

**POLLYANA ALVES BORGES DA SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E  
CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE  
LEVEDURAS E DOS PARÂMETROS QUÍMICOS EM  
FERMENTAÇÕES CONTAMINADAS DURANTE A  
PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM MINAS GERAIS**

**Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte**

**2009**

**POLLYANA ALVES BORGES DA SILVA**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E  
CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE  
LEVEDURAS E DOS PARÂMETROS QUÍMICOS EM  
FERMENTAÇÕES CONTAMINADAS DURANTE A  
PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM MINAS GERAIS**

**Versão final da Dissertação apresentada em 27  
de março de 2009 ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas: Microbiologia.**

**ORIENTADOR: Prof. Carlos Augusto Rosa**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Fátima de Cássia  
Oliveira Gomes**

**Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte**

**2009**

043

Silva, Pollyana Alves Borges da.

Caracterização das populações de leveduras e dos parâmetros químicos em fermentações contaminadas durante a produção de cachaça em Minas Gerais [manuscrito] / Pollyana Alves Borges da Silva. – 2009.

72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa. Coorientadora: Profa. Dra Fátima de Cássia Oliveira Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Cachaça. 3. Alimentos e Bebidas Fermentados. 4. Contaminação. 5. Leveduras. 6. Saccharomyces. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Gomes, Fátima de Cássia Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Rosilene Moreira Coelho de Sá – CRB 6 - 2726

## Ata de defesa



**UFMG**  
1970  
Microbiologia

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

### DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos fins que **POLLYANA ALVES BORGES DA SILVA**, cursou o Mestrado em Microbiologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Carlos Augusto Rosa e co-orientação da Profa. Fátima de Cássia Oliveira Gomes. Tendo cumprido todas as exigências do Programa, defendeu sua Dissertação intitulada "Caracterização das populações de leveduras e dos parâmetros químicos em fermentações contaminadas durante a produção de cachaça em Minas Gerais", na data de 27 de março de 2009, diante da banca examinadora composta pelos Drs. Fátima de Cássia Oliveira Gomes (CEFET-MG), Inayara Cristina Alves Lacerda (UNIPAC), Vera Lúcia dos Santos (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e seu Orientador, tendo sido Aprovada e recebendo a titulação de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**.

Belo Horizonte, 27 de março de 2009.

*Maria Aparecida de Resende*  
Profa. Maria Aparecida de Resende  
Coordenadora

**Dedico essa dissertação a todas as mulheres do mundo que são vítimas de violência.  
Que superem, que renasçam e que façam seus próprios partos de si mesmas.**

**Enquanto houver sol**  
**Sérgio Britto**

Quando não houver saída  
Quando não houver mais solução  
Ainda há de haver saída  
Nenhuma idéia vale uma vida...

Quando não houver esperança  
Quando não restar nem ilusão  
Ainda há de haver esperança  
Em cada um de nós  
Algo de uma criança...

Enquanto houver sol  
Enquanto houver sol  
Ainda haverá  
Enquanto houver sol  
Enquanto houver sol...

Quando não houver caminho  
Mesmo sem amor, sem direção  
A sós ninguém está sozinho  
É caminhando  
Que se faz o caminho...

Quando não houver desejo  
Quando não restar nem mesmo dor  
Ainda há de haver desejo  
Em cada um de nós  
Aonde Deus colocou...

Enquanto houver sol  
Enquanto houver sol  
Ainda haverá  
Enquanto houver sol  
Enquanto houver sol...

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos no mundo, pois somente através desse caminho pude finalmente chegar até aqui. Mas principalmente agradeço a:

Carlos, meu orientador e idealizador desta pesquisa, que com seu imenso conhecimento me ensinou os caminhos da profissão de microbiologista e a beleza da taxonomia de leveduras. Você me encorajou desde a minha chegada no laboratório, me ensinou técnicas e formas de pensar, me estimulou a enfrentar e modificar falhas, confiou-me a responsabilidade de treinar várias pessoas, a fazer sempre o meu melhor, sempre acreditou que eu conseguiria encarar as dificuldades da vida sem deixar de cumprir meus deveres nos outros setores. Obrigada pela oportunidade, pelo respeito, pela amizade, pela preocupação, por transformar meus erros em caminhos para o acerto e por fazer de mim uma profissional muito melhor nesses oito anos de convívio.

Fátima, minha co-orientadora, que com seu sorriso nos lábios, firmeza, paciência e imenso carinho, foi essencial na realização do trabalho, me indicando as soluções para que eu tivesse que crescer para alcançá-las. Obrigada pelo acolhimento, pela imensa ajuda e consideração.

Todos os professores e funcionários do Departamento, pelo convívio nas reuniões do colegiado, pelo fluxo de conhecimentos, pelas permissões para usarmos equipamentos em seus laboratórios. Ao Douglas, Gina, Iracema e Tatiane, pelo apoio técnico e esclarecimentos quanto às questões administrativas.

Amigos do Laboratório, com os quais o aprendizado é coletivo e contínuo: Alessandra, Alição, Aline, Adriana, Carol, Cris Roscoe, Beatriz, Elsiene, Fê Badotti, Camila Munique, Mônica, César, Lu Berta, Déboras, Luiz, Iara, Valéria, Vivian, Fatinha e todas as estagiárias que trabalharam comigo. Fernanda Fraga, Mariana Vieira, Luciana e Virginia, obrigada pela persistência em aprendermos juntas as técnicas moleculares, pelas redações coletivas, pelos almoços, pela partilha, pelo companheirismo e pelo carinho. Minhas queridas

“Zezinhas”: Natália, Piló, Renata, Mariana, Fabiana, Bárbara, Anne, pelas réplicas intermináveis, pelas coletas, balões de cachaça.

Raquel Cadete, que nesses anos de convivência foi uma grande amiga (não só em altura, mas em cumplicidade, companheirismo, criatividade, entusiasmo). Te amo, Zé!

Minha prima Danielle Letícia, parceira em todas as disciplinas da pós e do bacharelado, pelos trabalhos que avançaram noite afora e pela alegria de nos reencontrarmos.

Professor Jacques Nicoli, pela participação na avaliação do projeto, e que tanto contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, cedendo seu espaço, equipamentos no laboratório, conhecimentos e empatia por esta linha de pesquisa.

Professoras Vera Lúcia e Inayara Cristina, por aceitarem participar da banca examinadora. Pelo convívio anterior, conversas, lembranças e torcida. Pela compreensão, disponibilidade e amizade.

Professor Ari, que atenciosamente fez a correção ortográfica e as sugestões antes da entrega da dissertação à banca.

Professor Danilo Gonçalves Bastos, da Escola de Veterinária da UFMG, pela ajuda na redação do texto da metodologia, legendas das figuras e análise dos resultados dos testes.

Estagiárias Camila e Michelle, pelas dosagens de parâmetros químicos e pelos géis de mitocondrial.

Professora e amiga Ana Cristina Vaz, que sempre foi minha parceira e orientadora nas questões da prática pedagógica na Escola Fundamental do Centro Pedagógico da UFMG, onde trabalhei durante 4 anos, e vibrou como mãe com todas as minhas conquistas.

Giselli, Ana Paula Dinda e Luane, minhas amigas da atualidade, que acompanharam este processo, me estimularam a entregar a dissertação e finalizar esta etapa da minha vida, depois de 11 anos!

Meus terapeutas Paula, Walter, Alzi, Michael e Juliana, que ajudaram com tanta competência e sabedoria a desenovelar vários emaranhados da minha alma.

Meu irmão Paulinho e minha cunhada Malena, que na época do curso compreenderam minhas ausências e rezaram para que desse certo, sempre junto comigo, mesmo na correria da vida.

Dedé e Rafa, meus filhos mais velhos, por serem presentes de Deus para mim, desejo ser sempre presente na vida de vocês, e agradeço por terem chegado até mim.

Meu filho Henrique, que além de ser filho, é a pessoa que mais me diz para eu cuidar de mim antes até dele mesmo, por ser minha mola propulsora, você é a pessoa que me faz querer ser melhor a cada dia!

Meus pais, Paulo César e Iracy, que me deram a vida e me ajudaram a recuperar a minha vida. Minhas estrelas de luz, amor eterno a vocês e gratidão profunda por tudo!

Enfim, agradeço à Divina Presença EU SOU, Deus, meu início e meu fim. Obrigada, Senhor!

## Sumário

DEDICATÓRIA .....	i
EPÍGRAFE.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO .....	01
LISTA DE FIGURAS .....	03
LISTA DE TABELAS .....	04
RESUMO .....	05
ABSTRACT .....	07
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1. A cachaça de alambique de Minas Gerais .....	11
2.2. Produção da cachaça .....	13
2.3. Microrganismos envolvidos na etapa fermentativa da produção da cachaça..	16
2.4. Possíveis contaminantes das fermentações de cana-de-açúcar .....	20
2.5. Substâncias antagonistas produzidas por microrganismos .....	23
3. OBJETIVOS .....	25
3.1. Objetivos gerais .....	25
3.2. Objetivos específicos .....	25
4. METODOLOGIA .....	26
4.1. Coleta das amostras de mostos fermentados. ....	26
4.2. Análise dos parâmetros químicos das amostras .....	27
4.2.1. Determinação dos teores de açúcares totais .....	27
4.2.2. Determinação da concentração de acidez total. ....	27
4.2.3. Determinação da concentração de etanol .....	28
4.2.3. Determinação da concentração de glicerol .....	28
4.3. Processamento das amostras e isolamento dos microrganismos.....	29
4.4. Caracterização e identificação de leveduras. ....	30
4.4.1. Identificação das leveduras por métodos tradicionais .....	30
4.4.2. Caracterização molecular das linhagens de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> . ....	31
4.4.3. Identificação das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> .....	32
4.4.4. Caracterização das leveduras quanto à produção de micocinas.....	34

4.5. Análise estatística univariada das dosagens de parâmetros químicos e das contagens de microrganismos.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Determinação dos teores de açúcares totais, da concentração de acidez volátil, de etanol e de glicerol.....	36
5.2. Processamento das amostras e isolamento dos microrganismos.....	38
5.3. Caracterização e identificação de leveduras.....	41
5.3.1. Identificação das leveduras por métodos fisiológicos.....	41
5.3.2. Identificação molecular das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .....	41
5.3.3. Identificação das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> .....	46
5.3.4. Caracterização das leveduras quanto à produção de micocinas.....	49
5.4. Análise estatística.....	52
6. DISCUSSÃO .....	54
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Dosagens dos parâmetros químicos acidez total, concentração de etanol, de açúcares e de glicerol nas 15 amostras de vinhos contaminados coletadas em seis destilarias de cachaça do Estado de Minas Gerais, de abril a outubro de 2007. Os valores para desvio-padrão estão indicados ao lado das dosagens.....página 40

