: Sabouraud broth with 15, 20 and 25% of glucose, to test osmotolerance; Sabouraud broth with 5, 8 and 10 g/l of ethanol (ethanol was added after sterilization and the tubes were covered with a parafilm to avoid ethanol evaporation); and in Sabouraud broth incubated in water bath at 32, 35, 37, 40 and 42°C. Osmotolerance and ethanol resistance was determined at room temperature ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). Yeast growth was evaluated by visual turbation of the liquid medium and the viability by the methylene blue method (6).

The killer toxin production was screened according to Young (15) and Starmer et al. (11), using *Candida glabrata* NCYC 388 and *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 as sensitive reference strains. Killer strains obtained were tested for killer activity

against all the isolates obtained from the fermentation. YM agar supplemented with 0.003% methylene blue and buffered to pH 4.2 with sodium acetate, previously seeded with the sensitive strains, was inoculated with the killer strains (10 per plate) and incubated at 22°C for four days. Strains were identified as killer if they produced a halo of dark blue dead cells or a zone of inhibition surrounded by a halo of dead cells.

Strains that were able to grow at 37°C, in medium with 25% of glucose and 10% of ethanol, and that produced killer toxins or were neutral to toxins produced by killer strains were tested to invertase production. The invertase activity was measured by the dinitrosalicylic acid (DNS) colorimetric test, as described in Ekisanmi and Odunfa (3). Each yeast was grown on Sabouraud agar for 48 hours, the cells were diluted in sterile water, washed by centrifugation, and 0.1 g wet weight of each was resuspended in 10 ml of acetate buffer, pH 5.0. One ml of each cell suspension was added to 2 ml of 4% sucrose solution in the same buffer and incubated for 5 min. at 30°C. One unit of invertase activity was defined as the amount of enzyme which liberated one $\mu\text{mol}/\text{min}$ of reducing sugars under these conditions. All the experiments were made in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The microenvironment of the *aguardente* fermentation was selective for osmotolerant yeasts. All strains grew in medium with 25% of glucose, except for a strain of *Candida karawaiewii*. The majority of the yeast isolates were able to grow at 35°C, but only 10.9% grew at 42°C (Table 1). Some strains, including three isolates of *K. japonica*, grew in temperatures higher than those described for this species. This characteristic was also observed with apiculate yeasts isolated from *Drosophila* in Atlantic Rain Forests in Rio de Janeiro (7). In general, *S. cerevisiae* isolates were the most resistant to the high alcohol concentration: 75% were able to grow in the presence of 10% of alcohol. The yeast viability in the above experiments was around 90%. These results showed that the yeasts isolated from *aguardente* fermentation were adapted to grow at alcohol concentrations typical of those found at the end of the fermentative process (5 to 7 g/l).

Killer strains were isolated throughout the fermentation process as well as in the starter ferment. They included *C. sake*, *K. lactis* var. *drosophilarum*, *S. kluyveri*-like and *S. servazzii*-like (Table 2). None

Table 3. Invertase activity of selected *aguardente* yeasts.

Species	Number of isolates tested	Invertase activity*				
		<10	11-50	51-100	101-200	>200
<i>Candida sake</i>	2	1	-	-	-	1
<i>Candida stellata</i>	1	-	1	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35	10	3	12	10	-
<i>Saccharomyces servazzii-like</i>	3	-	2	1	-	-
<i>Torulopsis delbrueckii</i>	2	-	-	2	-	-
TOTAL	43	11	6	15	10	1

* μmol reducing sugar/mg/cell/min. at 30°C

seven killer phenotypes for *P. kluyveri*. So far at least three killer phenotypes have been observed in *S. cerevisiae* (9, 15).

Ekusanmi and Odunfa (3) have shown that high invertase activity is required for yeast growth in molasses, where the principal carbohydrate is sucrose. From 42 *aguardente* yeast isolates tested for invertase activity, 10 isolates of *S. cerevisiae* produced more than 100 $\mu\text{mol}/\text{min}$ reducing sugar (Table 3); in one strain of *Candida sake*, the rate was 400 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Most of these *S. cerevisiae* isolates would be suitable as a starter for *aguardente* production. From this, we concluded that the yeasts found in Brazilian *aguardente* fermentations were well adapted to the environmental conditions prevailing in the fermentation vats, and that some of the strains isolated could be used advantageously as starter cultures for the production of sugarcane *aguardente*.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial support from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG- processo nº 2659), the Pró-Reitoria de Pesquisas-UFMG, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the Vale Verde Distillery for allowing us to use its plant facilities, and Dr. Marc-André Lachance's suggestions to improve the manuscript.

RESUMO

Caracterização fisiológica das leveduras isoladas na fermentação artesanal em uma destilaria de aguardente

Foram estudadas as características fisiológicas de 210 linhagens de leveduras isoladas de um alambique

de aguardente artesanal do Estado de Minas Gerais. Das linhagens isoladas, 186 cresceram a 35°C e 23 cresceram a 42°C. Todos os isolados, exceto uma linhagem de *Candida karawaiewii*, cresceram em meio contendo 25% de glicose. A maioria dos isolados cresceram em concentração de 5% (v/v) de etanol, concentração similar àquela encontrada no mosto fermentado. As linhagens de *Candida sake*, *Kluyveromyces lactis* var *drosophilorum*, *Saccharomyces kluyveri*-similar e *Saccharomyces servazzii*-similar produziram micocinas. Quarenta e duas linhagens que foram capazes de crescer em meio contendo 10% de etanol, e mostraram-se termotolerantes, osmotolerantes, neutras ou produtoras de micocinas, foram testadas quanto a capacidade de produzir invertase. Dez isolados de *S. cerevisiae* e uma linhagem de *C. sake* apresentaram maior atividade invertásica.

Palavras-chave: Fisiologia de leveduras, fermentação espontânea, produção de aguardente

REFERENCES

1. Cansado, J.; Longo, E.; Calo, P.; Sieiro, C.; Velazques, J.B.; Villa, T.G. Role of killer character in spontaneous fermentation from NW Spain: ecology, distribution and significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 643-7, 1991.
2. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
3. Ekusanmi, T. J.; Odunfa, S. A. Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 672-5, 1990.
4. Jacobs, C. J.; Fourier, I.; Vuuren, H. J. J. Characterization of killer yeast isolates from chenin blanc grape skins. *Afr. J. Enol. Vitic.* 12: 57-63, 1991.
5. Kreger-van Rij, N.J.W. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1984.
6. Laluece, C.; Abud, C.L.; Greenhalf, W.; Sanches, M.F. P. Thermotolerance behavior in sugar cane syrup fermentations of wild type yeast strains selected under pressures of temperature, high sugar and added ethanol. *Biotech. Lett.* 15: 609-614, 1993.

7. Morais, P. B.; Hagler, A. N.; Rosa, C. A.; Mendonça-Hagler, L. C.; Klaczko, L. B. Yeasts associated with *Drosophila* in Tropical Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 38: 1150-1155, 1992.
8. Morais, P. B.; Rosa, C. A.; Linardi, V. R.; Pataro, C.; Maia, A. B. R. A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of the Brazilian sugar-cane *aguardente*. *World J. Microbiol. Biotech.* 13: 241-243, 1997.
9. Pfeifer, P.; Radler, F. Purification and characterization of extracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2699-706, 1982.
10. Radler, F.; Pfeiffer, P.; Dennert, M. Killer toxins in new isolates of the yeasts *Hanseniospora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29:: 269-72, 1985.
11. Starmer, W.T.; Ganter, P.F.; Aberdeen, V. Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 990-7, 1992.
12. van der Walt, J. P.; Yarrow, D. *Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts*. In: *The yeasts: a taxonomic study*. N.J.W., 3rd edition. Amsterdam, Elsevier Publ. B.V., 1984, pp. 34-103.
13. Van Vuuren, H. J. J.; Jacobs, C. J. Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 119-128, 1992.
14. Vaughan-Martini, A.; Martini, A. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.* 16: 113-9, 1993.
15. Young, T. W. 1987. Killer Yeasts. In: *The yeasts*. Vol. 2. Edited by A. H. Rose and J. S. Harrison. Academic Press, London., 1987, pp. 131-164.

5- Trabalho 3:

Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000a. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentations in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, in press.

From: **Professor Duncan E S Stewart-Tull**
Chairman of Editorial Boards

Division of Infection and Immunity,
Institute of Biomedical and Life Sciences,
Joseph Black Building,
University of Glasgow,
Glasgow, G12 8QQ, UK

6 March 2000.

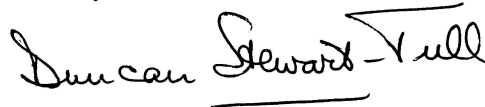
Dear Dr. Rosa,

Accession No. 185/2/00 (old 7142/4/99)

Thank you very much for sending me your revised paper. I am pleased to report that this is now accepted for publication in the Journal of Applied Microbiology. I shall be pleased if you will sign and return one copy of the enclosed copyright form to Mrs. Miller (label enclosed). If there are no further queries in regard to the presentation of the manuscript you will receive proofs from the publishers in due course. If you have any further queries regarding publication you should contact the publishers directly - **Ms Andrea Crisp, Blackwell Science, 25 John Street, London WC1 2BL**, Tel: 0171 404 4101 quoting the Accession Number at the top of this letter.

Once again thank you for considering publishing your work in the official Journal of the Society of Applied Microbiology.

With best wishes,
Yours sincerely,



Prof. D.E.S. Stewart-Tull.

Tel: 0141-330-5838 Fax: 0141-330-4600

E-Mail: d.stewart-tull@bio.gla.ac.uk Web site: www.sfam.org.uk

Secretary to Board: Mrs Helen Miller Tel: 0141-330-6536 Fax: 0141-330-4600 E-Mail: h.miller@bio.gla.ac.uk

Desk Editor Blackwell Science: Mr. Dean Gurden Tel: 0171-404-4101 Fax: 0171-831-6745 E-Mail: dean.gurden@blacksci.co.uk

Registered charity no. 326509

VAT registration no. 695 1572 03

**YEAST COMMUNITIES AND GENETIC POLYMORPHISM OF *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* STRAINS ASSOCIATED WITH ARTISANAL FERMENTATION IN
BRAZIL**

Carla Pataro¹, Juliana B. Guerra^{1,2}, M. L. Petrillo-Peixoto^{1,3}, Leda C. Mendonça-
Hagler², Valter R. Linardi¹ & Carlos A. Rosa¹

1 Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil;

2 Instituto de Microbiologia, Bl. I - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de
Janeiro-RJ, 21941-590, Brazil.

Running headline: yeasts from artisanal fermentation

Key words: artisanal fermentations, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, genetic
polymorphism

Corresponding author:

Carlos A. Rosa

Departamento de Microbiologia, ICB, C. P. 486

Universidade Federal de Minas Gerais,

Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil - Fax: 55 31 4992730

E-mail: carlrosa@mono.icb.ufmg.br

³ Deceased

SUMMARY

We have studied yeast communities and genetic polymorphism of prevalent *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the spontaneous fermentation of the sugar-cane juice during the production of *aguardente* in three distilleries in the state of Minas Gerais, Brazil. *Saccharomyces cerevisiae* was the prevalent species during the process of *aguardente* production, but *Schizosaccharomyces pombe* was predominant in old fermentations in one distillery. Transient yeast species were found in a variable number, probably due to the daily addition of sugar-cane juice, and they were different for each of the three distilleries studied. PFGE and PCR analysis of the predominant strains of *S. cerevisiae* isolated from the fermented must showed a high degree of genetic polymorphism among the three distilleries. A high molecular variability of *S. cerevisiae* strains was also observed among strains isolated from the same vat at different fermentation ages. Our results showed that there was a succession of genetic different strains of *S. cerevisiae* during the process of *aguardente* production.

INTRODUCTION

Sugar-cane *aguardente* is the most traditional alcoholic beverage produced in Brazil and it is obtained by the distillation of the fermented must from sugar-cane juice. The alcohol content of sugar-cane *aguardente* can reach 38 to 54 °GL at 20 °C. The national production is estimated in 2 billion liters/year, and the state of Minas Gerais produces 130 millions liters/year during the sugar cane harvesting period, from May to December. There are about 8,000 distilleries spread all over the state of Minas Gerais, where the production of *aguardente* is artisanal (Ribeiro, 1997).

An important feature of the artisanal production of *aguardente* is the preparation of the starter ferment. It arises from the microbiota present in the sugar-cane juice, in the fermentation vats and equipment. The development of the ferment occurs inside the fermentation vat, using about 1/5 of its volume capacity, and it is the result of sugar-cane juice association with other substrates, used as nutritional complement, such as crushed corn, rice or soy powder. After a period of time that varies from 5 to 20 days, the number of yeasts reaches a level that is high enough to allow the beginning of the fermentation cycle, which consists in daily addition of sugar-cane juice until the completion of the vat volume. Morais *et al.* (1997) observed that during the formation of the starter ferment and the fermentation cycle, which varies from 12 to 48 hours, there was a succession of yeast species, being *Saccharomyces cerevisiae* the predominant species.

Most of the yeast species isolated from the artisanal fermentation, including *S.cerevisiae*, are physiologically adapted to the environmental conditions observed in the fermentation vats. They are able to grow at 37°C, in medium with 50% of

glucose and 8% of ethanol. The majority of yeast species are neutral to the toxins produced by the killer strains and they also show high levels of invertase activity (Pataro *et al.*, 1998). Strains of *Saccharomyces* isolated in tropical areas, as the one isolated during the production of sugar-cane *aguardente*, could form genotypes that differ from the known yeast strains. Several studies have shown that a great number of strains of *S. cerevisiae* could be simultaneously involved in the wine fermentation process (Bidene *et al.*, 1992; Vezinhet *et al.*, 1992; Polsinelli *et al.*, 1996). The high polymorphism observed among these strains constitute a powerful tool to analyze the indigenous microflora that is formed during the spontaneous grape must fermentations (Vezinhet *et al.*, 1992; Polsinelli *et al.*, 1996). In this study, we have evaluated the yeast species involved in the fermentation of sugar-cane must during the *aguardente* production in three distilleries in the State of Minas Gerais, and the genetic diversity of the prevalent *S.cerevisiae* strains.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Yeast collections were carried out in three *aguardente* distilleries from July to November of 1995. The distilleries were located in the cities of Cordisburgo (Distillery A), Lagoa Santa (Distillery B) and Ouro Preto (Distillery C), in the state of Minas Gerais. In these distilleries the sugar-cane juice is extracted in a mill, filtered and diluted in water to a final concentration of 12 to 14^o BRIX and then added to the starter ferment, previously formed in the vat. These fermentations were sampled in young (from 7 to 30 d of formation of the ferment), in medial (from 31 to 60 d) and old vats (from 61 to 120 d). In one distillery, samples were taken to determine the yeast succession during the formation of the starter ferment. This starter ferment was

prepared by mixing sugar cane juice, small pieces of sugar cane and corn meal powder and allowed to ferment in the vat for six days. After that sugar cane juice was added and the fermentation cycle began. Samples were collected from the fermentation vats in sterile 500 ml flasks, transported to the laboratory in an ice bath and processed within five hours.