Tabela 2: Contagens totais de microrganismos isolados a das 15 amostras de vinhos contaminados coletadas em seis destilarias de cachaça do Estado de Minas Gerais, de abril a outubro de 2007. ....página 42

Tabela 3: Relação das 15 amostras contaminadas coletadas,destilarias de origem, os problemas apresentados pelos produtores, tipo de fermentação e material da dorna.....página 43

Tabela 4: Correspondência entre amostra, contagem total das *S. cerevisiae* pertencentes ao morfotipo dominante na mesma, número de perfis de restrição de DNA mitocondrial encontrados para esse morfotipo, contagem de UFC/mL para cada perfil tipo de fermentação da amostra .....página 46

Tabela 5: Contagens populacionais de leveduras não-*Saccharomyces* presentes em cada amostra, por destilaria.....página 47

## Resumo

A produção de cachaça é influenciada por diferentes microrganismos presentes na destilaria. A fermentação é realizada em recipientes abertos, com materiais manipulados e transportados diversas vezes antes da utilização. Assim, a cada adição de caldo de cana fresco e água são introduzidas no processo novas populações de microrganismos que podem reduzir o rendimento em etanol, aumentar a acidez e alterar a qualidade do produto final, contaminando-o. A proposta deste trabalho foi caracterizar 15 amostras de fermentações contaminadas oriundas de seis destilarias do estado de Minas Gerais, determinar os parâmetros químicos acidez volátil, concentração de etanol, de glicerol e de açúcares totais nos vinhos contaminados; além de realizar as contagens totais de microrganismos, a diversidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e de espécies não-*Saccharomyces*; e testar a atividade micocinogênica das leveduras isoladas. Quanto aos parâmetros químicos, as dosagens médias encontradas foram de 0,90 g/100 mL de ácido acético para a concentração de acidez volátil, de 15,43 g/L para o teor de açúcares totais, de 824,16 mg/dL para concentração de glicerol e de 3,53 °GL (%v/v) para concentração de etanol. As contagens totais de bactérias lácticas e leveduras foram semelhantes àquelas encontradas para fermentações não contaminadas. As espécies de leveduras não-*Saccharomyces* encontradas foram *Candida akabanensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygoascus hellenicus*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Z. fermentati*. *Pichia membranifaciens* foi a espécie predominante após *S. cerevisiae*, na maioria das amostras. Isolados identificados como *Candida* sp. podem constituir uma nova espécie de levedura. O número de linhagens de *S. cerevisiae* em fermentações conduzidas por fermentos selvagens foi menor do que em fermentações conduzidas por linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*. Do total de leveduras isoladas, 34,78% apresentaram atividade micocinogênica contra leveduras iniciadoras selecionadas ou *S. cerevisiae* selvagens dominantes nas dornas de fermentação. As práticas de dosagens da acidez total titulável e do teor de açúcares,

comumente utilizadas pelos produtores, foram validadas neste trabalho como parâmetros indicativos da contaminação durante as fermentações para a produção de cachaça.

Palavras-chaves: Fermentação da cachaça, Contaminação de bebidas, Leveduras micocinogênicas não-*Saccharomyces*, Acidez volátil, Controle de qualidade.

## Abstract

The cachaça fermentation process is directly affected by the natural occurring microbiota present in distillery environment. Some microorganism, considered contaminants, may have a negative influence in Cachaça yield and quality. The Cachaça fermentations are carry out in open vats and many materials are manipulated and transported several times before their use; so the control of contaminant microbiota is required to avoid the colonization and propagation of such microorganisms during the fermentations. Other important aspects are the water and sugar cane added to each fermentation cycle, which in the most distilleries, do not undergo any treatment, and therefore also transport microorganisms to fermentation vats. Those populations can decompose the final product; causing reduction of ethanol yield, increase volatile acidity and so affects the quality of beverage. The aim of this study was to characterize the microorganism populations involved in spoilage and/or stuck fermentations. The samples for microorganism isolation were obtained from six distilleries located Minas Gerais state. The *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts were identified and the chemical parameters total acidity, ethanol, total sugars and glycerol concentrations in the wine were measured to evaluate the characteristics of spoilage wine. The diversity of *S. cerevisiae* population in each vat was evaluated by mitochondrial DNA restriction analysis and killer activity was studied against the yeasts isolated from the same vat and reference yeasts to this test. Despite the spoilage, the range of microorganisms' population counts, principally lactic acid bacteria, was similar to those found in non-contaminated fermentations reported by other works. Non-*Saccharomyces* population was constituted by *Candida akabanensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygoascus hellenicus*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Z. fermentati*. *Pichia membranifaciens* was the second prevalent yeast species surpassed only by *S. cerevisiae*. Unpredictable we found higher diversity of *S. cerevisiae* strains in fermentations carried out by selected *S. cerevisiae* strains than spontaneous ones. Killer yeasts represented 34,78% of the yeast isolates.

The concentration of chemicals average 0,90 g/100 mL for total acidity in acetic acid; 15,43 g/L for total sugars; 824,16 mg/dL for glycerol and 3,53 °GL (%v/v) for ethanol in the 15 samples evaluated. This work approve producers practices of quantify the chemical parameters total acidity and total sugars concentrations to measure contamination levels on the microbiological phase of the Cachaça production.

Keywords: Cachaça fermentation, Beverage contamination, Non-*Saccharomyces killer* yeast, Total acidity, Quality control.

## 1. Relevância e Justificativa

Dentre as diferentes etapas da produção da cachaça, destaca-se a fermentação, na qual uma complexa comunidade microbiana está presente no caldo de cana. A cada adição de água, caldo de cana fresco e fontes de amido, são introduzidas novas populações de leveduras e bactérias, as quais se multiplicam, modificam o mosto e podem alterar outras populações de microrganismos que compõem o fermento. Nele, as linhagens mais adaptadas à fermentação permanecem ativas por serem capazes de tolerar as condições adversas do meio, sendo os microrganismos predominantes nesta etapa as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Em relação ao produto final, leveduras e bactérias lácticas podem influenciar favoravelmente ou não a fermentação. Populações de leveduras não-*Saccharomyces* podem liberar enzimas e metabólitos no mosto, os quais conferem aromas característicos e podem contribuir para composição química da cachaça. No entanto, sabe-se que para a produção de outras bebidas, como vinho e cidra, muitas leveduras não pertencentes à espécie *S. cerevisiae* podem produzir em excesso substâncias que prejudicam o aroma e a qualidade do produto. Além das leveduras, diversos gêneros de bactérias lácticas também podem produzir ácido lático e outras substâncias que, quando presentes na dorna de fermentação, influenciam as características organolépticas da cachaça.

Desta forma, esta microbiota presente no caldo de cana pode atuar como contaminante ao competir com as linhagens fermentativas pelos nutrientes disponíveis, impedindo a utilização correta das fontes de carbono e retardando a produção de etanol no mosto fermentado. Adicionalmente, linhagens de leveduras que apresentem atividade antagonista contra outras leveduras podem prejudicar o equilíbrio no processo fermentativo, acarretando altos níveis de açúcares residuais, atraso no tempo de fermentação, altos teores de acidez volátil e diferenças na produção de etanol e glicerol. Portanto, a verificação desta atividade em fermentações contaminadas é de grande relevância para a compreensão das interações microbianas durante a produção de cachaça. Além disso, não são encontrados na literatura estudos completos sobre as

contaminações inerentes à fermentação da cachaça. Somente alguns trabalhos encontrados investigam a influência dos contaminantes químicos, como o carbamato de etila, sobre a produção de cachaça de alambique, e sobre as populações de bactérias lácticas presentes em fermentações contaminadas. Assim sendo, a identificação e caracterização dos microrganismos envolvidos ou responsáveis pelo processo de contaminação é de extrema relevância para a redução de prejuízos neste setor da economia.

Usando como referências estudos sobre fermentações não contaminadas desenvolvidos anteriormente, a proposta deste trabalho foi quantificar as populações de bactérias lácticas, identificar e caracterizar as espécies de leveduras mais frequentes em fermentações contaminadas para a produção de cachaças em Minas Gerais. As amostras contaminadas também foram caracterizadas quanto à concentração de etanol, teores de açúcares totais e de acidez volátil. Os resultados podem ser relevantes para a avaliação da produção cachaça, contribuindo para a compreensão da ecologia de microrganismos envolvidos no processo de fermentação.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. A cachaça de alambique de Minas Gerais

*Cachaça* é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil com graduação alcoólica de 38 a 48 % em volume, a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar e com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares em até 6 g/L, expressos em sacarose (BRASIL, 2005). No estado de Minas Gerais estão localizadas aproximadamente 8000 destilarias, que geram cerca de 240 mil empregos diretos ou indiretos. A expressividade econômica, aliada a um consumo *per capita* de 11 litros/habitante/ano e as iniciativas governamentais para a melhoria da qualidade têm agregado valor à bebida (PBDAC, 2007).

Atualmente, a cachaça pode ser comparada aos melhores destilados do mundo. No exterior tem sido apreciada por consumidores cada vez mais diversificados, exigentes e elitizados, que geram novas demandas de mercado. Como resposta à demanda da bebida, o setor tem apresentado um esforço crescente para aumentar o volume e a expressividade do produto na economia estadual e nacional (ESTANISLAU et al., 2002; PBDAC, 2007). No entanto, ainda há muito que progredir em relação à regularização das unidades produtoras, pois 57% do total das destilarias de Minas Gerais não são registradas no Ministério da Agricultura e 85% da produção nacional são provenientes deste tipo de estabelecimento (SEBRAE, 2001).

De acordo com BENTO DE LIMA e colaboradores (2007), o mercado externo ainda é pouco explorado pelo produtor de cachaça de alambique em Minas Gerais. No ano de 2006, o estado contribuiu com apenas 2,06% do volume de litros exportados pelo Brasil. Porém, de acordo com o Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio (MIDC), o estado de Minas Gerais aumentou em mais de mil vezes o volume de cachaça destinada a outros países no período de 1996 a 2006. Em 1996, o estado exportou apenas 220 litros da bebida, enquanto, em 2006, este volume atingiu 232.544 litros. A bebida mineira apresenta um valor agregado na exportação quase três vezes maior que a média nacional,

como aconteceu no ano de 2006. Porém, tanto os importadores quanto os consumidores brasileiros podem ter dificuldades para diferenciar o produto no que se refere aos padrões de conformidade, devido à grande quantidade de marcas e variedades de características das bebidas (SORATTO et al., 2007). Dessa forma, medidas adotadas pelos produtores em busca da certificação são necessárias para a adequação do produto aos novos mercados e às exigências dos consumidores.

A regularização da produção demanda fiscalização da qualidade da bebida, buscando a definição de características particulares correspondentes à cachaça e determinando os parâmetros a serem seguidos por todas as marcas. Já existe a modalidade de certificação voluntária para a cachaça produzida no Brasil (INMETRO, 2005), que auxilia na manutenção de propriedades organolépticas em uma mesma safra e entre safras diferentes (ESTANISLAU et al., 2002), auxiliando na criação da identidade da cachaça em mercados internacionais (SORATTO et al., 2007).

Mesmo existindo trabalhos científicos na tentativa de alcançar sabores ideais e constantes para a bebida, buscando associar a análise da composição química aos testes sensoriais de aceitação de cachaças produzidas em Minas Gerais (GOMES et al., 2007; SILVA et al., 2009), poucos estudos são realizados para definir os parâmetros que influenciam na qualidade do produto. O monitoramento destes parâmetros, a higienização correta dos equipamentos, a utilização e propagação adequada de linhagens iniciadoras selecionadas são de grande relevância para a elevação da qualidade da cachaça (GOMES et al., 2007). No entanto, estas práticas fazem parte da rotina de produção em apenas algumas destilarias e ainda assim não são suficientes para evitar que microrganismos indesejáveis se multipliquem durante a fermentação.

## 2.2. Produção da cachaça

As matérias-primas, a fermentação, a destilação e o envelhecimento determinam a natureza e qualidade dos componentes da cachaça (DATO et al., 2005). A matéria-prima básica para a fabricação da cachaça é a cana-de-açúcar madura, sadia, recém cortada e limpa. A safra ocorre de maio a dezembro, e cada variedade de cana tem seu ponto de maturação em determinada época. Não se deve cortar a cana e deixá-la no campo por tempo superior a 24 h, pois desta forma ela começa a fermentar antes da moagem e assim o rendimento em cachaça será menor que o obtido com a cana fresca (PEREIRA et al., 2006).

A cana é triturada nas moendas, que devem possibilitar o máximo de extração de caldo. O caldo-de-cana obtido pela moagem é constituído de água entre 78 e 86%, sacarose entre 11 e 18%, açúcares redutores entre 0,2 e 1%, cinzas entre 0,3 e 0,5% e compostos nitrogenados entre 0,3 e 1%. O mesmo é filtrado e clarificado por decantação, que retira parte das impurezas em suspensão, para depois ser diluído (AQUARONE et al., 2001; LIMA et al., 2001; MAIA & CAMPELLO, 2006; PEREIRA et al., 2006; SCHWAN et al., 2006; AMPAC, 2007). Observa-se que quando se padroniza o teor de açúcar do caldo diluído, as fermentações tornam-se mais fáceis de serem controladas, pois apresentam uma taxa constante de consumo dos açúcares, num total de 24 a 30 horas para que o processo seja finalizado (AQUARONE et al., 2001; CARDOSO, 2006; MAIA & CAMPELLO, 2006).

A etapa seguinte é a fermentação do caldo, quando é produzido álcool etílico como principal produto e a maioria dos compostos que são responsáveis pelo sabor (LEHTONEN & JOUNELA-ERICKSSON, 1983), como aldeídos, metanol, álcoois superiores, ácidos e ésteres. O processo fermentativo para a produção de cachaça pode ser dividido em duas fases: A) a fase de propagação das populações constituintes do fermento; e B) a fase da fermentação alcoólica propriamente dita, na qual acontece a conversão de açúcar do caldo em etanol e gás carbônico (PATARO et al., 1998).

A primeira fase da fermentação é relacionada com a propagação de microrganismos, feita sob intensa aeração e normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja

superior a 2-3% (p/v). Concentrações mais altas prejudicam a respiração celular, que é indispensável para um crescimento eficiente. Um dos aspectos característicos da produção artesanal de cachaça é a utilização de fermento “caipira”, constituído por populações de microrganismos selvagens presentes nas matérias-primas e nos equipamentos de transporte e moagem de cana. Em Minas Gerais, tradicionalmente, cada produtor obtém o fermento utilizando caldo de cana enriquecido com farinha de milho, farelo de arroz e/ou soja, de acordo com critérios próprios (MORAIS et al., 1997; CLETO, 1997; PATARO et al., 2000). Uma forma alternativa de se iniciar a fermentação é por meio da utilização de leveduras selecionadas. Uma grande quantidade de células de uma linhagem com características desejáveis é inoculada no caldo de cana, a fim de que o processo seja conduzido de forma mais controlada. Como estão presentes no mosto em números muito maiores do que qualquer outra espécie de microrganismo, a população desta linhagem iniciadora utilizará o substrato com mais eficiência, prevalecendo sobre linhagens selvagens de leveduras durante a fermentação (LONGO et al., 1992). O uso de leveduras iniciadoras comerciais isoladas de regiões vinícolas é uma prática de fermentação controlada que se disseminou porque demanda menos tempo para que a produção se inicie e pode aumentar a qualidade dos vinhos produzidos (FLEET et al., 1985; QUEROL et al., 1992; VALERO et al., 2007). A preparação do fermento ocorre no início da produção de vinhos ou após o fermento ser descartado, e geralmente é utilizado um inóculo de 1 a 5 L para que se inicie a próxima etapa (PEREIRA et al., 2006).

A segunda fase da fermentação da cachaça muitas vezes é realizada segundo o sistema convencional chamado de bateladas, que consiste em colocar juntos na dorna o inóculo e todo o meio a ser fermentado. A concentração de açúcares ideal no caldo é de 14 a 16° Brix e com valores de pH entre 5,2 e 5,8. Acima de 16° Brix as fermentações são mais lentas, sendo necessário diluir o caldo de cana, para garantir a estabilidade do fermento ao longo de todo o ciclo fermentativo (GOMES et al., 2009). A observação destes valores favorece a fermentação, que poderá acontecer de forma rápida e completa. Após a adição de caldo de cana diluído, inicia-se a fase tumultuosa da fermentação alcoólica, processo anaeróbico que ocorre sem necessidade de agitação ou aeração. Nesta fase, as

leveduras convertem o açúcar em etanol e CO<sub>2</sub>. Durante o processo, os gases liberados formam uma coluna de bolhas que agitam o meio, distribuem as células e afloram na superfície (AQUARONE et al., 2001; LIMA et al., 2001; MAIA & CAMPELLO, 2006; PEREIRA et al., 2006). A atividade fermentativa cessa devido ao consumo total dos açúcares presentes no caldo, simultaneamente é alcançada a concentração máxima de etanol, e os microrganismos se depositam no fundo da dorna. Neste momento o caldo fermentado é chamado de vinho, encontra-se límpido, com superfície espelhada e está pronto para ser destilado. O período que vai desde a adição de novo caldo até a formação do vinho e que corresponde ao consumo total de açúcar presente no mosto é chamado de ciclo fermentativo (PATARO et al., 1998).

Quando o vinho apresenta baixa concentração de etanol, altos níveis de acidez em ácido acético e de açúcares residuais, pode ter ocorrido a contaminação do fermento por linhagens indesejáveis de leveduras, bactérias lácticas ou acéticas nas dornas de fermentação. Vinhos deste tipo não apresentam bom rendimento em relação à quantidade de cachaça a ser obtida, pois o açúcar pode não ter sido utilizado pelas linhagens de leveduras constituintes do fermento (PATARO et al., 2002a). O conteúdo da dorna é então descartado e faz-se necessária uma nova preparação de fermento.

A etapa seguinte é a destilação, que deve acontecer rapidamente após a fermentação, a fim de evitar a contaminação do vinho por microrganismos indesejáveis, que podem alterar o aroma e sabor da bebida. Caso ocorra muito tempo depois, os níveis de acidez tendem a ser elevados principalmente devido à fermentação realizada pelas bactérias, gerando principalmente ácido láctico e acético (GALLO & CANHOS, 1991; GOMES et al., 2009). Para a produção de cachaça em Minas Gerais, a destilação é tradicionalmente feita em alambiques de cobre. A cachaça pode ser armazenada em tonéis de madeira ou aço inoxidável, e, em algumas destilarias, envelhecida em barris de madeira, antes do engarrafamento.

### **2.3. Microrganismos envolvidos na etapa fermentativa da produção da cachaça**

As comunidades microbianas envolvidas na produção de bebidas fermentadas e destiladas de qualidade têm sido caracterizadas a fim de verificar a diversidade de microrganismos e elucidar a influência que exercem sobre a qualidade das bebidas alcoólicas (FLEET & HEARD, 1993; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2001; FLEET, 2003; MORRISSEY et al., 2004; GOMES et al., 2007). Dentre os microrganismos adaptados às condições de fermentação estão as leveduras e as bactérias. Os resultados do acompanhamento da produção de cachaça mostram que o ciclo fermentativo é um complexo processo microbiano, com predominância de *S. cerevisiae* (PATARO et al., 2000; SCHWAN et al., 2001; ARAÚJO et al., 2007; GOMES et al., 2007). As leveduras envolvidas na fermentação do caldo de cana são pertencentes aos gêneros: *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; SCHWAN et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Da mesma forma como acontece em fermentações para a produção de vinhos, durante a formação do fermento inicial na produção de cachaça de alambique, a atividade dos microrganismos promove a acidificação do mosto e leva ao aumento na concentração alcoólica, o que acarreta o desaparecimento de algumas espécies de leveduras (TORIJA et al., 2003; PATARO et al., 1998). Essas mudanças no mosto, aliadas à alta concentração de açúcar (devido à adição diária de caldo de cana), influenciam a seleção de espécies prevalentes na produção de cachaça (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 2000). Verifica-se uma variação das contagens de microrganismos ao longo dos ciclos fermentativos, pois cada linhagem ou espécie de levedura apresenta maior ou menor sensibilidade às substâncias formadas e aos diferentes níveis de estresse provocados durante as fermentações (ARAÚJO et al., 2007; GOMES, 2002; PATARO et al., 2000; VIANNA et al., 2008).