Yeast isolation and identification

Serial 10-fold dilutions of the samples were inoculated (0.1 ml) in triplicate on WL nutrient agar (Difco) plus chloramphenicol (0,01%) and SCY agar (10% sugar-cane juice, 0.1% yeast extract, 2% agar and 0,01% chloramphenicol). Plates were incubated at room temperature ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) for 3 to 10 d. Each morphological yeast biotype was counted and representative colonies were isolated, purified and characterized according to standard methods (Van der Walt and Yarrow, 1984). The yeasts were identified by the keys present in Kurtzman and Fell (1998) and Barnett et al. (1990)

Electrophoretic karyotype and hybridization

Prevalent *S. cerevisiae* strains were selected for a comparative electrophoretic karyotyping analysis. In two distilleries (B and C), *S. cerevisiae* strains were collected from young, middle and old fermentations of the same vat. Yeast chromosomes were isolated by a modified method described by Schwartz and Cantor (1984). Isolated colonies were grown overnight (16h) in 50 ml of YPD medium (1% yeast extract; 2% dextrose; 2% peptone) on a rotary shaker at 25°C . A total of 2×10^9 cells of each strain were harvested and washed sequentially with 50 mM EDTA pH 8.0. The pellet was resuspended in 1ml of EDTA, pH 8.0 and Novozym 234™ (Novo Biolabs) was

added to a final concentration of 10 mg ml⁻¹. Cell suspensions were mixed with 1% low melting preparative grade agarose (SIGMA) and put into the sample plug mold (0,1 ml). Solidified agarose plugs were placed into 7.5% β-mercaptoethanol in 0,5 M EDTA, pH 8.0 (v/v) and incubated at 37°C for 24h. After washing two times with 50 mM EDTA, pH 9.0, 1.2 ml of ESP buffer (0.5M EDTA pH 9.0; 1% N-Laurylsarcosine; 1mg ml⁻¹ Proteinase K) was added and the agarose plugs were incubated at 50°C for 48h. The agarose samples were stored in 0.5 M EDTA, pH 8.0. Yeast chromosomes were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), performed with a Gene Navigator apparatus (Pharmacia). Electrophoresis conditions in TBE buffer (Tris base 45mM, Boric acid 44.5mM and EDTA 1mM) at 12°C were: interpolation of pulse time 140-20s for 35h and 75-15s for 7h (Török et al., 1996). Chromosomes from *S. cerevisiae* YNN295 (Bio-Rad) were used as size standards. The gel was stained with ethidium bromide, washed in water and photographed.

Chromosomes separated by PFGE were transferred onto nylon membranes (Southern, 1975) according to the manufacturer's instructions (Gene Screen Plus; New England Nuclear, Boston, Mass), except that 10x SSPE (1.5 M NaCl, 0.1 M NaH₂PO₄, Na₂EDTA, pH 7.0) was used instead of 10x SSC. The probes *Ade2* and YNLO75W (Kindly provided by Prof Carlos Renato Machado, Brazil) corresponding to chromosome XVI and XIV, respectively, were labeled with [α^{32} -P]-deoxy cytidine triphosphate by random priming (Feinberg and Vogelstein 1983). Blots were hybridized at 56°C (Church and Gilbert 1984) and washed at low stringency (2 x SSPE) at room temperature for 15 min. The membranes were exposed to Kodak X-Omat diagnostic film and stored at -20°C in cassettes. The membranes were exposed from two to seven days, depending on the probe intensity.

DNA Extraction and PCR assay

Yeast DNA was purified according to modified protocol of Sambrook *et al.* (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* isolates were grown on Sabouraud agar and after 48 h of incubation the cells were resuspended in 1ml citrate-sorbitol buffer, pH 4-5 (sorbitol 1,1M and sodium citrate 0,1M) and centrifuged for 3 min at 12000 rpm. The pellet was resuspended in 1ml citrate-sorbitol buffer, pH 4-5 and treated with 200µg/ml glucanase. After 3 h of incubation at 37°C, the suspension was centrifuged for 3 min at 12000 rpm. The pellet was resuspended in 0,5 ml of lysis buffer (Tris-HCl 0,04M, NaCl 0,02M, SDS 1,5% and EDTA 0,01M) and the DNA was extracted with 0,5 ml of Phenol. The suspension was vortexed and centrifuged for 2 min at 14000 rpm, 4°C. The supernatant was transferred to a new tube and re-extracted with 0,5 ml of phenol/chloroform/isoamyl alcohol. The supernatant was then mixed with 0,5 ml chloroform/isoamyl alcohol and centrifuged for 2 min at 14000 rpm, 4°C. The supernatant was treated with 2µl RNase (10 mg/ml) and incubated for 30 min at 37°C. Sodium acetate 1:10 and 2 volumes of ethanol 95% were added and DNA was precipitated overnight at -20°C. The DNA was recovered by centrifugation for 20 min at 14000 rpm at 4°C, and washed with 0,5 ml ethanol 70%. DNA was resuspended in TE buffer (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) and quantified in an agarose gel.

PCR reactions were carried out in a thermal cycler model (PTC 100, MJ Research, Inc). The primer (E11) used contains sequences complementary to intron splice sites that target mutable regions of the *Saccharomyces* genome. The nucleotide sequences were 5'-CTGGCTTGGTGTATGT-3' where the underlined nucleotides are conserved with the intron splice (Barros Lopes *et al.*, 1996). Each PCR assay was performed in 10µl reaction mixture containing 1µl DNA, 1µl primer

10 μ M EI1, 1 μ l PCR buffer 10X, 0,5 μ l dNTP's (2,5 mM each), and 0,3 μ l *Taq* DNA polymerase (5U/ μ l). Samples were overlaid with 10 μ l of mineral oil prior to PCR amplification. PCR conditions were: 5 min at 95 $^{\circ}$ C, followed by 2 cycles at 30 $^{\circ}$ C for 2 min, extension for 30 sec at 72 $^{\circ}$ C and denaturation for 30 sec at 95 $^{\circ}$ C. Additionally, 32 cycles of annealing temperature for 2 min at 40 $^{\circ}$ C, extension for 30 sec at 72 $^{\circ}$ C and denaturation for 30 sec at 95 $^{\circ}$ C were performed. After the last cycle, there was a cycle of annealing for 2 min at 40 $^{\circ}$ C and extension for 5 min at 72 $^{\circ}$ C. PCR products were analyzed by 5% polyacrylamide gel electrophoresis, conducted in TBE (Tris base 90mM, Boric acid 89mM and EDTA 2mM) buffer at 120v for 3:30 h. The gel was stained with silver nitrate and scanned. PCR profiles were analyzed using the program TREECON for Windows (Van de Peer and Wachter, 1994).

RESULTS

Table 1 represents the succession of yeast species during the formation of the starter ferment in the distillery A. Species of *Candida* spp., *Pichia anomala*, *Pichia* spp. and *Kluyveromyces marxianus* were found since the beginning of the formation of the starter ferment, but they disappeared by the day 4. *Kloeckera japonica* was also isolated in the first day reaching the highest counts at day 6. Species of *Saccharomyces servazzii*-like, *Kluyveromyces lactis* var *drosophilum*, *S.cerevisiae* and *Pichia membranifaciens* were only detected since the day 4 and *S.cerevisiae* was the dominant species at the end of the starter culture formation.

Table 2 shows the yeast populations found in the three distilleries in the vats containing young, middle and old fermentation, which correspond to the beginning, the middle and the end of the *aguardente* production, respectively. *Saccharomyces*

servazzii, *P. anomala*, *S. unisporus* e *Torulaspora delbrueckii* were exclusively isolated from young vats, and *C. glabrata*, *C. colliculosa*, *P. fabianii*, *C. krusei* and *S. kluyveri* were only found in the vats of middle phase fermentations. Most of *C. stellata*, *C. valida*, *Saccharomyces exiguus*, *Kluyveromyces* spp. and *Schizosaccharomyces pombe* strains were found in the old vats, at the end of the fermentation process. *Saccharomyces cerevisiae* was the prevalent species during all period of *aguardente* production, but *S. pombe* was prevalent in old fermentations in the distillery C. Analysis of the presence of yeasts and age of the fermentation vats, in the three distilleries, showed that the number of species varied from 4 to 6 in the young vats, 2-6 in the medial and 3-7 in old fermentation vats. Yeast counts and the number of species per vats of different ages were similar for the distilleries A and B. In the distillery C, older fermentations presented a higher number of yeast species than the younger ones. It was also observed in the three distilleries that there was a decrease in the *S. cerevisiae* population in old fermentation vats when comparing with the medial vats. The SCY agar used for the isolation of yeasts showed a population counts slightly higher than the WL agar. However, the WL agar presented a higher diversity of yeast species (data not shown).

Figure 1 shows the electrophoretic karyotypes and chromosome hybridization of the prevalent *S. cerevisiae* strains. All karyotypes contained high number of chromosomal bands, with molecular sizes ranging from 225 to 2,200 kb. The 22 strains analyzed presented electrophoretic profiles that were distinct from each other. Strains isolated from the same vat at different fermentation ages have also showed different profiles. One strain (UFMG95-A276) that was isolated from the starter ferment presented a karyotype profile that was different from the prevalent strain isolated in the beginning of the fermentation period. Hybridizations using

chromosomes XIV and XV probes were able to distinguish at least five different genotypes in the three distilleries. Distilleries A and B presented two different genotypes and the distillery C showed three genotypes. The strains from distillery B presented two bands for the chromosome XIV and the strains from distilleries A and C presented two bands for the chromosome XV. The strains UFMG95-A670 and UFMG95-A292 showed bands for chromosome XV, completely distinct from the others strains analyzed.

Figure 2 showed the PCR profiles obtained using the primer EI1. In the three distilleries it was observed at least five different PCR profiles. In the distillery A, three strains (UFMG95-A542, A540 and A555) presented similar profiles. However, a unique profile was observed for strain UFMG95-A292. This strain presented a karyotype, hybridization and PCR profiles completely different from all the other strains analyzed. Two strains from distillery A (UFMG95-A243 and UFMG95-A445) presented the same PCR profile, but different profiles after hybridization and PFGE analysis. All strains from distilleries B and C showed different PCR profiles. The results obtained by PCR analysis were able to distinguish strains that presented similar profiles after hybridization

DISCUSSION

The succession of yeast species and the prevalence of *S. cerevisiae* during the production of sugar-cane *aguardente* were similar to what have been observed during the wine production by spontaneous fermentation (Fleet *et al.*, 1984; Thornton, 1991). Morais *et al.* (1997) have observed that during the starter ferment formation the microbial activity promoted the acidification of the must and an

increase on its alcohol content, leading to the disappearance of some yeast species. These changes in the must pH and alcohol content, together with the sugar concentration, which is kept high due to the daily addition of fresh sugar-cane juice affect the selection of prevalent yeast species and strains involved in the production of *aguardente*. Ethanol tolerance and the adaptation to high acidity were also responsible for the persistence of some species and the disappearance of others during the wine fermentation process (Thornton, 1991).

Analysis of yeast populations found in the different *aguardente* distilleries showed that some species were specific for each distillery. On the other hand, other species, besides *S.cerevisiae* and *S.paradoxus*, were isolated in the three distilleries, indicating that the daily addition of sugar-cane juice to the fermented must could be responsible for the introduction of yeast species in the vats. *Saccharomyces cerevisiae* was the predominant species during the entire process of *aguardente* production, except in the distillery C, where *S. pombe* was the prevalent species at the end of the fermentation process. Strains of *S.cerevisiae* were also prevalent in spontaneous fermentations for the preparation of Nigerian traditional alcoholic beverages (Sanni and Lonner, 1993), tequila (Lachance, 1995), and wine (Polsinelli *et al.*, 1996; Vezinhet *et al.*, 1992; Thornton, 1991). The decrease in the *S.cerevisiae* population observed during the fermentation period could be attributed to the lack of nutrients added (crushed corn, rice and soy powder) during the formation of the starter ferment, to the high temperatures in the fermentation vats, specially at the end of the *aguardente* production, which occurred in the summer season and to the presence of secondary metabolites which could inhibit the growth of *S.cerevisiae*.

The SCY agar was used as an attempt to reproduce the nutrient source present in the fermentation vats. In this medium, sucrose from the sugar-cane juice

was the most important source of sugar. The high yeast counts obtained in this medium were probably due to the selection of *S. cerevisiae* populations, which produce high invertase activity (Pataro *et al.*, 1998). However, this medium did not provide reliable data on the counts of non-*Saccharomyces* species in *aguardente* fermentation because these yeasts species were present in much lower numbers than the dominant *Saccharomyces* species. The WL agar showed to be suitable for the isolation of a higher diversity of yeast species, probably because it was a less selective medium, allowing the growth of non-*Saccharomyces* species.

Baden *et al.* (1992) showed that the polymorphism could be associated to the chromosome size and this could be partially explained by structural reorganization. These variations could be attributed to differences in chromosomes mobilities or to the presence of doublets. Those modifications could be observed in homologous chromosomes from diploid or polyploid strains and occurs with a relatively high frequency during the mitose. According to Longo and Vezinhet (1993), the yeast species involved in the fermentation of beverages are at least diploid and some of the differences observed could be attributed to its heterozygotic structure that allows the occurrence of different sizes for homologous chromosomes. It happens more frequently for the chromosomes I, VI and VIII, which could present two different bands corresponding to the same chromosome. Probably, due to this fact, in the region of chromosomes I and IV, must have occurred an increase in the number of bands for some strains isolated from the *aguardente*. The band that presented less modification corresponds to chromosome IX, which differs from other chromosomes that showed to be more susceptible to changes. Some authors suggested that the six smallest chromosomes are not equally susceptible to structural changes (Longo and Vezinhet, 1993). As the fermentation of sugar-cane must is a short cycle that varies

from 18 to 24h, the strains could be more susceptible to rearrangements in the genome structure. However, it is not known how long could take for those variations to happen in nature. Mortimer *et al.* (1994) have developed a model called "genome renewal" to explain the rapid evolution of the wine-fermenting yeast strains. They have proposed that new genotypes could arise from the homothallic diploid strain, changing the multiple heterozygotes into homozygote diploid. Some of that new diploids could exhibit a more suitable adapting condition than their ancestral and could replace the original strain. We have analyzed the chromosome polymorphism using probes Ade2 and YNLO75W for the chromosomes XV and XIV, respectively. These probes were able to show significant differences in the mobility of these chromosomes. This fact indicates that this polymorphisms are result of chromosomic rearranges which might have occurred during the growth of yeasts in the fermentation vats (Versavaud *et al.*, 1995, Codon *et al.*, 1998; Nadal *et al.*, 1999).

PCR analysis using the primer EI1 that contains sequences complementary to yeast intron splice sites was a useful tool for the distinction of *S. cerevisiae* strains isolated from *aguardente* fermentation. Barros Lopes *et al.* (1996) showed that this primer was able to separated commercial *S. cerevisiae* wine strains. According to these authors, the advantage of this technique is the ability to analyze many samples in a single day allowing its use for monitoring the growth of yeasts during propagation in fermentation for routine quality control. The PCR profiles obtained in our work showed that there was a high level of polymorphism in the genome of the yeast studied. Furthermore, this technique showed to be useful for following the yeast succession of *S. cerevisiae* strains during the short fermentative cycles of artisanal production of *aguardente*. The use of the three molecular techniques

showed a high molecular diversity for the prevalent *S. cerevisiae* strains during the production of aguardente.

The artisanal sugar-cane fermentations were done at high environmental temperatures (between 25 and 40°C), high alcohol contents and daily fermentation cycles. The high molecular diversity observed among the prevalent *S. cerevisiae* strains could be due to those peculiar characteristics of the *aguardente* production process. These fermentation environments could represent an important reservoir for new yeast biotypes with potential industrial applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Associação Mineira dos Produtores de Aguardente de Qualidade (AMPAQ) and the *aguardente* producers Rodrigo Cisalpino, Acácio de Paula and Dr Romeu Ibraim for allowing us to use their plant facilities. We thank the financial support from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Pró-Reitoria de Pesquisas-UFMG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and PADCT (process number 62.0477/98-9). We also thank Dr. Elizabeth S. A. Moreira, Dr. Gloria Regina Franco and Charles Anacleto by their help during this work.

REFERENCES

Barnett, J.A, Payne, R.W and Yarrow, D. (1990) *Yeast: Characteristics and identification*. Cambridge University Press. Cambridge. Mass.

- Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4514-4520.
- Bidene, C., Blondin, B., Dequin, S. and Vezinhet, F. (1992) Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **22**, 1-7.
- Church, G. M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proceeding of National Academy Science USA* **7**, 1991-1995.
- Codón, A.C., Benítez, T. and Korhola, M. (1998) Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 154-163.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. A. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **137**, 266-267.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P. (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 1034-1038.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998) *The yeast: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher.
- Lachance, M.A. (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**, 151-160.
- Longo, E. and Vezinhet, F. (1993) Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 322-326.

- Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G. and Polsinelli, M. (1994) Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* **10**, 1543-1552.
- Morais, P. B., Rosa, C. A., Linardi, V. R., Pataro, C. and Maia, A. B. R. A. (1997) Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of the Brazilian sugar-cane aguardente. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**, 241-243.
- Nadal, D., Carro, D., Fernández-Larrea, J. and Piña, B. (1999) Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1688-1695.
- Pataro, C., Santos, A., Correa, S. R., Morais, P. B., Linardi, V. R. and Rosa, C. A. (1998) Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Revista de Microbiologia* **29**, 104-108.
- Polsinelli, M., Romano, P., Suzzi, G. and Mortimer, R. (1996) Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Letters in Applied Microbiology* **23**, 110-114.
- Ribeiro, J.C.G.M. (1997) *Fabricação artesanal da Cachaça Mineira*. Belo Horizonte, Editora Perform.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanni, A.I. and Lonner, C. (1993) Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* **10**, 517-523.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984) Separation of chromosomal size DNAs pulse field gradient electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.

- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *Journal of Biology* **98**, 503
- Thornton, R.J. (1991) Wine yeast research in New Zealand and Australia. *Critical Reviews in Biotechnology* **11**, 327-345.
- Török, T., Mortimer, R.G, Romano, P., Suzzi, G. and Polsinelli (1996) Quest for wine yeasts - An old story revisited. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 303-313.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* **10**, 569-570.
- Van der Walt, J.P. and Yarrow, D. (1984) Methods for the isolation, maintenance, classification, and identification of yeasts. In: *The yeasts: a taxonomic study*. 3rd ed. NJW Kreger van Rij pp.45-104. Amsterdam, Elsevier Pubs. BV.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, c., Dulau, L. and Hallet, J.N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3521-3529.
- Veziñhet, F., Hallet, J-N., Valade, M. and Poulard, A. (1992) Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 83-86.

Table 1 – Succession of yeast populations during the formation of the starter ferment in the Distillery A.

Species	Time (days)			
	1	2	4	6
<i>Candida</i> spp.	0.06*	0.003	-	-
<i>Kloeckera japonica</i>	3.1	2.1	1.6	95
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	-	-	0.06	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.83	0.4	-	-
<i>Pichia</i> spp.	-	0.03	-	-
<i>Pichia anomala</i>	0.03	-	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	1.8	4.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	6.6	190
<i>Saccharomyces servazzii</i> - like†	-	-	0.4	1.6

*Values expressed in 10^6 x populations counts (c.f.u./ml)

†Probable new species similar in characteristics to species indicated.

Table 2 – Occurrence of yeast populations in vats with different fermentation ages during the spontaneous fermentation in three *aguardente* distilleries.

Species	Fermentation ages*		
	Young	Middle	Old
Distillery A			
<i>Candida valida</i>	-	-	1.3 †
<i>Candida</i> spp.	0.5	1.0	-
<i>Candida glabrata</i>	-	1.0	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	2.5	-
<i>Pichia fabianii</i> -like ‡	-	240.0	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.04	2636.0	818.3
<i>Saccharomyces exiguus</i>	-	-	70.0
<i>Saccharomyces unisporus</i>	0.32	-	-
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	-	15.0	3.0
<i>Saccharomyces</i> spp.	0.03	-	-
<i>Saccharomyces servazzii</i>	0.02	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	0.2
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0.2	-	-
Distillery B			
<i>Candida colliculosa</i>	-	305.0	-
<i>Candida krusei</i>	-	8.0	-
<i>Candida valida</i>	-	-	1.3
<i>Kloeckera japonica</i>	0.3	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5.0	-	-
<i>Kluyveromyces</i> spp.	-	-	0.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1311.0	3385.0	1973.5
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	6.0	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	130.0	-
Distillery C			
<i>Candida valida</i>	>4000.0	-	100.0
<i>Candida stellata</i>	-	-	46.3
<i>Kloeckera japonica</i>	-	-	7.7
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	-	30.0
<i>Pichia anomala</i>	>4000.0	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>4000.0	1001.8	350.7
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	1562.8	750.3	4.0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	503.5

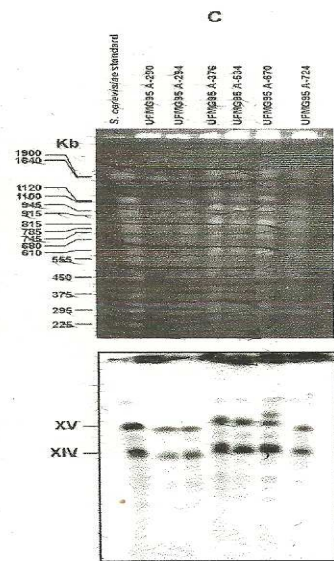
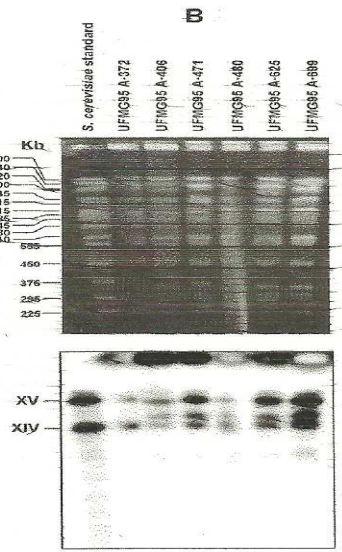
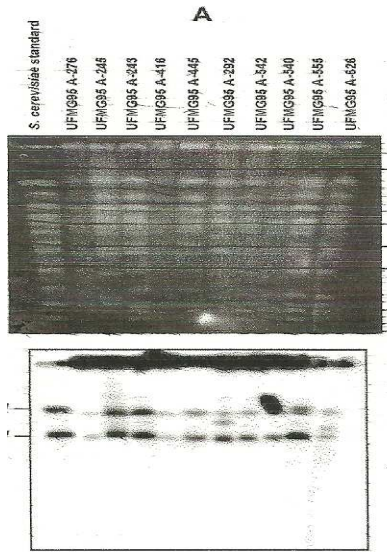
*Fermentation ages: Young (from 7 to 30 d of formation of the ferment); Middle (from 31 to 60 d); Old (from 61 to 120 d).

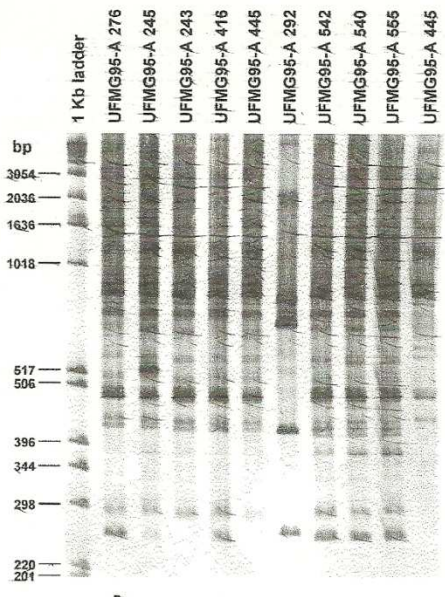
†Values expressed in 10^6 x populations counts (c.f.u./ml)

‡Probable new species similar in characteristics to species indicated.

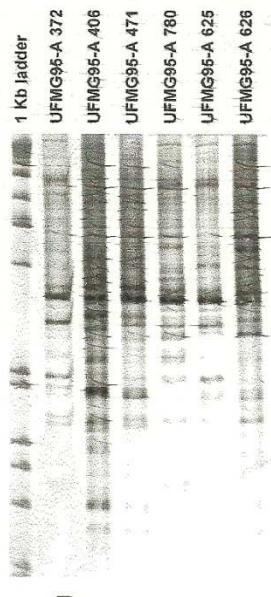
Figure 1: Differentiation of the prevalent *Saccharomyces cerevisiae* strains from three *aguardente* distilleries by electrophoretic karyotypes and chromosome hybridizations using probes *Ade2* (chromosome XVI) and YNLO75W (chromosome XIV).

Figure 2 : PCR differentiation of the prevalent *S. cerevisiae* strains from three *aguardente* distilleries.using intron primer EI1.

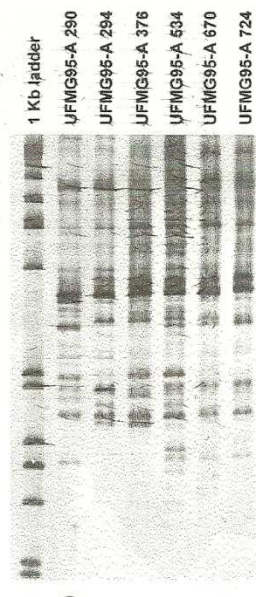




A



B



C

6- Trabalho 4:

Pataro, C., Guerra, J.B., Gomes, F.C.O.; Neves, M.J.; Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000b. Acúmulo de trealose e sucessão de populações de leveduras durante o ciclo fermentativo de 24 horas em fermentações artesanais no Brasil. *Manuscrito em preparação.*

Acúmulo de trealose e sucessão de populações de leveduras durante o ciclo fermentativo de 24 horas em fermentações artesanais no Brasil

Carla Pataro¹, Juliana Becattini Guerra², Fátima de Cássia Oliveira Gomes¹,
Maria José Neves³, Valter Roberto Linardi¹ & Carlos Augusto Rosa¹

1 Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil;

2 Instituto de Microbiologia, BI.I – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 21941-590, Brazil;

3 Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

Palavras chave: fisiologia de leveduras, produção de aguardente, acúmulo de trealose, choque térmico, estresse etanol.

Introdução

Muitas bebidas alcólicas são produzidas por fermentação espontânea consequente do desenvolvimento de microrganismos presentes nos substratos e equipamentos utilizados em sua fabricação (Morais et al., 1997; Sanni & Lonner, 1993). É através deste processo que o Estado de Minas Gerais produz a aguardente de cana-de-açúcar (Cachaça), a mais tradicional bebida alcóolica brasileira. A produção anual de cachaça neste Estado é de aproximadamente 150 milhões de litros, obtidos através da destilação do mosto fermentado do caldo de cana. Esta produção dá-se nos meses de maio a dezembro, período corresponde ao da safra da cana-de-açúcar. Uma das principais características da produção artesanal da cachaça é a preparação do fermento, que consiste na propagação da microbiota fermentativa do caldo de cana puro ou acrescido de farinha de milho, arroz e/ou soja. Este processo ocorre dentro da própria dorna de fermentação e pode durar de 5 a 20 dias até que o número de células de leveduras esteja suficiente para adicionar o caldo de cana até completar o volume da dorna e iniciar o ciclo fermentativo. O ciclo fermentativo da cachaça corresponde ao consumo total do açúcar presente no caldo de cana e ocorre num período que pode variar de 18-48 h. As comunidades de leveduras presentes nas fermentações estão em constante sucessão, e as espécies presentes no caldo de cana fresco são constantemente introduzidas no microambiente das fermentações. *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie predominante no final do preparo do fermento e durante todo o processo fermentativo (Morais et al., 1997).

A habilidade fisiológica das linhagens de leveduras isoladas do caldo fermentado tem especial relevância na compreensão de mecanismos envolvidos na colonização do mosto, e na determinação das condições ótimas para uma fermentação vigorosa (Pataro et al., 1998). Algumas características próprias da fermentação da cachaça como um curto ciclo fermentativo, alta concentração de etanol e temperatura elevada podem ser responsáveis pela seleção de linhagens altamente adaptadas a estas condições.

O dissacarídeo trealose (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosídeo) parece atuar tanto na estabilização da membrana quanto na proteção de células de leveduras em condições de estresse, e seu acúmulo intracelular sugere o

importante papel na capacidade de tolerar altas concentrações de etanol e o estresse térmico (Banat *et al.*, 1998). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma forte correlação entre conteúdo intracelular de trealose e resistência ao estresse tem sido demonstrada em diferentes linhagens, e em uma variedade de condições de crescimento, durante tratamento térmico subletal e outras condições de estresse (Mansure *et al.*, 1994; van Dijck *et al.*, 1995). Neste trabalho, a sucessão de espécies de leveduras e as características fisiológicas como osmotolerância, capacidade de crescer e fermentar em altas temperaturas, atividade invertásica e a dosagem do acúmulo intracelular de trealose em condições normais e em resposta ao estresse foram estudadas durante o ciclo de fermentação (24 horas) em três destilarias de cachaça no Estado de Minas Gerais.

Material e Métodos

As leveduras foram isoladas de três destilarias de cachaça no Estado de Minas Gerais, como descrito em Morais *et al.* (1997). As destilarias Germana, Brumado Velho e Lapinha localizadas nas cidades de Nova União, Brumadinho e Lagoa Santa, respectivamente. As coletas foram realizadas de 4 em 4 horas durante o ciclo fermentativo de 24 horas para a produção da cachaça. As linhagens foram caracterizadas de acordo com métodos padrões (van der Walt & Yarrow, 1984), e identificadas pelas chaves taxonômicas de Kreger-van Rij (1984), Barnett *et al.* (1990) e Kurtzman & Fell (1998).

As leveduras isoladas das dornas de fermentação foram crescidas em agar Sabouraud (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, e agar 2%) a temperatura ambiente por 24 horas, e 0.1 ml da suspensão contendo 1×10^7 células/ml foi inoculada nos seguintes meios: caldo Sabouraud com 15, 20, 25 e 40% de glicose, para testar a osmotolerância; caldo YM com 8, 10, 12 e 13 g/l de etanol (o etanol foi adicionado após esterilização e os tubos foram lacrados com parafilme para evitar a evaporação do álcool); e caldo Sabouraud incubado em banho-maria nas temperaturas de 35 - 43°C para avaliação do crescimento. Osmotolerância e etanol resistência foram determinadas a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ \text{C}$). O crescimento das leveduras foi avaliado pela turvação do meio líquido. Meio Basal de Fermentação (com tubo de Dühran) acrescido de 2% de glicose e encubado em banho Maria a 37 - 45°C foi utilizado para avaliar a

capacidade de fermentar em altas temperaturas e a leitura realizada através da verificação da presença de gás nos tubos de Duhran.

As leveduras isoladas foram testadas quanto à produção de invertase. A atividade invertásica foi medida pelo teste colorimétrico do DNS, como descrito em Ekinsanmi & Odunfa (1990). Cada levedura foi crescida em agar Sabouraud por 48 horas, as células foram diluídas em água estéril, lavadas por centrifugação, e 0,1 g de peso úmido foi resuspendido em 10 ml de tampão acetato, pH 5.0. Um ml de cada suspensão de células foi adicionado a 2 ml de solução de sacarose a 4% no mesmo tampão e incubadas por 5 minutos a 30^o C. Uma unidade de atividade invertásica foi definida como a quantidade de enzima que libera um $\mu\text{mol}/\text{min}$ de açúcares redutores nestas condições (Ekinsanmi & Odunga, 1990).

A quantificação da trealose intracelular foi realizada a partir da trealase produzida pelo fungo termófilo *Humicola grisea* var *thermoidea* (Neves *et al.*, 1994). As células de leveduras foram crescidas em 50 ml of YEPD (D-glicose 2%, extrato de levedura 1%, peptona 2%) a temperatura ambiente por aproximadamente 24 hs quando a glicose é totalmente consumida. As células foram coletadas por filtração usando membranas de 47 μm Millipore. As células das leveduras foram coletadas das membranas e imediatamente colocadas em vasilhame com nitrogênio líquido. Para cada 0.1g de células acrescentou-se 1ml de Na_2CO_3 (0.25M) e a suspensão fervida por 20 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 358 g por 5 min. Em 300 μl do sobrenadante foi adicionado 150 μl de ácido acético (1.2 M), 150 μl de uma solução 300 mM de tampão acetato de sódio e 30 mM CaCl_2 (pH 5.0). Para cada 100 μl desta suspensão foi adicionado 100 μl de trealase. O controle foi preparado usando trealase inativada pelo calor. As amostras preparadas foram incubadas a 40^o C por 90 minutos. A preparação foi centrifugada a 8.890 g por 3 minutos. No sobrenadante, a glicose liberada foi dosada pelo método da glicose-oxidase (Hugget & Nixon, 1957). Uma unidade de trealase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto nestas condições (Neves *et al.*, 1994).