PATARO e colaboradores (1998) estudaram as características da fisiologia de crescimento de 210 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de um alambique de cachaça no estado de Minas Gerais. A maioria das linhagens estava fisiologicamente adaptada às condições ambientais observadas nas dornas de fermentação, sendo capazes de crescer

a 35° C, em meio contendo 25% de glicose e em concentração de 5% (v/v) de etanol. GOMES e colaboradores (2007) verificaram que três linhagens de *S. cerevisiae* conseguiram fermentar em temperaturas médias de 44°C, cresceram em concentrações de etanol entre 10-14%, e acumularam níveis de trealose que variaram entre 16,4 a 51,2 µmol de glicose a cada grama de peso úmido. Estes resultados corroboram com outros estudos e mostram que as linhagens de *S. cerevisiae* conseguem resistir às condições adversas da fermentação, sendo aquelas que permanecem e prevalecem durante o processo (GOMES, 2002; PATARO et al., 2002a; PATARO et al., 2002b; SILVA et al., 2009).

As populações de leveduras não-*Saccharomyces* podem ser encontradas em equipamentos e maquinarias, e em cada fase da fermentação de bebidas, como o vinho e a cidra (PALLMANN et al., 2001; JOLLY et al., 2006). Estas leveduras são responsáveis pela produção de enzimas e de altas concentrações de compostos secundários durante as fermentações, dentre os quais ácido acético, ésteres e acetoína, que possuem grande influência na qualidade sensorial de vinhos (HIERRO et al., 2005; ROJAS et al., 2001; ROMANO et al., 2003). Leveduras não-*Saccharomyces* também estão envolvidas na produção de cachaça e freqüentemente tem sido observada a substituição natural da população do inóculo inicial de *S. cerevisiae* por leveduras selvagens durante a fermentação do mosto de caldo de cana (GOMES et al., 2007; PATARO et al., 2000; SCHWAN et al., 2001; BERNARDI et al., 2008).

Contudo, algumas populações subdominantes de leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* conseguem resistir às altas concentrações de álcool (GOMES et al., 2009). Algumas delas são descritas por HIERRO e colaboradores (2005) como importantes em processos de fabricação de vinho, devido à liberação de enzimas, proporcionando características típicas da região onde a bebida é produzida. Os autores haviam analisado mostos de uvas muito maduras e detectaram em etapas finais da fermentação, assim como após o término do processo, a presença de *Candida stellata*. Esta espécie altamente fructofílica foi indicada pelos autores como utilizável biotecnologicamente, podendo ser inoculada juntamente com *S. cerevisiae*, a fim de

promover o consumo mais completo de açúcares. PATARO e colaboradores (2000) também identificaram esta espécie a partir de fermentações tardias (120 dias) em uma destilaria de cachaça de Minas Gerais. Os autores acompanharam a propagação de populações de leveduras constituintes do fermento identificando diferentes espécies após o cultivo em diferentes meios de cultura. Além de *S. cerevisiae*, as principais leveduras encontradas durante a propagação do fermento foram: *Candida* spp., *Kloeckera japonica*, *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia* spp., *P. anomala*, *P. membranifaciens* e *Saccharomyces servazzii*-similar.

A utilização de leveduras não-*Saccharomyces* em produção de cachaça também deve ser avaliada sob outros aspectos, porque a presença de diferentes espécies em um processo tão complexo como a fermentação pode interferir negativamente na qualidade do produto final. Da mesma forma, muitas vezes as leveduras são selecionadas e testadas em escala de laboratório com resultados satisfatórios, mas os mesmos podem não se repetir em experimentos em larga escala, pois o desempenho sofre influências diretas do clima e das condições das destilarias (GOMES et al., 2009). DATO e colaboradores (2005) compararam cachaças produzidas com *S. cerevisiae* de panificação e linhagens selvagens de *P. siilvicola*, *P. anomala* e *Dekkera bruxelensis* isoladas de destilarias em São Paulo. Os autores verificaram que os níveis de compostos secundários das cachaças foram influenciados pelo pH do vinho, que variou de acordo com as linhagens utilizadas. A cachaça produzida com *S. cerevisiae* apresentou valores ligeiramente superiores de compostos secundários totais, enquanto as cachaças produzidas com as linhagens selvagens apresentaram maiores teores de álcoois superiores. Apesar de os teores de compostos secundários seguirem os limites permitidos pela legislação, estas cachaças não foram submetidas a testes de aceitação por degustadores, o que provavelmente pode modificar a avaliação sensorial da qualidade.

OLIVEIRA e colaboradores (2005) produziram 10 cachaças em escala de laboratório, utilizando diferentes linhagens de leveduras pertencentes às espécies *S. cerevisiae*, *C. apicola*-similar, *K. javanica*, *P. subpelliculosa* e *Schizosaccharomyces pombe*. As cachaças obtidas apresentaram diferentes teores de compostos secundários e foram

submetidas à análise sensorial. A maioria das cachaças não apresentava diferenças estatisticamente significativas nos testes de aceitação, e os autores puderam concluir que as leveduras não-*Saccharomyces* não exerceram influência negativa sobre a qualidade sensorial da cachaça. No entanto, aquela produzida com *S. pombe* apresentou nota inferior em relação ao atributo aroma quando comparada à cachaça produzida com uma das linhagens de *S. cerevisiae*.

Pouco foi estudado sobre a interferência das leveduras não-*Saccharomyces* e de outros tipos de microrganismos, como as bactérias lácticas, sobre a produção de cachaça (DATO et al., 2005). Estas bactérias podem participar da produção de bebidas alcoólicas, associando-se às leveduras em processos fermentativos mistos ou subseqüentes, como a fermentação malolática para produção de vinho ou a fermentação láctica tardia para produção de uísque (BRYAN-JONES, 1975). Sabendo-se da importância destes microrganismos na composição de buquês aromáticos de diferentes bebidas, torna-se essencial avaliar a presença destas bactérias em fermentações contaminadas para a produção de cachaça de alambique em Minas Gerais. O caldo de cana é um substrato rico em nutrientes, extraído em condições não assépticas, no qual podem ser carreadas populações de microrganismos que são introduzidas nas dornas de fermentação. Em um estudo sobre fermentações realizadas em uma usina produtora de álcool combustível no Brasil, GALLO (1992) verificou que as maiores populações bacterianas neste substrato são representadas pelas bactérias lácticas. SCHWAN e colaboradores (2001) estudaram a microbiota fermentativa em quinze destilarias de cachaça no sul de Minas Gerais. Os autores encontraram os gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* como predominantes, perfazendo 71% e 24 % do total de bactérias isoladas, respectivamente. Neste estudo as contagens de bactérias lácticas durante as 24 h do ciclo fermentativo ficaram em torno de  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL e a de leveduras em torno de  $10^7$ - $10^9$  UFC/mL.

GOMES (2006) caracterizou a comunidade bacteriana presente em fermentações conduzidas e espontâneas em uma destilaria localizada em Minas Gerais. Os resultados mostraram que as bactérias lácticas estão presentes em todo o processo de produção. As técnicas moleculares empregadas na identificação demonstraram que a comunidade

bacteriana era diferente quando se compararam duas safras. A técnica molecular dependente de cultivo mostrou que as espécies mais frequentes foram *Lactobacillus plantarum* (na primeira safra analisada) e *L. casei* (na segunda). Porém estas frequências não foram as mesmas quando as amostras foram analisadas pela técnica independente de cultivo, que, por meio da análise de sequências do 16S rDNA, apontou uma maior diversidade de *Lactobacillus* e de outras espécies bacterianas do que por meio do isolamento em Agar MRS.

Resultados semelhantes foram encontrados por SILVA (2007). Durante dois experimentos de fermentação conduzida em uma destilaria de Minas Gerais, *L. casei* e *L. plantarum* foram isoladas em altas contagens em todas as fermentações analisadas. Neste mesmo trabalho, foram encontradas grandes populações bacterianas desde o início dos experimentos, ainda assim, a cachaça produzida apresentou valores inferiores ao limite de acidez de 150mg/100 mL de ácido acético permitido pela legislação.

#### **2.4. Possíveis contaminantes das fermentações de cana-de-açúcar**

A contaminação microbiana do vinho é um dos fatores que levam a perdas econômicas e ainda é um problema vivenciado pela maioria dos produtores de cachaça. No entanto, ainda não existem estudos que tratem especificamente da caracterização de microrganismos envolvidos em contaminações destas fermentações. Algumas leveduras não-*Saccharomyces* e determinadas espécies de bactérias lácticas podem competir com as linhagens desejáveis de *S. cerevisiae* pelos nutrientes presentes no mosto, reduzindo a produção de etanol. Esses microrganismos também podem ser capazes de prejudicar a qualidade da cachaça, introduzindo metabólitos indesejáveis na fermentação, como ácidos orgânicos. Ácido acético, assim como o ácido láctico e succínico abaixam o pH do mosto, conferindo-lhe sabor desagradável. Mesmo que não haja uma correlação exata sobre a contaminação e a perda de álcool produzido, sabe-se que cada molécula de açúcar utilizado pelas bactérias para a produção de ácido láctico resulta na perda de duas moléculas de etanol (NARENDRANATH et al., 1997).

As bactérias láticas são indicadas por alguns autores como promotoras de fermentações indesejáveis (COOPERSUCAR, 1983). GALLO (1992) verificou que bactérias láticas podem deteriorar a cana colhida, reduzindo o tempo de estocagem; introduzir no processo produtos de metabolismo indesejáveis e assim causam alterações ambientais desfavoráveis às leveduras durante a fermentação. Segundo o autor, altas contaminações bacterianas (acima de  $10^7$  bactérias/mL) podem provocar floculação e perda do fermento; consumo de sacarose e outros nutrientes do mosto que seriam utilizados pelas leveduras, além de outros inconvenientes que somados podem levar a perdas no rendimento alcoólico da fermentação. A permanência dessas bactérias no mosto pode ser devida à sua resistência às altas temperaturas e baixos valores de pH. O aparecimento de contaminações bacterianas nas fermentações pode ser devido às más condições de armazenamento da cana, à falta de assepsia da sala de fermentação e de limpeza das dornas e canalizações, à ausência do controle de acidez e à ausência de treinamento dos funcionários (YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991; GALLO, 1992; ALVES & BASSO, 1998; LOPES et al., 2004).

A presença de *Lactobacillus* spp. parece estar relacionada com a diminuição da qualidade do vinho (PLESSIS et al., 2004), sendo que existem relatos de algumas linhagens de *L. plantarum* que podem gerar excesso de viscosidade, aumento do ácido acético, além de aroma e sabor desagradáveis devido à formação de aldeídos. Dependendo da espécie ou mesmo linhagem, e do estágio em que ocorrem durante a produção de vinhos, as bactérias láticas podem produzir glucanos, aminas biogênicas e precursores do carbamato de etila, os quais prejudicam a qualidade do produto e a saúde do consumidor (LONVAUD-FUNEL, 1999). PLESSIS e colaboradores (2004) demonstraram que nem todas as espécies de bactérias láticas exercem influências negativas ao processo fermentativo. Os autores estudaram as fermentações para a produção de conhaques africanos e encontraram como espécies mais freqüentes de bactérias láticas *Lactobacillus brevis* e *Oenococcus oeni*. *O. oeni* apresentou uma influência favorável, enquanto *Lactobacillus* spp. pôde ser relacionado ao decréscimo de qualidade dos vinhos.

No entanto, as leveduras também são potenciais contaminantes de fermentações para a produção de cachaça. Populações de leveduras não-*Saccharomyces* são citadas na enologia como transitórias em fermentações porque, além de geralmente não sobreviverem em altas concentrações de etanol, não fermentam todos os açúcares presentes no mosto. Estes e outros gêneros de leveduras, como *Brettanomyces*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichia*, podem apresentar comportamento ambíguo, principalmente em fermentações realizadas com fermento “caipira”. Enquanto algumas espécies apresentam perfis metabólicos favoráveis, outras são possíveis contaminantes em fermentações para produção de vinho, como por exemplo *C. glabrosa*, *C. maritima*, *C. solane*, *P. guilliermondii*, *P. fermentans* e *P. petersonii*. Provenientes do solo ou da água, elas são presentes em baixas contagens e esporadicamente podem ser isoladas em amostras de vinhos (PRETORIUS, 2000; GONZALEZ et al., 2006, JOLLY et al., 2006).

Apenas alguns trabalhos têm como objetivo principal identificar os microrganismos envolvidos nas fermentações contaminadas durante a produção de cachaça. Um estudo identificou bactérias contaminantes do fermento “caipira” para a produção de cachaça no estado de São Paulo por meio de técnicas independentes de cultivo (CARVALHO-NETTO et al., 2008). Microrganismos como *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum*, espécies de *Lactobacillus* e bactérias não conhecidas foram identificados em amostras do primeiro, nono e trigésimo dias da fermentação. A identificação de bactérias ainda não relacionadas a fermentos e a diversidade de gêneros encontrados entre as amostras comprovaram que a comunidade de bactérias contaminantes do processo fermentativo é muito mais complexa do que o esperado.

## **2.5. Substâncias antagonistas produzidas por microrganismos**

A competição por nutrientes e espaço é um dos maiores fatores que determinam a sucessão e estabelecimento dos microrganismos. Em muitos casos, os metabólitos

produzidos alteram o ambiente, e assim criam condições desfavoráveis para a sobrevivência de outras populações em um determinado habitat. Essas interações são conhecidas como antagonismo e algumas dessas substâncias antimicrobianas produzidas são não-específicas. Uma dessas relações de antagonismo entre leveduras é a produção de micocinas, observada pela primeira vez por BEVAN & MAKOWER (1963).

As micocinas (toxinas "killer") são proteínas ou glicoproteínas que interferem no crescimento de linhagens sensíveis, possuem uma ótima atividade em baixo pH e geralmente são inativas em temperaturas elevadas. As glicoproteínas são as principais substâncias antagonistas extracelulares produzidas e podem ser fungicidas ou fungistáticas (GOLUBEV, 2006). Existem diversos tipos de toxinas "killer", que geralmente são secretadas durante o crescimento exponencial e matam células sensíveis por meio da inibição da síntese de macromoléculas e dos danos causados à membrana plasmática (GOLUBEV, 1998).

Em indústrias de fermentação, o caráter "killer" das leveduras pode ser utilizado como forma de combater linhagens selvagens ou contaminantes de *S. cerevisiae* ou outras espécies. As leveduras apiculadas dos gêneros *Kloeckera/Hanseniaspora*, por exemplo, são dominantes em superfícies de frutos utilizados como matérias-primas para a fabricação de bebidas, como as uvas (MARTINI et al., 1996). Em vinhos, o controle destas populações ocorre com a adição de SO<sub>2</sub>, mas essa não é uma prática usual para a produção de bebidas destiladas. Portanto, como forma de evitar a proliferação de espécies indesejáveis, a utilização de linhagens produtoras, ou mesmo de micocinas purificadas podem ser de grande relevância para a redução de contaminações (LOWES et al., 2000; CIANI & FATICHENTI, 2001).

CORRÊA (1999) verificou que na entressafra da produção de cachaça em Minas Gerais, uma média de 20% da comunidade total de leveduras produziu toxinas contra as linhagens sensíveis testadas, *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 366) e *S. cerevisiae* (NCYC 1006). Em uma das destilarias, a maior fonte de isolados micocinogênicos foi a moenda, e em outra, foram as moscas do gênero *Drosophila* que estavam no ambiente de fermentação. As espécies micocinogênicas comuns às três destilarias estudadas

foram *P. anomala*, *Issatchenkia occidentalis* e *S. cerevisiae*. Espécies produtoras de micocinas estiveram presentes no mosto fermentado das três destilarias durante diferentes momentos da produção de cachaça e foram identificadas como *C. famata*, *C.ingens*-similar, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae* e *S. exiguus*.

A produção de micocinas por leveduras suscita questões acerca da competição entre leveduras, e como esta atividade micocinogênica afeta a cinética das fermentações (ROSINI, 1983). A produção de micocinas por linhagens fermentadoras é uma importante característica adaptativa, já que fermentações conduzidas por linhagens sensíveis podem ser interrompidas se ocorrer a contaminação da dorna com uma levedura produtora de micocina. Desta maneira, podem ser atingidos altos níveis de açúcares residuais, atraso no tempo de fermentação, altos teores de acidez volátil e diferenças na produção de etanol e glicerol (HEARD & FLEET, 1986; JACOBS et al., 1988). Portanto, a verificação da atividade micocinogênica de leveduras em fermentações contaminadas é de grande relevância para a compreensão da ecologia dos microrganismos durante a produção de cachaça.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivos gerais

Caracterizar 15 amostras de fermentações contaminadas de 6 destilarias em Minas Gerais, quanto aos parâmetros químicos nos vinhos contaminados, realizar as contagens totais de microrganismos, verificar a diversidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e a presença de leveduras não-*Saccharomyces*, e ainda avaliar a produção de micocinas pelas leveduras.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar, nas 15 amostras de vinho contaminado coletados em Minas Gerais, a concentração de etanol e de glicerol, os teores de acidez volátil e de açúcares totais;
- Quantificar as populações de bactérias lácticas e de leveduras em vinhos contaminados durante a fermentação para produção de cachaça;
- Identificar as leveduras por meio de técnicas morfológico – fisiológicas, separando-as em dois grupos: *Saccharomyces cerevisiae* e espécies não-*Saccharomyces*;
- Identificar as leveduras não-*Saccharomyces* por meio de sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA;
- Diferenciar as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por meio da técnica de análise do polimorfismo de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA RFLP);
- Verificar o potencial micocinogênico das leveduras provenientes da mesma dorna de fermentação, e sua atividade *killer* contra as leveduras da mesma dorna e contra as linhagens de referência para o teste (*Candida glabrata* NCYC 366, *S. cerevisiae* NCYC 1006, *Pichia kluyveri* UFMG-A15, *S. cerevisiae* K1 e K2) e contra linhagens iniciadoras utilizadas na produção de cachaça (UFMG-A1007 e UFMG-A1031).

## 4. Metodologia

### 4.1. Coleta das amostras de mostos fermentados

As coletas foram realizadas em seis diferentes destilarias de Minas Gerais que apresentaram fermentações contaminadas durante a safra do ano de 2007. As destilarias foram numeradas de 1 a 6 e as amostras foram numeradas de 1 a 15. Na Destilaria 1, localizada na cidade Salinas (macrorregião do vale do Jequitinhonha) foram coletadas as amostras 1, 2, 3 e 4. Na Destilaria 2, localizada em Jequitibá (macrorregião metalúrgica/campo das vertentes) foram coletadas as amostras 5, 6, 7 e 8. A Destilaria 3 é localizada em Morro da Garça, macrorregião Alto do São Francisco, e nela foram coletadas as amostras 9 e 10. A Destilaria 4 onde foram coletadas as amostras 11 e 12, assim como a Destilaria 5, onde foram coletadas as amostras 13 e 14 se localizam em São Joaquim de Bicas (macrorregião metalúrgica/campo das vertentes). Por último, a amostra 15 foi coletada na Destilaria 6 em Novo Cruzeiro (macrorregião Rio Doce) (tabela 3).

As amostras foram coletadas após a contaminação do vinho ter sido detectada pelos produtores. As fermentações foram consideradas contaminadas quando o destilado produzido apresentasse características organolépticas desagradáveis e o vinho apresentasse elevada acidez, viscosidade atípica, ou estagnação do processo fermentativo (mais de 24 horas para se atingir o consumo total de açúcares). As 15 amostras analisadas neste trabalho foram coletadas de mostos fermentados contaminados procedentes de fermentações espontâneas (que utilizam fermento “caipira”) e conduzidas (nas quais a propagação do fermento foi feita utilizando-se linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*).

Antes da coleta, o conteúdo da dorna foi homogeneizado com bastão plástico desinfetado com auxílio de uma gaze estéril embebida em álcool 70%. Para que o recipiente de coleta totalmente esterilizado pudesse alcançar o fundo da dorna, e para evitar qualquer contato do coletor com o mosto ou vinho, foram esterilizados frascos de 300mL, cujas tampas foram presas aos gargalos com um barbante de 2 m de comprimento.

As amostras foram conservadas e transportadas sob resfriamento para o laboratório, e processadas em, no máximo, 8 h após a coleta. Após as análises microbiológicas, o restante da amostra foi conservado a -20°C, para realização das análises químicas.