Foram selecionadas 2 linhagens de *S. cerevisiae* de cada destilaria estudada, a linhagem que acumulou a maior quantidade de trealose na fase

estacionária e aquela que acumulou menos. Os testes de choque térmico e estresse de etanol foram elaborados como descrito em Ribeiro *et al.* (1999). **Choque térmico:** Culturas em fase exponencial de crescimento (presença de glicose no meio) foram divididas assepticamente em duas alíquotas. A primeira alíquota foi diretamente submetida ao choque térmico em banho-maria a 50.5⁰ C por 8 minutos. A segunda alíquota foi primeiro submetida a um pré-tratamento ao choque térmico a 40⁰ C por 60 minutos e imediatamente exposta ao choque térmico a 50⁰ C por 8 minutos. **Estresse de etanol:** uma alíquota contendo 100 mg de células (peso úmido) na fase estacionária de crescimento foi transferida para um erlenmeyer estéril e foi adicionado álcool absoluto na concentração final de 10% (v/v) – modificado de Mansure *et al.* (1994) – e incubado a 28⁰C a 160 rpm por 24 h. O acúmulo de trealose foi medido pela técnica descrita anteriormente. A viabilidade celular foi determinada pelo plaqueamento 0,1 ml de uma diluição decimal da cultura em água estéril em agar YEPD, em triplicata. As placas foram incubadas a 28⁰C por 48 horas. Medida da trealose acumulada e da viabilidade celular foram realizadas antes e imediatamente após os tratamentos com etanol e choque térmico. A viabilidade celular em relação a cada tratamento foi expresso pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) antes e após os tratamentos.

Resultados

A Tabela 1 apresenta a contagem de espécies de leveduras isoladas durante o ciclo de fermentação de 24 horas nas três destilarias estudadas. As destilarias Germana, Brumado Velho e Lapinha apresentaram predominância de *Saccharomyces cerevisiae* durante todo o ciclo fermentativo, apresentando biotipos diferentes. Espécies de leveduras não-*Saccharomyces* somente foram detectadas durante as fases iniciais do ciclo fermentativo desaparecendo nas fases finais.

As tabelas 2, 3 e 4 apresentam os resultados dos testes de caracterização fisiológica das linhagens de leveduras isoladas nas três destilarias, respectivamente. Foram isoladas 86 linhagens durante o ciclo fermentativo. Leveduras osmotolerantes somaram 90,7% dos isolados e foram capazes de crescer na presença de 40% de glicose (dados não apresentados). Por outro lado, as leveduras não resistentes a esta concentração de açúcar foram isoladas

somente da destilaria Brumado Velho e corresponderam às espécies *C. maltosa*-similar, *C. parapsilosis*-similar, *C. rugopelliculosa*, *C. azyma* e *K. japonica*.

A maioria das linhagens das destilarias Germana e Brumado Velho foram capazes de crescer nas temperaturas entre 40 e 42^o C sendo que somente 18,4% e 25,9% delas cresceram a temperatura inferior a 40^oC. A temperatura máxima de fermentação foi sempre superior ao da temperatura de crescimento nas linhagens isoladas das três destilarias, chegando alguns isolados a fermentar a 46^oC.

As linhagens isoladas nas três destilarias apresentaram habilidades distintas de crescer na presença de etanol. A maioria dos isolados da destilaria Germana (84,2%) cresceram na presença de 12% de etanol enquanto que na destilaria Lapinha, somente 9,5% dos isolados cresceram nesta concentração de etanol. Por outro lado, a destilaria Brumado Velho não apresentou nenhuma linhagem com habilidade de suportar esta concentração de etanol.

A capacidade de produzir invertases pelos isolados das três destilarias (Tabelas 1, 2 e 3) mostrou-se maior nas linhagens de *S. cerevisiae*. O mesmo ocorreu em relação à capacidade de acumular trealose em fase estacionária de crescimento, onde os valores mais baixos foram detectados geralmente nas linhagens de leveduras não-*Saccharomyces*. A destilaria Germana apresentou as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com os maiores níveis de acúmulo de trealose quando comparado com as destilarias Brumado Velho e Lapinha.

Somente na destilaria Brumado Velho (tabela 3), as linhagens apresentaram maiores valores de acúmulo de trealose quando isoladas ao final do ciclo fermentativo (T5 e T6), onde as condições de estresse são acentuadas. Nas outras destilarias não foi possível observar esta relação. As tabelas 5 e 6 mostram os valores de acúmulo de trealose intracelular e viabilidade de linhagens de *S. cerevisiae* submetido ao estresse térmico e de etanol. As linhagens 1613, 164 e 1701 acumularam trealose após o pre-tratamento a 40^o durante uma hora (tabela 5). A linhagem 1641 apresentou o maior acúmulo de trealose intracelular em relação ao controle e uma maior taxa de viabilidade. Estes mesmos resultados não foram obtidos nas linhagens 1671, 1681 e 1695. Em relação ao estresse de etanol (tabela 6), a linhagem 1681 foi a que apresentou maior capacidade de acumular trealose e maior viabilidade celular após a adição de etanol.

Discussão

Saccharomyces cerevisiae foi a levedura responsável por iniciar o ciclo de 24 horas para a produção da cachaça nas três destilarias. A incidência de espécies não-*Saccharomyces* nas fases iniciais do ciclo fermentativo da cachaça deve-se à adição diária do caldo de cana no fermento. As mudanças na acidez e conteúdo de etanol podem atuar juntamente na seleção do *S. cerevisiae*, a levedura prevalente e responsável pela maior parte da fermentação (Morais *et al.*, 1997).

O microambiente da fermentação da cachaça foi seletivo para leveduras osmotolerantes e etanol resistentes. As linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* que foram incapazes de crescer em alta concentração osmótica e de etanol foram similares àquelas isoladas do solo dos canaviais por Corrêa (1999). Este dado mostra que as leveduras dos ambientes extra-fermentação são carregadas para as dornas e logo nas fases iniciais do ciclo fermentativo desaparecem rapidamente, prevalecendo o *S. cerevisiae*. Em geral, as leveduras isoladas apresentaram uma máxima temperatura de crescimento em torno de 40⁰C. A temperatura média das fermentações de cachaça no Estado de Minas Gerais é de 30⁰C podendo atingir até 42⁰C nas regiões mais quentes do Estado. Assim, a presença de linhagens termo-resistentes neste ambiente é fundamental para a boa condução do processo. A máxima temperatura de fermentação obtida mostrou-se bem superior à temperatura de crescimento, atingindo até 46⁰C em algumas linhagens. Morais *et al.* (1996) também verificaram este fenômeno estudando linhagens de *S. cerevisiae* isolados de diferentes ambientes tropicais. A temperatura ótima de fermentação é superior em 10⁰C à temperatura ótima para o crescimento de *S. cerevisiae* (Blanchet & Ballerini, 1987).

A grande variabilidade observada nos valores de atividade invertásica indica que dentre as linhagens estudadas ocorreu variações na capacidade de hidrolizar a sacarose. Os isolados de *S. cerevisiae* estudados mostraram atividade invertásica superior à produzida por uma linhagem de *S. cerevisiae* isolada de tubérculo de cassava por Ekunsanmi & Odunfa (1990), que apresentou atividade invertásica de 30,4 μmol de açúcar redutor / mg célula / min. Pataro *et al.* (1998) isolaram linhagens *S. cerevisiae* em fermentação de

cachaça com atividade invertásica superior a 100 μmol de açúcar redutor / mg célula / min.

Leveduras colonizando o microambiente da fermentação para a produção artesanal da cachaça estão constantemente submetidas aos estresse térmico, osmótico e de etanol. Recentemente, evidências têm indicado que o nível intracelular de trealose pode determinar a sobrevivência das leveduras em condições ambientais extremas (Neves *et al.*, 1994; Banat *et al.*, 1998). A trealose tem mostrado propriedades de proteção ao estresse *in vitro* e de ser acumulada *in vivo* quando as células encontram-se em fase estacionária ou quando submetidas a estresse (Soto *et al.*, 1999). Nossos resultados mostraram que a maioria das linhagens de *S. cerevisiae* isoladas apresentou alta capacidade de acumular trealose em fase estacionária de crescimento. Linhagens de *Saccharomyces* na natureza e de coleções de cultura na Europa e Ásia, demonstraram uma forte correlação entre a capacidade de acumular trealose e a resistência ao estresse (Ribeiro *et al.* 1999). Leveduras colonizando ambientes tropicais, como os da fermentação da cachaça, estão constantemente submetidas ao estresse, e podem ser fonte de novos biótipos capazes de acumular altas quantidades de trealose.

Os resultados obtidos nos testes de choque térmico mostraram que somente as linhagens que não acumularam trealose no frasco controle apresentaram relação entre trealose e viabilidade. O acúmulo de trealose no controle das demais linhagens deve ter sido porque a levedura entrou em fase estacionária antes de serem submetidas ao choque térmico, fase em que é normal a detecção de trealose intracelular (Neves *et al.*, 1994). A linhagem 1681 apresentou uma redução da trealose de cerca de 60% após o estresse de etanol, sendo provavelmente capaz de mobilizar a trealose intracelular para proteger as suas proteínas de membrana, ocasionando uma maior viabilidade celular (Singer & Lindquist, 1998). Nossos resultados ainda exigem um estudo mais detalhado da participação do acúmulo intracelular de trealose nas linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de ambientes de fermentações espontâneas para a produção da cachaça.

Bibliografia

- Banat, I.M.; Nigam, P.; Singh, D.; Marchant, R. & McHale, A.P. 1998. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part 1 – yeasts in general. *World J. Microbiol. & Biotech.* **14**: 809-821.
- Barnett, JA; Payne, RW & Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Corrêa, S.R. 1999. Microhabitats ocupados por *Saccharomyces cerevisiae* durante os períodos de entressafra e produção em três destilarias de aguardente artesanal. *Dissertação de Mestrado* Instituto de Ciências Biológicas, Depto. Microbiologia da UFMG, Belo Horizonte, 74p.
- Ekunsanmi, T.J. & Odunfa, S.A. 1990. Ethanol tolerance , sugar tolerance and invertase activities of some yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 672-675.
- Hugget, A. S. G. & Nixon, P. A. 1957. Enzymic determination of blood glucose. *Biochem. J.* **66**: 12.
- Kreger-van Rij, NJW. 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 1998. *The yeasts, a taxonomic study*. Fourth revised and enlarged edition. Elsevier, Amsterdam.
- Mansure, J.J.C.; Panek, AD.; Crowe, L.M. & Crowe, J.H. 1994. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Bioch. Bioph. Acta.* **1191**: 309-316.
- Morais, P.B.; Rosa, C.A.; Linardi, V.R.; Pataro, C. & Maia, A .B. R. A. 1997. Characterization and sucession of yeast populations associated with spontaneous fermentation during the production of the brazilian sugar-cane “aguardente”. *World J. Microbiol. Biotechn.* **13**: 241-243.

- Neves, M.-J. & François, J. 1992. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **288**: 859-864.
- Neves M.J.; Terenzi, H. F.; Leone, F. A. & Jorge, J. A. 1994. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World J. Microbiol. Biotech.* 10: 17-19.
- Pataro, C., Santos, A., Correa, S. R., Morais, P.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Rev. Microbiol.* 29: 104-108.
- Ribeiro, M.J.S.; Leão, L.S.C.; Morais, P.B.; Rosa, C.A. & Panek, A.D. 1999. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**: 245-251.
- Singer, M.A. & Lindquist, S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Tibtech***16**: 460-468.
- Soto, T.; Fernandez, J.; Vicente-Soler, J.; Cansado, J. & Gacto, M. 1999. Accumulation of Trehalose by Overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeasts *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2020-2024.
- Van Dijck, P.; Colavizza, D.; Smet, P. & Thevelein, J.M. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. J. Environ. Microbiol.* **61**: 109-115.
- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 1993. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.*, **16**: 113-119.
- Watson DC (1993) Yeasts in distilled alcoholic-beverage production. In: Rose AH & Harrison JS (Eds) – The yeasts: Yeast technology, vol. 5 pp. 215-244. Academic Press, London.

Tabela 1– Contagem de espécies de leveduras isoladas durante o ciclo de fermentação de 24 horas em três destilarias de aguardente.

Destilarias/Espécies	Tempo (horas)						
	0	4	8	12	16	20	24
Destilaria Germana							
<i>Candida bombicola</i> –like	8.0	1.4	1.0	1.7	-	0.1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	307.0	12.8	18.1	13.0	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> (gly+)	22.0	2.0	-	7.0	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> (sal+)	-	-	-	2.0	3.2	0.85	1.3
<i>S.cerevisiae</i> (sal+gly+)	-	-	-	-	0.4	0.8	0.1
Destilaria Brumado Velho							
<i>Candida azyma</i>	-	0.2	-	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	0.3	-	-	-	-	-
<i>Candida incommunis</i> – like	-	-	-	-	0.1	-	-
<i>Candada maltosa</i> – like	0.03	-	-	0.03	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> – like	0.03	-	0.03	-	-	-	-
<i>Candida rugopelliculosa</i>	0.03	-	-	-	-	-	-
<i>Kloeckera japonica</i>	-	-	-	-	0.06	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	17.2	34.0	110.0	>300	-	780.0
<i>S.cerevisiae</i> (ma-tr-)	-	-	52.0	3.0	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> (ma-)	-	-	-	96.0	>300	-	-
<i>S.cerevisiae</i> (gly+)	-	-	-	-	-	205.0	-
<i>S.cerevisiae</i> (ra-)	-	-	-	-	-	-	180.0
<i>S.exiguus</i>	-	57.0	-	-	-	-	-
<i>S.kluyveri</i>	2.3	-	-	-	-	-	-
Destilaria Lapinha							
<i>S.cerevisiae</i> (ri+gly+)	6.9	8.4	5.3	-	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> (ra-tr-gly+)	-	-	-	10.8	-	237.0	-
<i>S.cerevisiae</i> (ra-gly+)	-	-	-	55.0	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> (tr-gly+)	-	-	-	68.3	-	25.0	-
<i>S.kluyveri</i>	7.0	-	-	-	-	-	-

Valores expressos em 10⁷
UFC/ml

Tabela 2- Caracterização fisiológica das leveduras isoladas durante o ciclo fermentativo (24 horas) na destilaria Germana.

Tempo (horas)	Espécies	Tmax.cres.	Tmax.fer.	Max.ETOH (%)	Invertase ^b	Trealose ^c
T0 ^a	1607- <i>S.cerevisiae</i>	39	43	12	60,0	47,46
	1608- <i>S.cerevisiae</i>	41	43	12	20,0	44,92
	1609- <i>C.bombicola</i> similar	40	43	12	58,6	67,90
	1610- <i>S.cerevisiae</i>	39	43	12	77,2	55,43
	1611- <i>S.cerevisiae</i> gly+	41	45	12	40,7	59,64
	1612- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	12	27,2	57,06
	T1	1613- <i>S.cerevisiae</i>	41	43	12	44,8
1614- <i>S.cerevisiae</i>		41	45	12	26,4	2,64
1615- <i>C.bombicola</i> -like		40	45	12	62,0	27,22
1616- <i>S.cerevisiae</i>		41	43	12	49,2	50,55
1617- <i>S.cerevisiae</i> gly+		41	45	12	43,4	5,76
1618- <i>S.cerevisiae</i>		41	45	12	3,6	27,70
T2		1619- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	12	69,2
	1620- <i>S.cerevisiae</i>	41	41	12	46,2	15,59
	1621- <i>C.bombicola</i> -similar	40	45	12	52,0	29,55
	1622- <i>S.cerevisiae</i>	39	41	12	73,2	16,69
	1623- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	12	62,0	30,40
	1624- <i>S.cerevisiae</i>	40	45	8	18,6	43,66
	T3	1626- <i>S.cerevisiae</i>	39	40	12	69,2
1627- <i>S.cerevisiae</i> as+		39	45	12	71,2	45,33
1628- <i>C.bombicola</i> -like		39	42	12	69,2	63,90
1629- <i>S.cervisiae</i> gly+		39	42	12	52,0	64,36
1630- <i>S.cerevisiae</i> sa+		41	45	10	15,4	47,49
1631- <i>S.cerevisiae</i> as+		40	45	12	11,4	66,50
T4		1632- <i>S.cerevisiae</i> sa+	39	41	12	77,2
	1633- <i>S.cerevisiae</i> sa+	39	42	12	17,7	26,13
	1634- <i>S.cerevisiae</i> sa+	41	42	12	57,0	2,15
	1635- <i>S.cerevisiae</i> gly+	39	45	8	45,3	7,55
	1636- <i>S.cerevisiae</i> as+	41	45	12	15,0	2,96
	T5	1637- <i>S.cervisiae</i> gly+	39	45	12	62,0
1638- <i>C.bombicola</i> -similar		39	45	12	69,2	2,41
1639- <i>S.cerevisiae</i> sa+		39	42	12	71,2	0,58
1640- <i>S.cerevisiae</i> as+		41	45	8	14,2	3,15
T6		1641- <i>S.cerevisiae</i>	39	42	12	57,0
	1642- <i>S.cerevisiae</i>	39	45	8	21,2	0,35
	1643- <i>S.cerevisiae</i>	39	43	12	31,9	1,71
	1644- <i>S.cerevisiae</i>	39	45	12	60,0	8,54
	1645- <i>S.cerevisiae</i>	39	45	10	5,3	0,80

^a T0-adição do caldo de cana; T1-4horas, T2-8horas, T3-12horas, T4-16horas, T5-20horas, T6-24horas após adição do caldo

^b Invertase - μmol redução de açúcar/mg célula/min. a 30⁰C

^c Trealose - μmol glicose/g peso úmido

Tabela 3- Caracterização fisiológica das leveduras isoladas durante o ciclo fermentativo (24 horas) na destilaria Brumado Velho

Tempo (horas)	Espécies	Tmax.cres.	Tmax.fer.	Max.ETOH (%)	Invertase ^b	Trealose ^c
T0 ^a	1661- <i>S.cerevisiae</i>	41	42	10	28,7	0,23
	1662- <i>C.maltosa</i> – similar	40	40	-	0,8	0,39
	1663- <i>S.cerevisiae</i>	39	42	10	19,1	0
	1665- <i>C.parapsilosis</i> – similar	40	40	-	0,9	0
	1666- <i>C.rugopelliculosa</i>	40	42	-	1,3	0,28
	1667- <i>S.cerevisiae</i>	42	45	8	60,2	0,67
T1	1668- <i>C.guilliermondii</i>	37	40	-	2,1	0,25
	1669- <i>S.exiguus</i>		43	8	52,0	11,43
	1670- <i>C.azyma</i>	41	45	8	38,6	0
	1671- <i>S.cerevisiae</i>	40	42	8	17,0	0
	1672- <i>C.azyma</i>	37	40	-	1,0	0
T2	1673- <i>S.cerevisiae</i> ma-tr-	41	45	8	25,3	10,0
	1674- <i>S.cerevisiae</i>	41	42	8	17,5	3,33
	1675- <i>C.parapsilosis</i> - similar	37	40	-	1,1	0,80
T3	1656- <i>S.cerevisiae</i>	42	41	10	17,6	7,8
	1657- <i>S.cerevisiae</i> ma-	42	45	10	28,7	0,30
	1658- <i>S.cerevisiae</i> ma-tr-	41	45	10	26,4	0,28
	1659- <i>C.maltosa</i> – similar	37	40	-	5,0	0,21
	1660- <i>C.maltosa</i> – similar	37	40	-	7,1	16,70
T4	1676- <i>S.cerevisiae</i>	41	43	8	73,2	2,65
	1677- <i>S.cerevisiae</i> ma-	40	42	10	31,9	0,33
	1678- <i>K.japonica</i>	39	37	-	0,8	0,56
T5	1680- <i>S.cerevisiae</i> gly+	40	45	8	46,2	8,25
	1681- <i>S.cerevisiae</i> gly+	41	45	10	21,0	25,78
T6	1682- <i>S.cerevisiae</i> ra-	41	45	8	26,9	9,46
	1683- <i>S.cerevisiae</i>	41	43	8	24,6	12,83
	1684- <i>S.cerevisiae</i>	42	43	8	49,2	2,21

^a T0-adição do caldo de cana; T1-4horas, T2-8horas, T3-12horas, T4-16horas, T5-20horas, T6-24horas

após adição do caldo

^b Invertase - μmol redução de açúcar/mg célula/min. a 30^oC

^c Trealose - μmol glicose/g peso úmido

Tabela 4- Caracterização fisiológica das leveduras isoladas durante o ciclo fermentativo (24 horas) na destilaria Lapinha.

Tempo (horas)	Espécies	Tmax.cres.	Tmax.fer.	Max.ETOH (%)	Invertase ^b	Trealose ^c
T0 ^a	1685- <i>S.kluyveri</i>	41	43	8	40,7	7,30
	1686- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	27,2	8,00
	rb+gly+					
	1687- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	31,9	12,14
	rb+gly+					
	1688- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	21,7	4,78
	rb+gly+					
T1	1689- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	38,6	13,08
	rb+gly+					
	1690- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	24,6	5,40
	rb+gly+					
	1691- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	47,8	21,46
	rb+gly+					
	1692- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	10	19,1	21,85
T2	rb+gly+					
	1693- <i>S.cerevisiae</i>	42	45	8	29,3	23,17
	rb+gly+					
	1694- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	9,5	17,05
	rb+gly+					
	1695- <i>S.cerevisiae</i>	41	45	8	10,1	28,64
	rb+gly+					
T3	1696- <i>S.cerevisiae</i>	41	42	10	60,2	24,34
	rb+gly+					
	1697- <i>S.cerevisiae</i> ra-tr-gly+	41	45	8	32,8	19,42
	1698- <i>S.cerevisiae</i> ra-gly+	40	43	8	22,4	8,13
	1699- <i>S.cerevisiae</i> tr-gly+	41	42	10	42,9	19,24
	1700- <i>S.cerevisiae</i> tr-gly+	42	45	8	31,9	19,58
	1701- <i>S.cerevisiae</i> tr-ra-gly+	40	42	8	26,9	4,2
T4	1702- <i>S.cerevisiae</i> tr-ra-gly+	41	45	8	18,3	22,63
	1703- <i>S.cerevisiae</i> tr-ra-gly+	42	45	12	19,0	5,11
	1704- <i>S.cerevisiae</i> tr-gly+	42	45	12	44,8	12,15
	1705- <i>S.cerevisiae</i> tr-ra-gly+	41	42	8	45,3	7,35

^a T0-adição do caldo de cana; T1-4horas, T2-8horas, T3-12horas, T4-16horas, T5-20horas, T6-24horas

após adição do caldo

^b Invertase - μmol redução de açúcar/mg célula/min. a 30°C

^c Trealose - μmol glicose/g peso úmido

Tabela 5 - Acúmulo de trealose intracelular e viabilidade de linhagens de *S. cerevisiae* submetidas ao estresse térmico.

Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	μ mol de glicose/g de peso úmido			Viabilidade celular		
	Controle ^a	Pre-tratamento ^b	Choque térmico ^c	Controle	Pre-tratamento	choque térmico
1613	0,37	18,81	1,14	43 ^d	1 (2,5) ^e	0,01
1641	0,11	13,88	0,05	1,6	0,3 (18,7)	0,03
1671	15,02	18,62	10,33	300	0,12(0,04)	0,005
1681	18,41	17,50	15,06	67	0,3 (0,4)	0,03
1695	18,45	15,16	11,63	2,3	0,02(0,86)	0,016
1701	1,86	14,05	3,55	43	0,3 (0,69)	0,03

a- Células em crescimento exponencial a 28^o C.

b- Pre-tratamento- células em fase exponencial incubadas a 40^oC por 1 hora e imediatamente transferidas por 8 minutos a 50^oC.

c- Choque térmico- Células em fase exponencial incubadas a 50^o por 8 minutos.

d- Valores expressos em UFC X 10⁸

e- Percentagem de sobrevivência em relação ao controle.

Tabela 6- Correlação entre acúmulo de trealose e viabilidade celular de linhagens de *S. cerevisiae* submetidas ao estresse de etanol.

Linhagens de <i>S.cerevisiae</i>	μmol glicose/g peso úmido		Viabilidade celular	
	Controle ^a	10% ETOH ^b	Controle	10% ETOH
1613	30,86	26,0	22,6 ^c	0,035 (0,15) ^d
1641	39,35	31,83	280	1,5 (0,5)
1671	28,24	17,35	2	0,028 (1,4)
1681	44,75	18,51	4,9	0,43 (8,7)
1695	40,68	23,64	39	0,027 (0,07)
1701	14,93	9,60	0,5	<10 ⁵ (<0,2)

a- Células em crescimento estacionário a 28⁰ C.

b- Células em fase estacionária transferidas para frasco contendo 10% de etanol (v/v).

c- Valores expressos em UFC X 10⁸

d- Percentagem de sobrevivência em relação ao controle.

7- Trabalho 5:

Pataro, C., Guerra, J.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000c. Comunidades de leveduras associadas a fermentações espontâneas para a produção de cachaça no Estado de Minas Gerais. *Manuscrito em preparação.*

**Comunidades de leveduras associadas a fermentações espontâneas para a
produção de cachaça no Estado de Minas Gerais**

Carla Pataro, Juliana B. Guerra, Valter R. Linardi & Carlos A. Rosa*

Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901

* Autor correspondente: carlrosa@mono.icb.ufmg.br

Palavras chave: produção de aguardente, fermentação, leveduras.

Introdução

A produção de aguardente de cana (Cachaça) no Brasil ocorre em quase todas as regiões do país e é estimada em cerca de 1,5 bilhões de litros/ano com um consumo de 30 garrafas por segundo, ou 10 litros/habitante/ano. Esta produção pode ser industrial ou artesanal, dependendo, principalmente, da tradição que envolve este processo em cada região (Lima, 1983). A estimativa é de que existam no Brasil cerca de 30.000 destilarias produzindo cachaça de forma artesanal. No Estado de Minas Gerais praticamente toda a cachaça é produzida de maneira artesanal e raramente de maneira semindustrial. O processo artesanal caracteriza-se, principalmente, pela utilização da microbiota natural do substrato e equipamentos para a fermentação do caldo de cana (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.* 1998, 2000a). Após o período da fermentação, o vinho é destilado em alambiques de cobre, que são os destiladores tradicionais no Estado. Outra característica desta produção artesanal é a obtenção do fermento, que antecede a introdução do caldo de cana nas dornas, e que consiste na pré-multiplicação da microbiota natural do caldo de cana com a adição de alguns suplementos nutricionais (farelo de milho, arroz e soja).

O Estado de Minas Gerais é dividido em diferentes regiões e cada uma apresenta sua própria maneira de produzir a cachaça, principalmente no que se refere aos substratos adicionados para a produção do fermento e da forma e tempo em que este é preparado. Pataro *et al.* (2000a) observaram que existe variações na composição de espécies da micobiota fermentadora entre diferentes destilarias, mas que em todas houve a predominância de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo fermentativo.

As cachaças feitas no Estado de Minas Gerais são conhecidas por apresentarem algumas características de aroma e sabor que as identificam com a região onde foram produzidas. Apesar desta distinção, até o momento não foi realizado nenhum estudo sobre a ocorrência de espécies e biótipos de leveduras nestas regiões. Assim, nosso estudo pretende conhecer a micobiotade algumas destilarias localizadas em diferentes regiões de Minas Gerais, verificando a diversidade de espécies de leveduras durante a fermentação do caldo de cana para a produção da cachaça.

Materiais e Métodos

Local das Coletas

As coletas foram feitas em 19 destilarias do Estado de Minas Gerais, em regiões que se destacam na produção de cachaça artesanal. Foram escolhidas as seguintes regiões do Estado: Metalúrgica, Norte, Sul, Jequitinhonha e Zona da Mata (Figura 1). Estas regiões foram escolhidas por serem as mais representativas da produção de cachaça no Estado. A destilaria Pingaqui, localizada na cidade de Viçosa, foi escolhida por produzir cachaça em escala semi-industrial. O objetivo de estudar esta destilaria foi o de obter dados para fazer uma comparação da micobiota de fermentações artesanais com uma feita em escala semi-industrial.

Coleta de Amostras, Isolamento e Identificação das Leveduras

As amostras foram coletadas nas dornas de fermentação das destilarias escolhidas, nos meses de maio-junho (início da produção de cachaça), agosto-setembro (meio) e outubro-novembro (final da produção). Todas as amostras foram coletadas em frascos estéreis de 500 ml, transportadas em gelo e processadas no máximo em 5 horas. Diluições decimais de cada amostra foram inoculadas (0,1 ml), em triplicata, nos seguintes meios de cultura: ágar WL (Difco), ágar SCY (caldo de can 10%, extrato de levedura 0,1%, ágar 2% e cloranfenicol 10 mg%) e agar lisina ("Yeast carbon base" 1.17%, lisina 0.056% e agar%). As placas foram incubadas a temperatura ambiente e as leituras feitas do terceiro ao décimo dia. Cada morfotipo diferente de colônia de levedura foi contado, repicado e purificado para posterior identificação. As leveduras isoladas foram armazenadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 0,5%, fosfato de potássio dibásico 0,2% e ágar 2%) inclinado. As culturas foram estocadas em geladeira sob uma camada de óleo mineral esterilizado. Todas as leveduras isoladas foram identificadas segundo procedimento padrão (van der Walt & Yarrow, 1984) e as chaves taxonômicas

presentes em Kreger-van Rij (1984), Barnnet *et al.* (1990) e Kurtzman & Fell (1998).

Resutados e Discussão

Foram isoladas 580 leveduras para a identificação taxonômica nas 19 destilarias estudadas. As tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 mostram a frequência de ocorrência das espécies e biotipos de leveduras em cada destilaria e por região amostrada. Em geral, amostras de fermentações coletadas no início da safra de produção de cachaça apresentaram um maior número de espécies do que amostras coletadas no meio e final da safra. Com exceção de duas destilaria, *Saccharomyces cerevisiae* foi predominante em todas as amostras de fermentação. Nas destilarias Preciosa e Lapinha, *Schizosaccharomyces pombe* predominou nas coletas realizada no início e meio da safra, respectivamente (tabela 5). A maioria das outras espécies que foram isoladas nas destilarias podem ser consideradas como contaminantes do processo fermentativo. Somente quatro espécies de afinidade basidiomicética (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus*, *C. keutzingii* e *Pseudozyma antarctica*) foram isoladas durante este estudo. Estas espécies de leveduras são geralmente associadas com superfície de folhas e caule de plantas (Phaff & Starmer, 1987; Azeredo et al. 1998), e podem ter contaminado o caldo durante o processo de moagem da cana.

A utilização do meio de cultura, agar lisina, possibilitou o isolamento de um maior número de espécies de leveduras pois *Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de utilizar lisina como única fonte de nitrogênio (Vaughan-Martini & Martini, 1998). Os dois outros meios utilizados (agar WL e SCY) podem ter favorecido o crescimento de *S. cerevisiae* por esta levedura estar quase sempre em populações maiores do que as outras espécies. Com isto, foi possível verificar o nível de contaminação por leveduras não-*Saccharomyces* durante o processo fermentativo. A destilaria Pingaqui foi a que apresentou o maior número de espécies não-*Saccharomyces* durante as coletas, principalmente em fermentações médias e velhas. Esta destilaria utiliza o processo semi-industrial para a produção da cachaça o que pode ter favorecido o aparecimento de

contaminações. Espécies não-*Saccharomyces* provavelmente não conseguem dominar as fermentações nas destilarias porque são menos resistentes às concentrações de etanol presente no mosto do que *S. cerevisiae* (Morais et al. 1997; Banat et al. 1998). *Pichia membranifaciens* foi isolada em três destilarias. Esta levedura está associada com a formação de biofilmes na superfície de dornas de fermentação, e são consideradas como prejudiciais ao processo fermentativo (Lachance 1995).

Vários biótipos de *S. cerevisiae* foram isolados em praticamente todas as destilarias. Estes biótipos podem representar diferentes linhagens de *S. cerevisiae* que provavelmente predominam alternada ou simultaneamente durante o processo fermentativo. No entanto, somente com estudos moleculares isto poderá ser comprovado. Pataro et al. (2000) mostraram que durante a fermentação para a produção da cachaça existe uma alta diversidade molecular entre as linhagens de *S. cerevisiae*. A ocorrência de diferentes biótipos de *S. cerevisiae* também tem sido observada durante a produção de tequila, vinhos e rum (Lachance 1995; Vagnoli et al 1993; Fahrasmane & Ganou-Parfait 1998). A alta diversidade observada de biótipos de *S. cerevisiae* pode ser em função das características artesanais da produção de cachaça. Ciclos fermentativos curtos (16-48 horas) realizados durante todo o período de safra, altas concentrações de etanol e temperaturas altas de fermentação são as principais características da produção de cachaça. Estes fatores podem estar agindo como uma pressão seletiva para a ocorrência desta alta diversidade de biótipos de *S. cerevisiae*.