## **4.2. Análise dos parâmetros químicos das amostras**

### **4.2.1. Determinação dos teores de açúcares totais**

Para a determinação dos teores de açúcares totais foi utilizada a metodologia do DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) desenvolvida por MILLER (1959). Inicialmente foi realizada uma hidrólise ácida, para a conversão de sacarose em açúcares redutores (glicose e frutose). Uma alíquota de 2 mL da amostra foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico 2N. O balão foi colocado em banho-maria a 70°C durante 30 min. Em seguida, o balão foi resfriado e seu conteúdo neutralizado com 5 mL de hidróxido de sódio 2N, e o volume completado com água destilada. A leitura da absorbância em comprimento de onda de 505 nm foi realizada em espectrofotômetro (modelo Shimadzu UV160A). Quando necessário, outras diluições foram realizadas nas amostras, para que a concentração das mesmas estivesse dentro da faixa de linearidade da curva de calibração.

### **4.2.2. Determinação da concentração de acidez volátil**

A acidez foi determinada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,025N, segundo ABNT (1997a). Para a determinação da acidez, 100 mL de água destilada que foi aquecida até o início da ebulição e resfriada até 70°C foram colocados em Erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se 5 gotas de fenolftaleína. Então foi efetuada a titulação de 2 mL de vinho bruto. O volume gasto foi anotado e o cálculo da acidez titulável foi feito pela seguinte equação:

$$A = \frac{V_t \times f_c \times N \times E_g}{10 \times V_a}$$

onde:

A = acidez expressa em g de ácido acético/100 mL de amostra;

V<sub>t</sub> = volume gasto (mL) de solução de NaOH 0,025N;

f<sub>c</sub> = fator de correção da solução de NaOH 0,025N;

N = normalidade da solução de NaOH 0,025N;

E<sub>g</sub> = Equivalente-grama do ácido acético (60,0 g);

V<sub>a</sub> = volume (mL) da alíquota da amostra.

#### **4.2.3. Determinação da concentração de etanol**

A concentração de etanol foi determinada espectrofotometricamente pelo método do dicromato de potássio modificado (ABNT, 1997b). Amostras de 25 mL de vinho foram destiladas por arraste de vapor em microdestilador Tecnal de álcool (Modelo TE-012) até se obter aproximadamente 50 mL de destilado. As amostras foram diluídas na proporção de 1 mL de amostra para 25 mL de água destilada.

#### **4.2.4. Determinação da concentração de glicerol**

A dosagem da concentração de glicerol nas amostras foi realizada utilizando-se o kit para dosagem de triglicérides (LABORLAB).

### 4.3. Processamento das amostras e isolamento dos microrganismos

Diluições decimais seriadas da amostra foram realizadas em tubos de ensaio contendo água peptonada (peptona bacteriológica 0,1%). Cada amostra diluída foi inoculada em três meios de cultura para a obtenção de colônias isoladas. Foram utilizados os meios Ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe; Merck, acrescido de 0,01 % de cicloheximida e seletivo para bactérias lácticas), Ágar Lisina (seletivo para leveduras não-*Saccharomyces* spp.; composto por YCB 1,17%, Lisina 0,056%, agar 2% e 0,01% de cloranfenicol), e Ágar SCY (seletivo para leveduras *Saccharomyces* spp.; composto por caldo de cana 10%, extrato de levedura 0,5%, agar 2% e 0,01% de cloranfenicol), de acordo com as metodologias descritas por SIQUEIRA (1995) e PATARO et al. (2000).

Os meios de cultura foram inoculados em triplicata com 0,1 mL de duas diluições da amostra. As diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-3}$  foram utilizadas para inocular o meio de cultura ágar Lisina, e as diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram utilizadas para inocular os meios de cultura ágar MRS e ágar SCY. Os meios para isolamento de leveduras foram incubados à temperatura de 28°C por 3 a 10 dias, e o meio para isolamento de bactérias lácticas foi incubado em anaerobiose a 37°C, por 48 a 72 h.

Após o período de incubação, os morfotipos das colônias foram contados e morfologicamente caracterizados quanto à textura, forma, cor, tamanho, e registrados juntamente com os dados de procedência (data, nome da destilaria e da cidade onde foi realizada a coleta). As bactérias lácticas foram purificadas por meio de técnica de esgotamento em ágar MRS e as leveduras, em ágar Sabouraud (glicose 2%, peptona bacteriológica 1 %, extrato de levedura 0,5 % e ágar 2%), para obtenção de culturas puras.

Para a manutenção das leveduras, uma colônia de cada isolado foi inoculada em tubo de ensaio contendo 2mL de caldo GYMP (glicose 2%; extrato de levedura 0,5%; extrato de malte 1%; fosfato de potássio dibásico 0,2%) e incubados por 24 a 48 h a 28°C. Transcorrido esse período, 1mL de cada amostra foi transferido para tubos criogênicos onde foi adicionado 0,2 mL de glicerol. Os criotubos foram estocados em freezer a -20°C por três horas e posteriormente transferidos para ultrafreezer a -80°C.

As bactérias isoladas a partir do meio MRS foram submetidas ao teste de Gram e da Catalase (SHARPE, 1979). Para a manutenção das colônias de bactérias lácticas, uma colônia de cada isolado foi inoculada em tubo criogênico contendo 1mL de caldo MRS e incubada por 24 a 48 horas a 28°C. Transcorrido esse período, foi adicionado 0,2 mL de glicerol. Os criotubos foram estocados em freezer a -20°C.

#### **4.4. Caracterização e identificação de leveduras**

##### **4.4.1. Identificação de leveduras por métodos fisiológicos e morfológicos**

Inicialmente, a caracterização fisiológica das leveduras foi realizada utilizando testes fisiológicos de fermentação de glicose, crescimento em meio líquido a 37 e 40°C, assimilação das fontes de carbono glicose, sacarose, D-manitol, da fonte de nitrogênio lisina, e resistência à cicloheximida. Os isolados que apresentaram crescimento em D-manitol, lisina e foram resistentes à cicloheximida foram considerados como leveduras não-*Saccharomyces*. A espécie *S. cerevisiae* não cresce em lisina como fonte de nitrogênio, e em manitol como fonte de carbono, além de serem sensíveis a cicloheximida (KURTZMAN & FELL, 1998). Aqueles que fermentaram glicose e apresentaram resultados negativos para os testes acima mencionados, além de serem capazes de assimilar sacarose e fermentar glicose, foram considerados presuntivamente como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*.

As leveduras não-*Saccharomyces* foram posteriormente testadas segundo métodos descritos por YARROW (1998) e foram identificadas utilizando-se as chaves taxonômicas presentes em KURTZMAN & FELL (1998). Aliado à caracterização morfológica da colônia e microscopia, este procedimento foi utilizado para que as leveduras de um mesmo perfil fisiológico fossem agrupadas.

##### **4.4.2. Caracterização molecular das linhagens de *S. cerevisiae***

As leveduras isoladas a partir de SCY e pertencentes à espécie *S. cerevisiae* foram diferenciadas por meio da metodologia da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (QUEROL et al., 1992; 1994).

Para a extração do DNA, as células foram ativadas em ágar Sabouraud e posteriormente crescidas em 5 mL de caldo YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1% glicose) por aproximadamente 18 h a 150 rpm/25°C. Após a centrifugação a 3000 rpm por 15 min, as células foram lavadas em água destilada e centrifugadas novamente. O sedimento foi ressuscitado em 500µL de solução de enzima lítica de *Rhizoctonia solani* (25mg/mL diluída em 1M sorbitol, 0,1M EDTA, pH 7,5) e a mistura foi incubada a 45°C por 2 h. Após a centrifugação a 8000 rpm por 10 min, a fase aquosa foi descartada e o sedimento foi ressuscitado em 500µL de Tris-HCl 1M e EDTA 0,5mM pH 7,4. Após a adição de 13 µL de SDS 10%, foi realizada incubação a 65°C por 5 minutos. As amostras foram acondicionadas em gelo. Seguiu-se a adição de 200 µL de acetato de potássio 5M gelado e mantidas resfriadas por 10 min, quando foi feita uma nova centrifugação a 14000 rpm por 5 min. Ao sobrenadante foram adicionados 700 µL de isopropanol, e a mistura foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Após centrifugação a 14000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%, e centrifugado por 5 min a 14000 rpm. Após ser descartado o sobrenadante, o DNA foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. A reidratação foi realizada com 30 µL de água milli Q estéril.

O DNA foi descongelado, homogeneizado e dosado em aparelho de NanoDrop (NanoDrop Technologies). A digestão do DNA foi realizada com uma solução de enzima *Hinf I* (10%), tampão de enzima de restrição (20%) e RNase (10%). Após incubação a 37°C por 6 h, os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi submetido a uma voltagem de 80 V por 3 h em TBE 0,5X. Após o tratamento com brometo de etídio, o padrão de bandejamento pôde ser visualizado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

#### 4.4.3. Identificação das leveduras não-*Saccharomyces*

Um isolado de cada grupo de microrganismos que apresentavam o mesmo perfil fisiológico-morfológico foi selecionado e então submetido ao seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA como descrito por LACHANCE e colaboradores (1999). Para a extração do DNA total, os isolados foram crescidos em ágar Sabouraud por 24 h a 25°C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de água deionizada estéril, congeladas em nitrogênio líquido por um min e, em seguida, fervidas por 10 min (DE BARROS LOPES et al., 1996; 1998). O DNA (1 µL) foi obtido diretamente do sobrenadante.

Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), segundo LACHANCE et al. (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR "high fidelity" 10X, 2 µL de MgSO<sub>4</sub> 50mM, 2 µL de dNTP 10 mM (0,2 mM cada), 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 1 a 5 µL do DNA, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 1 U/µL (Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) e água milli-Q q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 15 seg de desnaturação a 94°C, 25 seg de anelamento do iniciador a 54°C e 20 seg de extensão a 68°C, e uma extensão final por 10 min a 68°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante aproximadamente 1 h a 120 V. Os foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

Os produtos de PCR foram purificados por meio da técnica com Polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M. Após uma incubação a 37°C por 15 min, procedeu-se a centrifugação a 13.500 RPM por 15 min. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta. A seguir, foram

adicionados 125 µL de etanol 70-80% gelado, e foi feita uma nova centrifugação a 13.500 rpm por dois minutos. O etanol foi removido com auxílio da pipeta. A adição de etanol e as etapas seguintes foram repetidas. Uma nova centrifugação a 13.200 rpm por um segundo foi realizada e o DNA foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. A reidratação foi realizada com a adição de 10 µL de água, homogeneização em agitador do tipo vortex por 15 segundos e incubação a 37°C por 10 minutos.

O produto obtido foi dosado em aparelho NanoDrop ND 1000. As reações de sequenciamento foram realizadas usando o kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM – ICB - UFMG).