Agradecimentos

A Associação Mineira dos Produtores de Aguardente de Qualidade (AMPAQ) pela ajuda no contato com os produtores de cachaça. A FAPMIG e CNPq pelo auxílio financeiro.

Referências bibliográficas

- Azeredo, L.A.I., Gomes, E.A.T., Mendonça-Hagler, L.C. & Hagler, A.N. 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Internatl. Microbiol.* 1: 205-208.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D, Marchant, R. & McHale, A.P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. *World J. Microbiol. Biotech.* 14: 809-821.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fahrasmane, L. & Ganou-Parfait, B. 1998. Microbial flora of rum fermentation media. *J. Appl. Microbiol.* 84: 921-928.
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 1998. *The yeasts, a taxonomic study*. Fourth revised and enlarged edition. Elsevier, Amsterdam.
- Lachance, M.A. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 151-160.
- Lima, U.A. 1983. Aguardentes. In: *Biotecnologia – Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*, eds. Aquarone, E., Lima, U.A. & Borzoni, W. pp. 79-103. São Paulo, Edgard Blucher Ltda.
- Morais, P.B., Rosa, C.A.; Linardi, V.R.; Pataro, C. & Maia, A.B.R.A. 1997. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World J. Microbiol. Biotech.* 13: 241-243.
- Pataro, C., Santos, A., Correa, S. R., Morais, P.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Rev. Microbiol.* 29: 104-108.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Petrilho-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentations in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, in press.

- Vagnoli, P., Musmanno, R.A., Cresti, S., Maggio, T. & Coratza, G. 1993. Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany Region of Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4037-4043.
- Van der Walt, J.P. & Yarrow, D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification, and identification of yeasts. In: *The yeasts, a taxonomic study*, 3rd ed., Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp-45-104.
- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 1998. *Saccharomyces Meyen ex Reess*. In: *The yeasts, a taxonomic study*. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W (Eds.), Fourth revised and enlarged edition. Elsevier, Amsterdam, pp. 358-371.

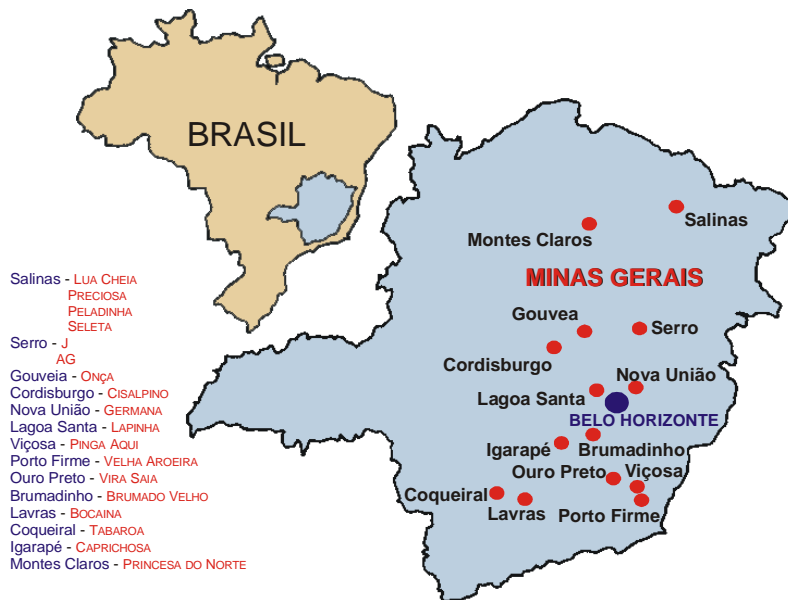


FIGURA 1: LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE AMOSTRAS DE MOSTO DE CACHAÇA NO ESTADO DE MINAS GERAIS.

Tabela 1- Frequência de ocorrência de espécies de leveduras nas Destilarias da região sul do estado de Minas Gerais.

Espécies	Idade das Dornas		
	Jovem	Média	Velha
Destilaria Bocaina			
<i>Candida apicola</i>	10,0	-	-
<i>Candida ingens</i>	10,0	-	-
<i>Candida membranifaciens</i>	3,0	-	-
<i>Kluyveromyces lactis var lactis</i>	920,0	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	0,7	-	-
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	379,3	170,0	390,1
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	500,0	853,0	370,0
<i>S.cerevisiae</i> Gal-Su-Tr-Ra-	20,0	-	1,9
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	10,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+	41,5	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Inulina+Gly+	3,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ma-	3,0	50,0	-
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+	-	3,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Ma-Tr-Ra-	-	260,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Ma-Tr-D-Ar+	-	20,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Ma-	-	2,0	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	30,0	970,0	130,0
Destilaria Tabaroa			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		51,1	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ra-	100,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+	-	-	199,0
<i>S.cerevisiae</i> Gly+Tr-	16,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gal-Ma-Ra-	0,3	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+Me+	600,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Mb+	>10 ⁷	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Su-Ra-	15,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Me+	216,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ma-Su-Ra-Mb+	1900,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ma-Mb+	67,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Me+St+	>10 ⁷	-	-
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+	-	107,25	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	3,7

Valores expressos em 10⁶ cels/ml

ND- não determinado

Tabela 2- Frequência de ocorrência de espécies de leveduras nas Deltilarias Pingaqui e Velha Aroeira na região da Zona da Mata de Minas Gerais

Espécies	Idade das Dornas		
	Jovem	Média	Velha
Destilaria Pingaqui			
<i>Candida</i> sp.	-	-	5,0
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	0,6
<i>Candida membranifaciens</i>	0,13	3,3	-
<i>Candida norvergensis</i>	-	1,5	-
<i>Candida pelliculosa</i>	-	-	65,0
<i>Candida steatolytica</i>	-	0,5	-
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	-	-	8,3
<i>Kloeckera apis</i>	-	-	2,0
<i>Kloeckera japonica</i>	-	1,3	2,3
<i>Kluyveromyces lactis</i> var <i>lactis</i>	-	11,25	-
<i>Rodothorula rubra</i>	-	-	79,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	71,25	110,0
<i>S.cerevisiae</i> Me+St+	35,1	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Me+Ra-	4,7	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Me+	0,29	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Mb+	6,6	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Me+	0,3	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Tr-Ma-	-	-	1,3
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	-	-	270,0
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	-	-	0,16
Destilaria Velha Aroeira			
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	2,7
<i>Candida pelliculosa</i> like	-	-	0,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-L-Ar+	610,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	2100,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	110,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Mb+	40,0	-	2500,0
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ra-	3,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Me+	73,8	1600,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ma-Mb+	-	-	490,0

Valores expressos em 10⁶ cels/ml; ND- não determinado

Tabela 3. Frequência de ocorrência de espécies de leveduras nas destilarias da região do Jequitinhonha do Estado de Minas Gerais.

Espécies	Idade das Dornas		
	Jovem	Média	velha
Destilaria J			
<i>Candida colliculosa</i>	-	-	ND
<i>Candida famata</i>	-	-	ND
<i>Candida guilliermondii</i>	1,6	-	ND
<i>Candida maltosa-like</i>	20,0	-	ND
<i>Hanseniaspora subpelliculosa</i>	-	-	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>10 ⁷	662,5	ND
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+	-	30,0	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	-	1,0	ND
Destilaria Ag			
<i>Hansenula jadinii</i> – like	-	770,0	ND
<i>S. cerevisiae</i>	171,2	1780,0	ND
<i>S.cerevisiae</i> – D-Ar+	-	460,0	ND
<i>S.cerevisiae</i> – inulina+	-	690,0	ND
Destilaria Lua Cheia (Salinas)			
<i>Candida</i> sp.	ND	8,5	ND
<i>Candida bombi</i>	ND	0,225	ND
<i>Candida valida</i>	ND	80,0	ND
<i>S. cerevisiae</i>	ND	2,0	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ra- Tr-	ND	2,8	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	ND	3,0	ND
Destilaria Peladinha (Salinas)			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ra- Tr- Ga-	ND	150,0	ND
Destilaria Seleta (Salinas)			
<i>Candida guilliermondii</i>	ND	0,1	ND
<i>Candida holmii</i>	ND	33,0	ND
<i>Candida stellata</i>	ND	2,0	ND
<i>Candida versatilis</i>	ND	28,0	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND	315,3	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	ND	12,25	ND
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+ Mb+	ND	150,0	ND
<i>S.cerevisiae</i> Mb+	ND	55,0	ND
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+	ND	1100,0	ND
Destilaria Preciosa (Salinas)			
<i>Candida</i> sp.	0,1	5,0	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tr-	40,0	-	ND
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1020,0	285,0	ND
Destilaria Onça			
<i>Candida guilliermondii</i>	-	0,1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	781,5	36,1	2630
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	440,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Tr-	1120,0	11,0	-
<i>S.cerevisiae</i> La+	-	0,3	-
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+	-	160,0	-

Valores expressos em 10⁶ cels/ml, ND- não determinado.

Tabela 4.- Frequência de ocorrência de espécies de leveduras nas Destilarias Montes Claros e Embaia Saia região Norte de Minas Gerais

Espécies	Idade das Dornas		
	Jovem	Média	velha
Destilaria Princesa do Norte			
<i>Candida</i> sp.	65,0	-	ND
<i>Candida famata</i>	0,05	-	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	257,35	127,6	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Tr-	313,3	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> D-Ar+	222,5	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Mb+Mz+D-Ar+	130,0	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Mb+ D-Ar+Tr-	10,5	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Inulina+	-	55,0	ND
Destilaria Embaia Saia			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>10 ⁷	ND	ND
<i>S.cerevisiae</i> Man+	88,0	ND	ND

Valores expressos em 10⁶ cels/ml

ND- não determinado

Tabela 5.- Frequência de ocorrência de espécies de leveduras nas Destilarias Caprichosa Brumado Velho, Cisalpino, Germana, Lapinha e Vira Saia na Região Metalúrgica de Minas Gerais

Espécies	Idade das Dornas		
	Jovem	Média	Velha
Destilaria Caprichosa			
<i>Candida haemulonii</i> like	2,1	-	ND
<i>Kluyveromyces lactis</i> var <i>drosophilarum</i>	1,0	-	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27,5	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Gly+	10,0	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	61,9	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Mz+	0,3	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	-	33,5	ND
Destilaria Brumado Velho			
<i>Candida apicola</i> like	0,16	-	-
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	229,0	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	-	12,0	-
<i>Pseudozyma antarctica</i>	1,0	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	-	374
<i>S.cerevisiae</i> Ga-Ma-	3,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ma-Ra-	42,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+	12,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> L-Ar+	-	304,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	-	1114,3	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Tr-	-	0,3	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Ma-	-	690,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Inulina+	6,1	-	-
<i>S.kluyveri</i> -like Mb-Tr-	-	0,3	-
Destilaria Cisalpino			
<i>Candida</i> sp.	1,6	-	ND
<i>Candida guilliermondii</i>	3,0	-	ND
<i>Cryptococcus keutzingii</i>	40,0	-	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28,1	460,6	ND
<i>S.cerevisiae</i> Man+	9,3	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> L-Ar+	463,0	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> L-Ar+Ra-	41,6	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	-	338,75	ND
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ra-	-	86,0	ND
Destilaria Germana			
<i>Candida</i> sp	-	3,0	-
<i>Candida azyma</i> –like	-	110,0	-
<i>Candida famata</i>	-	0,6	-
<i>Candida guilliermondii</i>	1,0	-	-
<i>Candida membranifaciens</i>	6,0	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	0,6	-	-

Tabela 5 - continuação

<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	-	0,6	-
<i>Kloeckera javanica</i>	0,2	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	5,0	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	230,0	83,2	3756
<i>S.cerevisiae</i> Ra-	87,9	3,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ra-	30,5	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+	95,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Mb+	2,7	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ga-Mb+	150,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> L-Ar+	53,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> L-Ar+X+ Tr-Ra-	6,0	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Mz+	0,6	-	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+X+	-	531,9	-
<i>S.cerevisiae</i> Ra-Tr-Gly+	-	70,5	-
<i>S.cerevisiae</i> Gly+Tr-	-	1,0	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	-	120,0	-
<i>S.kluyveri</i>	-	7,7	-
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	0,3	-	-
Destilaria Lapinha			
<i>Candida bombi</i>	-	3,0	-
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	-	-	3
<i>Cryptococcus keutzingii</i>	40,0	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> var <i>drosophilarum</i>	20,0	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30,6	-	565
<i>S.cerevisiae</i> Gly+	75,6	0,6	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-	-	69,6	-
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ra-	-	15,7	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	1033,0	-
Destilaria Vira Saia			
<i>Candida</i> sp.	93,0	-	ND
<i>Candida bombicola</i> -like	6,0	-	ND
<i>Candida famata</i>	63,0	-	ND
<i>Candida valida</i>	23,0	-	ND
<i>Kluyveromyces lactis</i> var <i>drosophilarum</i>	526,0	-	ND
<i>Pichia</i> sp.	5,0	-	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	387,7	76,6	ND
<i>S.cerevisiae</i> Tr-Ra-	35,0	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> Ga-Ma-	0,2	-	ND
<i>S.cerevisiae</i> psm+	-	5,5	ND
<i>S.cerevisiae</i> L-Ar+	-	86,5	ND
<i>S.cerevisiae</i> Tr-L-Ar+	-	63,7	ND
<i>S.kluyveri</i> - like	20,0	-	ND
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3,0	-	ND

Valores expressos em 10⁶ cels/ml

ND- não determinado

8- DISCUSSÃO

O termo “natural” é convencionalmente usado em microbiologia de bebidas para designar a fermentação do substrato pelas leveduras naturalmente presentes no ambiente, ao contrário do processo “conduzido” que requer o uso de leveduras selecionadas para iniciar a fermentação (Martini, 1993). A fermentação natural é prática tradicional na indústria de vinhos da Europa (Rosini, 1982; Querol *et al.*, 1992), assim como em diversas bebidas africanas (Sefa-Dedeh *et al.*, 1999; Sanni e Lonner, 1993; Sanni e Oso, 1998), no México (Lachance, 1995; Cedeño, 1995) e no Brasil (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998). É através deste processo natural que é produzida a aguardente de cana (Cachaça) em Minas Gerais. Estudos realizados nas destilarias de cachaça no Estado de Minas Gerais mostraram que a colonização do caldo de cana corresponde a uma sucessão de espécies de leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie dominante ao final da formação do fermento e durante todo o processo fermentativo (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998, 2000c). Estudos sobre a microbiota envolvida no processo fermentativo natural para a produção de bebidas alcóolicas nigerianas (Sanni & Lonner, 1993) e na fermentação do agave para a produção da tequila no México (Lachance, 1995) mostraram a espécie *S. cerevisiae* como responsável pela maior parcela da fermentação e a espécie dominante no processo. Similarmente, a produção de vinhos por fermentações espontâneas corresponde a uma sucessão de espécies de leveduras que resulta na prevalência de *S. cerevisiae* (Fleet *et al.*, 1984). Martini (1993) considerou o mosto produzido a partir do suco de frutas como sendo um meio de cultura, principalmente por apresentar alguns fatores seletivos como baixos valores de pH (que previne o crescimento de bactérias) e altas concentrações de açúcar 16-18% (favorecendo o crescimento de leveduras associadas com fermentação). Essas condições características do mosto são responsáveis pela forte pressão seletiva que funciona em favor das leveduras capazes de fermentar nessas condições, principalmente *S. cerevisiae*. Somente em três das 19 destilarias estudadas houve a dominância de *Schizosaccharomyces pombe*, principalmente nas fermentações mais velhas, isto é, acima de 70 dias da produção do fermento. *Schizosaccharomyces* spp.

são comumente isolados das fermentações para produção de bebidas alcólicas e estão associadas com problemas na qualidade do vinho, com o comprometimento de aroma e sabor (Kunkee & Bisson, 1993). Estas leveduras são naturalmente prevalentes na fermentação do rum, onde *S. pombe* é usado em algumas destilarias de rum (Watson, 1993). No entanto, em cachaça não foi estudado a influência dessa levedura sobre a qualidade da bebida.

Durante a formação do pé-de-cuba, a atividade microbiana promoveu uma acidificação do mosto e um aumento do conteúdo alcólico. Essas alterações no mosto fermentado, juntamente com as altas concentrações de açúcar mantida pela adição diária de caldo de cana no fermento podem atuar na seleção de espécies de leveduras prevalentes e linhagens que possam conduzir o processo durante os 4-6 meses de produção da cachaça por ano (Morais et al., 1997). Thornton (1991) observou que na fermentação de vinhos a tolerância ao etanol e a adaptação a altas temperaturas no processo determinam a persistência e/ou o desaparecimento de outras espécies de leveduras.

S. cerevisiae e *C. sake*, em menor proporção, foram as iniciadoras do ciclo fermentativo para a produção da bebida, que usualmente acontece em aproximadamente 24 h. Outras espécies isoladas durante este período foram introduzidas ao fermento através da adição do caldo de cana fresco e são consideradas espécies transientes ou contaminantes. O aumento do conteúdo alcólico no mosto acompanha o aumento populacional do *S. cerevisiae* e, provavelmente, leva o desaparecimento das leveduras inoculadas com o caldo no mosto, incluindo as espécies de *Kloeckera* no final do ciclo fermentativo, de maneira similar à sucessão de leveduras na formação do fermento. A análise das populações de leveduras isoladas nas diferentes destilarias mostrou que algumas espécies foram específicas de cada destilaria. Por outro lado, outras espécies, como *S. cerevisiae* e *S. paradoxus*, foram isoladas em diversas destilarias, indicando que a adição diária do caldo de cana ao mosto fermentado pode ser o responsável pela introdução de outras espécies de leveduras nas dornas.

A idade das dornas, isto é, tempo após a preparação do fermento parece ter influência na variação de espécies de leveduras na fermentação da cachaça.

Dornas contendo fermento recente (7 a 30 dias) produzem mosto com alto teor alcóolico e apresentam maior número populacional total e de *S. cerevisiae* quando comparado as dornas contendo fermento médio (31 a 45 dias) e velho (46 a 70 dias) (Morais *et al.*, 1997). Na maioria das destilarias estudadas ocorreu um decréscimo nas populações de *S. cerevisiae* durante o período de fermentação podendo ser atribuído ao consumo dos nutrientes adicionados (farelo de milho, arroz ou soja) durante a formação do fermento; às altas temperaturas nas dornas de fermentação, especialmente no final de produção da cachaça, a qual ocorre no período de verão e pela presença de metabólitos secundários que podem inibir o crescimento do *S. cerevisiae*. O número médio de espécies de leveduras foi semelhante entre as dornas com diferentes idades, embora as fermentações mais velhas apresentaram maior diversidade de espécies que as fermentações jovens e médias (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 2000 a, c). O isolamento de *P. membranifaciens* nas dornas velhas de algumas destilarias pode ser prejudicial ao “bouquet” da bebida, como ocorre na fermentação de vinhos (Thornton, 1991).

Os meios de cultura utilizados no isolamento das leveduras do mosto mostraram-se adequados. O agar SCY foi usado com a intenção de reproduzir as condições nutricionais presentes nas dornas de fermentação. Neste meio, a sacarose do caldo de cana foi a mais importante fonte de açúcar. A elevada contagem de leveduras obtida neste meio foi devido, provavelmente, à seleção de *S. cerevisiae* que geralmente possuem alta atividade invertásica, fator importante para a assimilação da sacarose. Entretanto, este meio não favorece o crescimento de espécies não-*Saccharomyces* presentes em menor número que a espécie dominante. O agar WL mostrou ser mais eficaz que o SCY, possibilitando o isolamento de algumas espécies não-*Saccharomyces*. No entanto, o meio agar Lisina possibilitou o isolamento de um maior número de espécies de leveduras pois *S. cerevisiae* não é capaz de utilizar lisina como fonte de nitrogênio (Vaughan-Martini & Martini, 1998). Com isto, foi possível verificar o nível de contaminações por leveduras não-*Saccharomyces* na formação do fermento e em todo o ciclo fermentativo da cachaça.

Linhagens micocinogênicas (“killer”) foram isoladas tanto durante o processo fermentativo quanto na formação do fermento. Nenhuma das espécies

de leveduras killer dominou a fermentação durante a produção da cachaça. As linhagens “killer” isoladas do fermento apresentaram um maior espectro de atividade do que as isoladas das dornas de fermentação, sendo capazes de matar todas as espécies consideradas transientes ou contaminantes. Provavelmente, a resistência à toxinas killer pode não ser determinante da colonização do mosto, embora a sensibilidade a fatores “killer” parece ter levado à exclusão de algumas espécies durante a sucessão. Também a produção de toxinas “killer” parece não ter sido suficiente para a colonização do mosto, já que as leveduras “killer” não persistiram nas dornas (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998). Em vários casos, algumas linhagens sensíveis coexistiram com linhagens killer predominante em fermentações de vinhos, provavelmente porque o efeito “killer” depende da proporção de células “killer” e sensíveis no começo da fermentação, que deve ser de aproximadamente 1:1 (Heard & Fleet, 1986; Vagnoli *et al.*, 1993; van Vuuren *et al.*, 1992). A dominância de uma certa levedura “killer” é dependente dos conjuntos das condições ambientais como temperatura e pH que impede a secreção da toxina ativa no mosto fermentado (Bussey, 1972; Longo *et al.*, 1990). Entretanto, em ambientes como o mosto fermentado, essa característica pode não oferecer vantagem significativa, uma vez que linhagens “killer” não adaptadas as condições de fermentação são rapidamente substituídas. É possível concluir que a produção de toxinas “killer” não é um fator determinante na comunidade fermentativa (Lachance, 1995), a menos que esteja associada a outras características (resistência ao etanol, a altas concentrações de açúcares, entre outras), o que pode explicar a predominância de algumas populações de *S. cerevisiae* produtoras de micocinas durante a fermentação de alguns vinhos em diferentes regiões da Europa (Vagnoli *et al.*, 1993).

A habilidade fisiológica das linhagens de leveduras isoladas do mosto fermentado tem especial relevância na compreensão dos mecanismos envolvidos na colonização do mosto, e na determinação de condições ótimas para manter uma fermentação vigorosa. As linhagens de leveduras isoladas nas diferentes detilarias de cachaça mostraram-se adaptadas às condições observadas nas dornas de fermentação (Pataro *et al.*, 2000 a, b). As linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram maior resistência às condições típicas encontradas no

processo fermentativo com, elevada concentração osmótica e de etanol. Leveduras colonizando o microambiente da fermentação para a produção artesanal da cachaça estão constantemente submetidas ao estresse térmico, osmótico e de etanol. Recentemente, evidências têm indicado que o nível intracelular de trealose pode determinar a sobrevivência das leveduras em condições ambientais extremas (Neves & François, 1992; Banat *et al.*, 1998). A trealose tem mostrado propriedades de proteção ao estresse *in vitro* e de acumular-se *in vivo* quando células encontram-se em fase estacionária ou quando submetidas a estresse (Soto *et al.*, 1999). Nossos resultados mostraram que a maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas apresentaram alta capacidade de acumular trealose em fase estacionária de crescimento. Linhagens de *Saccharomyces* na natureza e de coleções de cultura na Europa e Ásia, demonstraram uma forte correlação entre a capacidade de acumular trealose e a resistência ao estresse. Leveduras colonizando ambientes tropicais, como o da fermentação da cachaça, estão constantemente submetidas ao estresse.

Resultados obtidos nos testes de choque térmico mostraram que somente as linhagens que não acumularam trealose no controle apresentaram relação entre trealose e viabilidade. O acúmulo de trealose no controle das demais linhagens deve ter sido porque a levedura entrou em fase estacionária antes de serem submetidas ao choque térmico, fase em que é normal a detecção de trealose intracelular. Uma das linhagens submetidas ao estresse de etanol, que apresentou uma redução da trealose de cerca de 60% após o estresse, provavelmente foi capaz de mobilizar a trealose intracelular para proteger as proteínas da levedura, ocasionando uma maior viabilidade celular (Singer & Lindquist, 1998). Nossos resultados ainda exigem um estudo mais detalhado da participação do acúmulo intracelular de trealose nas linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de ambientes de fermentações espontâneas para a produção da cachaça.

O emprego de técnicas moleculares como a cariotipagem, hibridação e PCR são usadas para mostrar a diversidade molecular das linhagens de *S. cerevisiae* responsáveis pela fermentação de bebidas, sendo as linhagens de vinho as mais bem estudadas (Mortimer & Török, 1995; Códon *et al.*, 1998). Bidene *et al.* (1992) mostraram que o polimorfismo encontrado nas linhagens

de *S. cerevisiae* pode estar associado ao tamanho do cromossomo e sua reorganização estrutural. De acordo com Longo & Vezinhet (1993) as espécies de leveduras envolvidas com a fermentação de bebidas são diplóides e várias das diferenças observadas podem ser atribuídas a estrutura heterozigótica que podem promover diferenças no tamanho dos cromossomos homólogos. Este fato ocorre mais frequentemente nos cromossomos I, VI e VIII, os quais podem apresentar diferentes bandas correspondentes ao mesmo cromossomo. Provavelmente, devido a este fato, pode-se observar a ocorrência de um aumento no número de bandas em alguns isolados, principalmente nos cromossomos I e IV. As bandas que apresentaram menor modificação correspondem ao cromossomo IX, que difere dos demais por ser menos susceptível à mudanças estruturais. O curto ciclo fermentativo do mosto de cana (em torno de 24 horas) parece ser um dos responsáveis pelo aumento da susceptibilidade das linhagens aos rearranjos estruturais no genoma. As técnicas de cariotipagem, hibridação usando as sondas *Ade2* e YNLO75W para os cromossomos XV e XIV, respectivamente e, a análise de PCR (com “primer” EI 1) mostraram-se úteis na distinção de linhagens e foram capazes de revelar a alta diversidade molecular das linhagens de *S. cerevisiae* prevalentes nas dornas de fermentação da cachaça. A ocorrência de polimorfismo cromossômico pode permitir o reconhecimento e controle de linhagens comerciais e industriais de leveduras, principalmente *S. cerevisiae* (Westhuzen & Pretorius, 1992). Desta forma, o estudo molecular tem permitido descrever o comportamento das populações particulares e intervir no processo fermentativo, elucidando o caráter individual de cada fermentação espontânea ou por linhagem iniciadora específica (Schutz & Gafner, 1992; 1994).

9- CONCLUSÕES

- A colonização do caldo de cana-de-açúcar correspondeu a uma sucessão de espécies de leveduras, sendo *S. cerevisiae* a espécie dominante no final da formação do fermento e durante todo o processo fermentativo da produção da cachaça;
- A acidificação do mosto, o aumento no conteúdo alcóolico e osmótico podem ter sido as principais alterações responsáveis pela seleção de linhagens prevalentes de *S. cerevisiae*;
- Espécies como *Candida guilliermondii*, *C. stellata*, *Pichia membranifaciens*, *Kloeckera japonica* e *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilae* isoladas do mosto fermentado podem ter sido introduzidas nas dornas através da adição do caldo de cana fresco e podem ser consideradas espécies transientes ou contaminantes;
- Mostos produzidos a partir de um pé-de-cuba recente apresentaram maior número populacional de leveduras do que as fermentações média e velha; por outro lado, as fermentações mais velhas apresentaram maior diversidade de espécies de leveduras que as recentes e médias;
- O ágar WL e principalmente o ágar Lisina foram eficazes no isolamento de leveduras não-*Saccharomyces*, possibilitando verificar o número de contaminações por espécies de leveduras transientes na maioria das destilarias;
- Linhagens de leveduras micocinogênicas (“killer”) foram isoladas tanto no fermento quanto nas dornas de fermentação; as linhagens “killer” do fermento apresentaram um maior espectro de atividade do que as linhagens isoladas das dornas de fermentação, sendo capazes de matar todas as espécies de leveduras transientes;
- Nenhuma das espécies de leveduras “killer” dominaram a fermentação durante a produção da cachaça nas destilarias estudadas;

- As linhagens de leveduras isoladas nas diferentes destilarias de cachaça mostraram-se adaptadas às condições observadas nas dornas de fermentação, como altas temperaturas, elevada concentração osmótica e de etanol;
- No geral, as linhagens de *S. cerevisiae* prevalentes, isoladas durante a produção da cachaça, produziram altos valores de invertase, e acumularam trealose durante a fase estacionária. Em algumas linhagens, o acúmulo de trealose pode ser correlacionado com uma maior viabilidade sob condições de estresse.
- As linhagens de *S. cerevisiae* prevalentes nas diferentes destilarias estudadas apresentaram um alto grau de diversidade molecular.

10 - BIBLIOGRAFIA

- Ahearn, D.G. 1998. Yeasts pathogenic for humans. **In:** Kurtzman, C.P. & Fell, I.W. (ed). *The yeast, A taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 9-12.
- Alexandre, H.; Plourde, L. Charpentier, C. & François, J. 1998. Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **144**: 1103-1111.
- Aquarone, E; Lima, UA & Borzoni, W. 1983. *Biotecnologia - Alimentos e bebidas produzidas por fermentação*. Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo.
- Araujo, M.A.V. 1994 Sobrevivência, competição e colonização de raiz de milho por *Pseudomonas fluorescens* geneticamente modificada introduzida em microcosmos com solos subtropicais. *Tese de Doutorado*. Instituto de Microbiologia da UFRJ. Rio de Janeiro, 128pp.
- Azeredo, L.A.I. 1996. Diversidade de leveduras associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Linneau.) na região de Campos, RJ. *Tese de Doutorado* do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da UFRJ, Rio de Janeiro, 135p.
- Banat, I.M.; Nigam, P.; Singh, D.; Marchant, R. & McHale, A.P. 1998. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part 1 – yeasts in general. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 809-821.
- Batista, A.C.; de Vasconcelos, C.T.; de Lima, J.A.; Shome, S. 1961. Yeast fungi from fruits of Manaus and their importance for human mycopathology. *Publ. Inst. Micol.* (Recife). **329**: 3-21.
- Benitez, T; Castillo, L; Aguilera, A; Conde, J & Cerdáolmedo, E. 1983. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol an sucrose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 1429-1436.

- Bidene, C., Blondin, B., Dequin, S. & Vezinhet, F. 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics*, **22**: 1-7.
- Blanchet, D. & Ballerini, D. 1987. Fermentation ethanolique. 2ème partie. Paramètres contrôlant le métabolisme et la fermentation chez les levures. *Rev. Inst. Franç. Pétrol.*, **42** : 375-83.
- Brock, T.D. & Madigan, M.T. 1991. Eucaryotip microorganisms. In: *Biology of Microorganisms*. T.D. Brock and M.T. Madigan (eds.). Prentice Hall. New Jersey, pp.817-829.
- Bull, A.T.; Goodfellow, M.; Slater, J.H. 1992. Biodiversity as a source of innovation in Biotechnology. *Annu. Ver. Microbiol.* **144**: 214-252.
- Busey, H. 1972. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nat. New Biol.* **235**: 73-75.
- Cansado, J; Longo, E; Calo, P; Sieiro, C, Velazques, JB & Villa, TG. 1991. Role of killer character in spontaneous fermentation from NW Spain: ecology, distribution and significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**: 643-647.
- Cardinali, G. & Martini, A. 1994. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the *sensu stricto* group of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**: 791-797.
- Cedeño, M. 1995. Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**: 1-11.
- Cereda, M.P.; Antonangelo, A.T.B.F.; Gomes, M.I.F.V.; Goldoni, J.S. 1989. Seleção de leveduras a partir de caldo de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*, L.) em fermentação natural. *Ver. Microbiol. (São Paulo)*, **20**: 78-84.
- Charlemagne-Gilles, H.; Brandt, E.V.; Johan Thevelein, J.; Hohmann, S. & Prior, B.A. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671-680.
- Codón, A.C.; Benitez, T.; Korhola, M. 1998. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 154-163.