As seqüências de DNA foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biothecnology (ALTSCHUL et al., 1997). As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências já depositadas no GenBank, e as seqüências similares foram alinhadas usando o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para ser considerada pertencente a uma espécie conhecida, o isolado apresentou similaridade na seqüência analisada de 99% ou mais em relação à outra já depositada no GenBank. Microrganismos que apresentaram seqüências com similaridade menor ou igual a 98% na região do DNA analisada foram designados com o termo “similar”, e podem representar uma nova espécie. O poder discriminatório das seqüências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA é considerado suficiente para descrever novas espécies de leveduras, pois isolados da mesma espécie apresentam no máximo de duas a três bases diferentes não-contíguas em uma região de cerca de 600 nucleotídeos (KURTZMAN & ROBNETT, 1998).

#### **4.4.4. Caracterização das leveduras quanto à produção de micocinas**

A atividade micocinogênica foi testada de acordo com STARMER e colaboradores (1992). As leveduras foram testadas em meio YM suplementado com 0,003% de azul de metileno adicionado de tampão citrato para alcançar o pH 4,2. *Candida glabrata* (NCYC 366) (sensível a quase todas as micocinas conhecidas), *S. cerevisiae* (NCYC 1006) (sensível às micocinas produzidas por *S. cerevisiae*) e UFMG-A15 (*Pichia kluyveri*) foram as linhagens utilizadas como controles positivos para a sensibilidade às micocinas. As leveduras utilizadas como controles positivos para a produção de micocinas foram as linhagens de *S. cerevisiae* K1 e K2. A fim de verificar a capacidade de influenciar diretamente o crescimento de outras linhagens e espécies, todas as leveduras isoladas de cada amostra foram testadas quanto à atividade micocinogênica contra as linhagens iniciadoras UFMG-A 1007 e UFMG-A 1031 (leveduras tradicionalmente utilizadas como iniciadoras do processo de fabricação da cachaça em destilarias próximas a Belo Horizonte), e também contra as outras leveduras isoladas desta mesma amostra.

Colônias puras de cada isolado foram previamente inoculadas em ágar Sabouraud por 24 horas, para alcançarem a fase exponencial do crescimento. Uma grande quantidade de células de cada isolado foi diluída em 5 mL de água destilada estéril a fim de se obter uma solução supersaturada de cada levedura a ser testada. A solução foi homogeneizada e espalhada com o auxílio de uma zaragatoa estéril sobre o meio YM suplementado com azul de metileno, formando um "tapete". Após a secagem do tapete, 5 µL do precipitado proveniente da mesma solução supersaturada de cada levedura foram inoculados em ponto sobre cada tapete dos outros isolados, das leveduras padrão de sensibilidade e das leveduras iniciadoras. Desta forma, foi testada a atividade micocinogênica entre todos os isolados de uma mesma amostra, entre estes e as linhagens de leveduras iniciadoras, de referência de sensibilidade e de produção de micocinas.

As placas foram incubadas a 22° C por 7 dias e observadas diariamente. Das leveduras inoculadas em ponto, aquelas que produziram um halo de inibição ao seu redor, com uma zona adjacente azul, indicando a morte celular da linhagem do "tapete", foram consideradas positivas para a produção de micocinas e aquelas que não produziram halo

de inibição ou zona adjacente azul foram consideradas neutras. Aquelas cujo crescimento foi inibido por outras linhagens foram consideradas sensíveis (YOUNG, 1987; STARMER et al., 1992).

#### **4.5. Análises estatísticas das dosagens de parâmetros químicos e das contagens de microrganismos**

Foram testados os modelos de regressão linear multivariado e univariado, para os quais foi eleita a variável acidez total como variável dependente, considerando-se que é a única de que se dispõe de informação. Não existem legislações ou práticas a respeito dos outros parâmetros avaliados neste trabalho, e por isso os mesmos foram considerados variáveis independentes (concentração de etanol, açúcares, glicerol, material da dorna, levedura iniciadora, contagem de total de bactérias lácticas, de leveduras não-*Saccharomyces* e de *S. cerevisiae*). O programa estatístico utilizado foi o MINITAB versão 15. Todos os testes foram realizados considerando 95% de confiança.

## **5. Resultados**

### **5.1. Determinação dos teores de açúcares totais, da concentração de acidez volátil, de etanol e de glicerol.**

Dez (66,6 %) das 15 amostras de vinhos contaminados analisadas apresentaram acidez total acima de 0,6 mg/100mL. O valor médio para a acidez foi 0,90 mg/100mL. As dosagens de etanol variaram de 1,84 a 5,87 °GL (%v/v), sendo que sete amostras (46,6%) apresentaram dosagens de etanol acima da média de 3,53 °GL (%v/v). Nenhuma das amostras apresentou consumo total dos açúcares presentes no caldo. Os menores valores foram encontrados em cinco amostras (33,3%) e variaram de 1,831 g/L a 9,959 g/L. Em seis amostras (40%), os valores da dosagem de açúcares oscilaram de 10,45 a 16,89 g/L. Para três amostras (20%) foram encontrados valores entre 23,35 e 27,36 g/L. A maior dosagem de açúcares correspondeu ao valor 52,49 g/L. O valor médio para as concentrações de açúcares totais foi 15,43 g/L. As dosagens de glicerol variaram de 186,50 a 2298,24 mg/dL, e o valor médio das dosagens foi 824,16 mg/dL. Cinco amostras (33,3%) apresentaram dosagens superiores a esse valor médio (tabela 1).

**Tabela 1:** Dosagens dos parâmetros químicos acidez total, concentração de etanol, de açúcares e de glicerol nas 15 amostras de vinhos contaminados coletadas em seis destilarias de cachaça do Estado de Minas Gerais, de abril a outubro de 2007. Os valores para desvio-padrão estão indicados ao lado das dosagens.

<i><b>Amostra</b></i>	<i><b>Acidez Total (g/100mL)</b></i>	<i><b>Concentração de Etanol [°GL (%v/v)]</b></i>	<i><b>Concentração de Açúcares (g/L)</b></i>	<i><b>Glicerol (mg/dL)</b></i>
<b>1</b>	1,21 ± 0,011	1,94 ± 0,260	23,36 ± 0,042	335,58
<b>2</b>	0,92 ± 0,030	2,79 ± 0,216	10,48 ± 0,015	415,85
<b>3</b>	0,92 ± 0,071	1,84 ± 0,024	9,96 ± 0,063	217,20
<b>4</b>	1,32 ± 0,015	3,95 ± 0,091	1,83 ± 0,015	186,51
<b>5</b>	0,66 ± 0,043	4,12 ± 0,553	13,64 ± 0,014	580,10
<b>6</b>	0,49 ± 0,041	4,57 ± 0,282	12,52 ± 0,020	319,73
<b>7</b>	0,67 ± 0,028	2,44 ± 0,330	52,49 ± 0,019	648,57
<b>8</b>	0,62 ± 0,016	5,87 ± 0,497	27,36 ± 0,019	2298,25
<b>9</b>	0,50 ± 0,011	2,12 ± 0,269	25,66 ± 0,021	469,48
<b>10</b>	0,43 ± 0,008	2,63 ± 0,637	16,90 ± 0,019	1835,09
<b>11</b>	0,96 ± 0,012	2,02 ± 0,458	7,15 ± 0,017	661,40
<b>12</b>	0,32 ± 0,016	4,80 ± 0,260	2,05 ± 0,011	905,26
<b>13</b>	2,40 ± 0,020	5,04 ± 0,135	10,46 ± 0,015	1184,21
<b>14</b>	1,26 ± 0,024	5,53 ± 0,439	6,71 ± 0,013	1799,12
<b>15</b>	0,82 ± 0,061	3,28 ± 0,536	10,97 ± 0,009	506,14
<b>média</b>	0,90	3,53	15,43	824,16

## **5.2. Processamento das amostras e isolamento dos microrganismos**

Foram isolados 275 microrganismos, sendo 125 *Saccharomyces cerevisiae*, 82 leveduras não-*Saccharomyces* e 68 bactérias lácticas. Para cada amostra foram determinadas as contagens totais de microrganismos em cada meio de isolamento (tabela 2). No total foram coletadas 15 amostras em seis destilarias, em cinco cidades do estado de Minas Gerais (tabela 3).

**Tabela 2:** Contagens totais de microrganismos isolados a das 15 amostras de vinhos contaminados coletadas em seis destilarias de cachaça do Estado de Minas Gerais, de abril a outubro de 2007.

Nota: valores em  $10^6$  ufc/mL.

<i>Amostra</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Leveduras não – Saccharomyces</i>	<i>Bactérias lácticas</i>
1	24,3	0,0163	13,4
2	33,6	0,00150	12,4
3	13,5	≥ 0,0513	144
4	5,70	≥ 0,0202	14,8
5	93,3	0,0131	78,3
6	165	0,0797	94,6
7	118	0,00501	1,66
8	22,7	0,0306	2,66
9	35,6	≥ 0,0212	353
10	32,4	≥ 0,0232	452
11	19	≥ 0,0881	23,3
12	157	≥ 0,120	≥ 0,0336
13	543	0,000300	28,6
14	93,6	0,0198	262
15	26,5	0,0212	25,6
<b>Valores médios</b>	92,21	0,0341	100,42

**Tabela 3:** Relação das 15 amostras contaminadas coletadas, destilarias de origem, os problemas apresentados pelos produtores, tipo de fermentação e material da dorna.

<b><i>Amostra</i></b>	<b><i>Origem</i></b>	<b><i>Problemas</i></b>	<b><i>Tipo de fermentação</i></b>	<b><i>Dorna</i></b>
1	Salinas Destilaria 1	Acidez e lentidão	Conduzida	Inox
2	Salinas Destilaria 1	Acidez e lentidão	Conduzida	Inox
3	Salinas Destilaria 1	Acidez	Espontânea	Inox
4	Salinas Destilaria 1	Acidez	Conduzida	Inox
5	Jequitibá Destilaria 2	Acidez Odor de acroleína	Conduzida	Inox
6	Jequitibá Destilaria 2	Acidez	Conduzida	Pintada
7	Jequitibá Destilaria 2	Acidez	Conduzida	Pintada
8	Jequitibá Destilaria 2	Acidez	Conduzida	Pintada
9	Morro da Garça Destilaria 3	Aspecto amarelo e acidez	Conduzida	Pintada
10	Morro da Garça Destilaria 3	Aspecto amarelo e acidez	Conduzida	Pintada
11	S. Joaquim de Bicas Destilaria 4	Aspecto amarelo e acidez	Conduzida	Inox
12	S. Joaquim de Bicas Destilaria 4	Aspecto esbranquiçado	Conduzida	Inox
13	S. Joaquim de Bicas Destilaria 5	Lentidão e acidez	Espontânea	Pintada
14	S. Joaquim de Bicas Destilaria 5	Lentidão	Espontânea	Pintada
15	Morro do Cruzeiro Destilaria 6	Baixo rendimento e lentidão	Espontânea	Pintada

### **5.3. Caracterização e identificação de leveduras**

#### **5.3.1. Identificação de leveduras por métodos morfológicos e fisiológicos**

Todos os isolados foram submetidos a testes fisiológicos para a identificação das leveduras *S. cerevisiae*. As leveduras não-*Saccharomyces* foram agrupadas em 27 perfis fisiológico-morfológicos principais, os quais foram submetidos à identificação molecular.