- Coote, P.J.; Jones, M.V.; Seymour, I.J.; Rowe, D.L.; Ferdinando, D.P.; Macarthur, A.J.; Cole, M.B. 1994. Activity of the plasma membrane H⁺ - ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**:1881-1890.
- Corrêa, S.R. 1999. Microhabitats ocupados por *Saccharomyces cerevisiae* durante os períodos de entressafra e produção em três destilarias de aguardente artesanal. *Dissertação de Mestrado* Instituto de Ciências Biológicas, Depto. Microbiologia da UFMG, Belo Horizonte, 74p.
- Cuinier, M.C. & Gros, C. 1983. Enquete sur la repartition de levures “killer” en France. *Vigne Vins*, **318**: 25-27.
- D’Amore, T. & Stewart, G.G. 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 322-330.
- D’Amore, T.; Celotto, G.; Russel, I; Stewart, G.G. 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 411-416.
- Delfin, C. & Costa, A. 1993. Effects of the grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and production of acetic acid, pyruvic acid, and acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**: 86-92.
- De Oliveira, R.B. 1980. Taxonomia de leveduras associadas com cajus e mangas. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Microbiologia da UFRJ. Rio de Janeiro, 150pp.
- Eleutheio, E.C.A. & Panek, A.D. 1992. Protective function of trehalose under conditions of stress in *Saccharomyces cerevisiae* –role of trehalose carrier. XXI Reunião Annual da Soc. Bras. Bioquim. Biol. Molec., Caxambu, Brasil.
- Ezeogu, L.I. & Okolo, B.N. 1994. Effect of molasses concentration and medium supplementation on the adaptability and biability of a high-level ethanol-tolerant palmwine *Saccharomyces* isolates. *Biotechnol. Lett.* **16**: 95-100.

- Fleet, G.H. & Heard, G.M. 1993. Yeasts: growth during fermentation. *In*: Fleet, G.H. *Wine microbiology and biotechnology*. Hardwood Academic Publ. 215pp.
- Fleet, G.H.; Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **20**: 1034-1038.
- Fleming, M.; Barron, N.; Machale, L.; Marchant, R.; Machale, A.P. 1993. Studies on the growth of a thermotolerant yeast strain, *Kluyveromyces marxianus* IMB3, on a sucrose containing media. *Biotechnol. Lett.* **15**: 1195-1198.
- Furlanetto, S.M.P.; Paula, C.R.; Gambale, W. & Nascimento, D. do. 1982. Ocorrência de bolores e leveduras em sucos de laranja ao natural. *Rev. Microbiol.* **13**: 31-34.
- Hagler, A.N. & Mendonça-Hagler, L. C. 1981. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environm. Microbiol.* **41**: 173-178.
- Heard, G.M. & Fleet, G.H. 1987. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2171-2174.
- Hidalgo, P. & Flores, M. 1994. Occurrence of the killer character in yeasts associated with Spanish wine production. *Food Microbiol.* **11**: 161-167.
- Hoppe, G.K. & Hansford, G.S. 1984. The effect of micro-aerobic conditions on continuous ethanol-production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 681-686.
- Hounsa, C-G.; Brandt, E.V.; Thevelein, J.; Hohmann, S. & Prior, B.A. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671-680.
- Ingledeu, W.M. & Hysert, D.W. 1994. Brewing technology. *In*: *Enciclopedia of agricultural science*, pp. 315-326.

- Jacobs, CJ; Fovrie, I & van Vuuren, JJ. 1988. Occurrence and detection of killer yeasts on chenin blanc grapes and grape skins. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **29**: 28-31.
- Jones, RP & Greenfield, PF. 1986. Role of water activity in Ethanol fermentations. *Biotechnol Bioeng.*, **28**: 29:40.
- Kunkee, R.E. & Bisson, L.F. 1993. Wine-marking yeasts. In: Rose A.H. & Harrison J.S. (eds). *The yeasts: Yeast technology*, vol. 5 (pp. 69-127). Academic Press, London. Kurtzman C.P. & Fell J.W. (1998) *The yeast: a taxonomic study*. 4th edition Elsevier Amsterdam.
- Lachance, M.A. & Starmer, W.T. 1986. The community concept and the problem of non-trivial characterization of yeast communities. *Coenosis 1*: 21-28.
- Lachance, M.A. ; Starmer, W.T. & Phaff, H.J. 1988. Identification of yeasts found in decaying cactus tissue. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1025-1036.
- Lachance, M.A. 1995. Yeast communities in a tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**: 151-160.
- Lachance, M.A.; Rosa, C.A.; Starmer, W.T.; Schlag-Edler, B.; Barker, J.S.F. & Bowles, J.M. 1998. *Wickerhamiella australiensis*, *Wickerhamiella cacticola*, *Wickerhamiella accidentalis*, *Candida drosophilae* and *Candida lipophila*, five new related yeast species from flowers and associated insects. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1431-1443.
- Lafon-Lafourcade, S.E.; Riberéau-Gayon P. 1984. Occurrence of lactic acid bacteria during the different States of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 874-880
- Laluce, C.; Bertolini, M.C.; Hernandez, J. Vaughan Martini, A.; Martini, A. 1988. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2447-2451.
- Laluce, C; Abud, CL; Greenhalf, W & Sanches, MFP 1993. Thermotolerance behavior in sugar cane syrup fermentations of wild type yeast strains

selected under pressures of temperature, high sugar and added ethanol. *Biotechnol. Lett.*, **15**: 609-614.

Lima, U.A.; Goldoni, J.S.; Cereda, M.P.; Souza, L.G. 1974. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil Açucareiro*. **83**: 337-343.

Longo, E.; Velazquez, J.B.; Cansado, J.; Calo, P. & Villa, T.G.1990. role of killer effect in fermentations conducted by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Letters*. **71**: 331-336.

Longo, E.; Velázquez, J.B.; Sieiro, C.; Cansado, J.; Calo, P.; Villa, T.G. 1992. 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.* **8**: 539-541.

Longo, E. & Vezinhet, F. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 322-326.

Loureiro, V.; Van Uden, N. 1986. Roles of the specific growth rate and the ethanol concentration in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. *Biotechnol. And Bioeng.* **28**: 1443-1445.

Maia, A.B.R.A.; Pereira, A.J.; Schwabe, W.K. 1994. *Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade*. Apostila, UFMG e Fundação Cristiano Otoni.

Mansure, J.J.C.; Panek, AD.; Crowe, L.M. & Crowe, J.H. 1994. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochem. Biophys. Acta*. **1191**: 309-316.

Martini, A. 1992. Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodiv. Conserv.***1**:324-333.

Martini, A. 1993. Original and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Wine Research* **4**: 165-176.

- Morais, P.B. 1991. Taxonomia e ecologia de leveduras associadas a grupos de espécies de *Drosophila* em ambientes florestais no município do Rio de Janeiro. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Microbiologia. UFRJ. 117 pp.
- Morais, P.B.; Hagler, A.N.; Rosa, C.A.; Mendonça-Hagler, L.C. & Klaczko, L.B. 1992. Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1150-1155.
- Morais, P.B.; Martins, M.B.; Klaczko, L.B.; Mendonça-Hagler, L.C. & Hagler, A.N. 1995. Yeast in the amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4251-4257.
- Morais, P.B.; Rosa, C.A.; Linardi, V.R.; Pataro, C. & Maia, A .B. R. A. 1997. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentation during the production of the brazilian sugar-cane “aguardente”. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 241-243.
- Mortimer, R. K. & Torok, T. 1995. *Communication to the Yeast Newsletter*, june.
- Naumov, G.I.; Hagler, A.N.; Naumova, E.S. & Louis, E.J. 1993. Genetic identification of Brazilian *Saccharomyces*. In: Seventeenth International Congress of Genetics. *Abstracts Supplement* (poster d 123), Birmingham, U.K.
- Naumov, G. I; Naumova, E.S.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C. & Louis, E.J. 1995. A new genetically isolated population of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**: 351-355.
- Neves, M.-J. & François, J. 1992. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **288**: 859-864.
- Nykanen, L. 1986. Formation and occurrence of flavor compounds in a wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 84-96.

- Orelli, VFM; Amorim, HV; Orelli Jr., AA & Oliveira, AJ. 1991. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por levedura. *Rev. Microbiol.*, **21**: 170-178.
- Pardo, I.; Garcia, M.J.; Zuniga, M. & Uruburu, F. 1989. Dynamics of microbial-populations during fermentation of wines from the utiel-requena Region of Spain. *App. Environ. Microbiol.* **55**: 539-541.
- Pataro, C., Santos, A., Correa, S. R., Morais, P.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Rev. Microbiol.* **29**: 104-108.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000a. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentations in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, in press.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Gomes, F.C.O.; Neves, M.J.; Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000b. Acúmulo de trealose e sucessão de populações de leveduras durante o ciclo fermentativo de 24 horas em fermentações artesanais no Brasil. *Manuscrito em preparação*.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Linardi, V.R. & Rosa, C.A. 2000c. Comunidades de leveduras associadas com fermentações espontâneas para a produção de cachaça no Estado de Minas gerais. *Manuscrito em preparação*.
- Phaff, H.J. & Stamer, W.T. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soils. **In:** *The yeast*. vol.1. Biology of the yeasts. (ed) A.H. Rose and J.S. Harrison.. Academic Press, New York, pp. 123-180.
- Polonelli, L.; Conti, S.; Gerloni, M.; Agliani, W. & Chezzi, C. 1991. Interfaces of the killer yeast phenomenon. *Crit. Ver. Microbiol.* **18**: 47-87.
- Postuma, E.; Verduyn, C. Scheffers, W.A; Van Dijken, J.P. 1989. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 468-477.

- Querol, A.; Barrio, E. & Ramon, D.A. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 439-446.
- Radler, F. & Schimit, M. 1987. Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption. *J. Food Prot.* **50**: 234-238.
- Rankine, B.C. & Bridson, D.A. 1971. Glycerol in Australian wines and fermentation. *Am. J. Enol., Vitic.* **22**: 6-8.
- Ribeiro, M.J.S.; Leão, L.S.C.; Morais, P.B.; Rosa, C.A. & Panek, A.D. 1999. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**: 245-251.
- Richer, K. 1986. Inhibitory effects of ethanol in alcoholic fermentation. *Acta Biotechnol.* **6**: 239-243.
- Robbs, P.G.; Hagler, A.N. & Mendonça-Hagler, L.C. 1989. Yeasts associated with pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast* **5**: 485-489.
- Romano, P.; Suzzi, G.; Turbanti, L. & Polsinelli, M. 1994. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 213-218.
- Rosa, C.A.; Morais, P.B.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C. & Monteiro, R.F. 1994. Yeasts communities of the cactus *Pilosocereus arrabidaei* and associated insects in the sandy coastal plains of south eastern Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek.* **65**: 55-62.
- Rosa, C.A.; Viana, E.M.; Martins, R.P.; Antonini, Y. & Lachance, M.-A. 1999. *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia* **91**: 428-433.
- Rosa, M.F. & Sá-Correa, I. 1992. Ethanol tolerance and activation of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 23-27.
- Rosi, I.; Vinella, M. & Domizio, P. 1994. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 519-527.

- Rosini, G 1983. The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 1462-1464.
- Rosini, G.; Frederici, F.; Vaughan, A.E.; Martini, A. 1982. A systematics off the species of thegenus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 188-193.
- Sabate, J.; Cano, J.; Querol, A. & Guillamon, J.M. 1998. Diversity of *Saccharomyces strains* in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Let. Appl. Microbiol.* **26**: 452-455.
- Salgueiro, S.P.; Sá-Correia, I. & Novas, J.M.. 1988. Ethanol induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and fermentation productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 903-909.
- Salmon, JM & Mauricio, JC. 1994. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.*, **16**: 89-94.
- Sanni, A.I. & Oso, B.A. 1988. The production of agadagidi – A nigerian fermented beverage. *Nahrung* **32**: 157-161.
- Sanni, AI & Loner, C. 1993. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiol.*, **10**: 517-523.
- Schutz, M. & Gafner, J. 1992 Analysis of yeast diversity furing spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 551-558.
- Schutz, M. & Gafner, J. 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Let. Appl. Microbiol.* **19**: 253-257.
- Sefa-dede, S.; Sanni, A.I.; Tetteh, G. & Sakyi-Dawson. 1999. Yeast in the traditional brewing of pito in Ghana. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 593-597.

- Shehata, A.M. 1960. Yeast isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. *Appl. Microbiol.* **8**: 73-78.
- Simms, A .; Stalbrand, H.; Barnett, J.A..1991. The role of piruvate decarboxylase in the Kluyver effect in the food yeast, *Candida utilis*. *Yeast* **4**: 283-291.
- Singer, M.A. & Lindquist, S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Tibtech***16**: 460-468.
- Sinningaglia, M.; Gardini, F. & Guerzoni, M.E. 1993. Relationship between thermal behaviour, fermentation performance and fatty acid composition in two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol. Technol.* **39**: 593-599.
- Soto, T.; Fernandez, J.; Vicente-Soler, J.; Cansado, J. & Gacto, M. 1999. Accumulation of Trehlose by Overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeasts *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2020-2024.
- Thomas, K.C.; Hynes, S.H. & Ingledew, W.M. 1994. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. And Environm. Microbiol.* **60**: 1519-1524.
- Thornton, RJ. 1991. Wine yeast research in New Zealand and Australia. *Crit. Rev. Biotech.*, **11**: 327-345.
- Vagnoli, P; Musmanno, RA; Cresti, S; Di Maggio, T & Coratza, G. 1993. Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 4037-4043.
- Van Vuuren, HJJ & Jacobs, CJ 1992. Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**: 119-128.
- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 1993. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.*, **16**: 113-119.

- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 1998. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: *The yeasts, a taxonomic study*. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W (Eds.), Fourth revised and enlarged edition. Elsevier, Amsterdam, pp. 358-371.
- Vezinhet, F.; Hallet, J.N.; Valade, M.; Poulard, A. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**: 83-86.
- Viegas, C.A.; Sebastião, P.B.; Nunes, A.G.; Sá Correia, I. 1995. Activation of plasma-membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1904-1909.
- Visser, W.; Scheffers, W. A .; Batenburg-van der Vegte, .H. 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3785-3792.
- Watson, D.C. 1993. Yeasts in distilled alcoholic-beverage production. In: Rose A.H. & Harrison, J.S. (eds) – *The yeasts: Yeast technology*, vol.5, pp.215-244. Academic Press, London.
- Westhuisen, T. J. van der & Pretorius, I.S. 1992. The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **61**: 249-257.
- Weusthuis, R.A.; Viser, W.; Pronk, J.T.; Scheffersiw, P.; Van Dijken, J.P. 1994. Effects off oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts – a continuous-culture study of the kluyver effect. *Microbiology* **140**: 703-715.
- Woods, DR & Bevan, EA. 1968. Studies on the nature of killer factors produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **51**: 115:126.
- Yarrow, D. 1984. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: N.J.W. Kreger-van Rij (Ed.). *The yeast, a taxonomic study*, 3r^d ed. Elsevier, Amsterdam, pp.379-395.
- Young, TW. 1987. Killer Yeasts. In: *The yeasts*, Vol 2. A. Rose & JS Harrison (Eds) London, Academic Press. pp. 131-164.

Zea, L.; Moreno, J.; Medina, M. & Ortega, J.M. 1994. Evolution of C6, C8 and C10 acids and their ethyl esters in cells and musts during fermentation with three *Saccharomyces cerevisiae* races. *J. Ind. Microbiol.* **13**: 269-272.

Zironi, R.; Romano, P.; Suzzi, G.; Battistutta, F. & Comi, G. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guillermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 235-238.

11- Lista de Abreviações

Abreviações	Descrições
DAr	D-arabinose
Ga	galactose
Gly	glicerol
La	lactose
LAr	L-arabinose
Ma	maltose
Man	D-manitol
Me	melibiose
Mz	melizitose
Psm	pseudomicelio
Ra	rafinose
Ri	D-ribose
Sa	salicina
St	amido
Su	sacarose
Tr	trealose