#### **5.3.2. Identificação molecular das linhagens de *S. cerevisiae***

A diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* nas dornas contaminadas foi alta, tendo sido encontradas 34 linhagens (tabela 4). O número de linhagens de cada amostra variou de acordo com o tipo de fermentação realizado na dorna, se espontânea ou conduzida. As quatro amostras de fermentações espontâneas apresentaram a menor média de linhagens de *S. cerevisiae*, sendo 1,88 linhagens diferentes por dorna. As oito amostras de fermentações conduzidas pela levedura UFMG-A1031 apresentaram em média 2,5 linhagens diferentes por dorna. Duas amostras de fermentações conduzidas pela levedura iniciadora UFMG-A1007 apresentaram três linhagens e a terceira apresentou quatro linhagens, numa média de 3,33 linhagens por dorna. Assim, no presente estudo, as fermentações espontâneas contaminadas apresentaram menor diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* do que as fermentações conduzidas, sendo que dentre as fermentações conduzidas, naquelas onde foi inoculada a levedura UFMG-A1007 apresentaram maior quantidade de linhagens.

Assim sendo, cada morfotipo de *S. cerevisiae* apresentou 1 a 3 perfis diferentes após os testes de restrição do DNA mitocondrial, conforme explicado a seguir. As amostras 1, 2, 3, 4, 11, 13 e 14 apresentaram 3 perfis de restrição cada uma. Amostras 1, 2 e 4 foram conduzidas pela iniciadora UFMGA-1007, na Destilaria 1. Amostras 3 (Destilaria 1), 13 e 14 (destilaria 5) foram fermentações “caipiras”. Apenas a amostra 11 (Destilaria 4) foi conduzidas pela iniciadora UFMG-A1031. As amostras 7 e 8 (Destilaria 2) e 15 (Destilaria 6) apresentaram a menor quantidade de linhagens encontradas, ou

seja, apenas 1 perfil de restrição em cada uma. A fermentação nas amostras 7 e 8 foram conduzidas pela levedura UFMGA-1031 e a fermentação na amostra 15 foi feita com fermento “caipira”. As amostras 5 e 6 (Destilaria 2), 9 e 10 (Destilaria 3) e 12 (Destilaria 4) apresentaram dois perfis de restrição cada uma, e todas foram conduzidas pela iniciadora UFMG-A1031. Na tabela 4 são mostrados, por amostra, a contagem total do morfotipo dominante de *S. cerevisiae* (de onde foram escolhidas as leveduras submetidas aos testes de restrição do DNA mitocondrial), as contagens de UFC/mL para cada perfil de restrição e o tipo de fermentação realizado na dorna onde a amostra foi coletada.

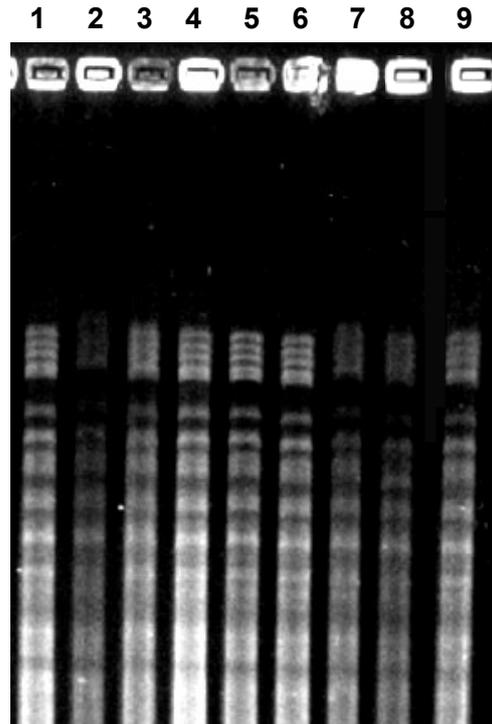
São necessários testes posteriores para determinar se as linhagens encontradas em diferentes amostras pertencem a um mesmo perfil de restrição. As linhagens encontradas nas amostras 1 e 2, diferenciadas pelo perfil de restrição do DNA mitocondrial estão representadas na figura 1.

**Tabela 4:** Correspondência entre amostra, contagem total das *S. cerevisiae* pertencentes ao morfotipo dominante na mesma, número de perfis de restrição de DNA mitocondrial encontrados para esse morfotipo, contagem de UFC/mL para cada perfil tipo de fermentação da amostra.

Amostra	CONTAGEM DE <i>S. cerevisiae</i> DOMINANTES (UFC/ML)	NÚMERO DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL	QUANTIDADE DE UFC/ML X10 <sup>5</sup> EM CADA PERFIL	TIPO DE FERMENTAÇÃO
1	1,33x10 <sup>7</sup>	Perfil 1	26,6	UFMG-A1007
		Perfil 2	53,2	
		Perfil 3	53,2	
2	1,8x10 <sup>7</sup>	Perfil 4	108,0	UFMG-A 1007
		Perfil 5	36,0	
		Perfil 6	36,0	
3	1,16x10 <sup>7</sup>	Perfil 7	46,4	Espontânea
		Perfil 8	46,4	
		Perfil 9	23,2	
4	4,6x10 <sup>6</sup>	Perfil 10	18,4	UFMG-A 1007
		Perfil 11	9,2	
		Perfil 12	18,4	
5	7,4x10 <sup>7</sup>	Perfil 13	555,0	UFMG-A 1031
		Perfil 14	185,0	
6	1,59x10 <sup>8</sup>	Perfil 15	636,0	UFMG-A 1031
		Perfil 16	954,0	
7	1,13x10 <sup>8</sup>	Perfil 17	1130,0	UFMG-A 1031
8	2,21x10 <sup>8</sup>	Perfil 18	2210,0	UFMG-A 1031
9	1,89x10 <sup>7</sup>	Perfil 19	151,2	UFMG-A 1031
		Perfil 20	37,8	

<b>10</b>	2,53x10 <sup>6</sup>	Perfil 21 Perfil 22	15,18 10,12	UFMG-A 1031
<b>Amostra</b>	<b>CONTAGEM DE <i>S. cerevisiae</i> DOMINANTES (UFC/ML)</b>	<b>NÚMERO DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL</b>	<b>QUANTIDADE DE UFC/ML X10<sup>5</sup> EM CADA PERFIL</b>	<b>TIPO DE FERMENTAÇÃO</b>
<b>11</b>	1,54x10 <sup>7</sup>	Perfil 23 Perfil 24 Perfil 25	30,8 61,6 61,6	UFMG-A 1031
<b>12</b>	1,37x10 <sup>8</sup>	Perfil 26 Perfil 27	822,0 548,0	UFMG-A 1031
<b>13</b>	3,66x10 <sup>6</sup>	Perfil 28 Perfil 29 Perfil 30	7,32 21,93 7,32	Espontânea
<b>14</b>	8,76x10 <sup>7</sup>	Perfil 31 Perfil 32 Perfil 33	350,4 175,2 350,4	Espontânea
<b>15</b>	1,6x10 <sup>7</sup>	Perfil 34	160,0	Espontânea

**Continuação da tabela 4.**



**Figura 1:** Modelo dos perfis moleculares obtidos a partir das linhagens de *S. cerevisiae* isoladas das amostras por meio da técnica de análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA - RFLP) com a enzima *Hinfl*.

Nota: As canaletas 1 a 5 mostram os perfis gerados a partir da amostra 1, onde se percebe que os isolados 1, 4 e 5 pertencem à mesma linhagem e os isolados 2 e 3 são diferentes dos demais. As canaletas 6 a 9 mostram os perfis gerados a partir da amostra 2, onde se percebe os quatro perfis diferentes presentes na amostra. Não há fotos com os perfis dos outros isolados.

### 5.3.3. Identificação das leveduras não-*Saccharomyces*

Após os testes fisiológico-morfológicos e sequenciamento, os gêneros encontrados foram *Pichia*, *Issatchenkia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Zygoascus* e *Torulaspota*.

Em relação às espécies não-*Saccharomyces* encontradas, o gênero *Pichia* esteve presente em 14 das 15 amostras. *P. membranifaciens* predominou em oito das 15 amostras (53,33% do total de amostras) e foi ausente apenas na amostra 15 (6,66% do total de amostras), oriunda da Destilaria 5, na qual a fermentação foi realizada em dorna sem revestimento inox e com fermento “caipira”. *P. guilliermondi* predominou em apenas uma das 15 amostras (6,66% do total de amostras).

O segundo gênero mais freqüente foi *Candida*, presente em cinco amostras (33,3% do total de amostras) e duas destilarias.

Isolados identificados como *Candida* sp. parecem ser pertencentes a uma nova espécie de levedura. Foram encontrados nas amostras 5, 6, 7 e 8, provenientes de fermentações conduzidas por UGMGA-1031 na Destilaria 2, localizada em Jequitibá.

As contagens populacionais das leveduras não-*Saccharomyces* variaram de  $10^1$  a  $10^5$  UFC/mL (tabela 5).

**Tabela 5:** Contagens populacionais de leveduras não-*Saccharomyces* presentes em cada amostra, por destilaria.

<i>Destilaria</i>	<i>Amostra</i>	<i>Identificação</i>	<i>Contagem populacional (UFC/mL)</i>	
1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	$\geq 1,0 \times 10^4$	
		<i>Issatchenkia orientalis</i>	$5,59 \times 10^3$	
		<i>Pichia membranifaciens</i>	$7,00 \times 10^2$	
	2	<i>P. membranifaciens</i>	$4,08 \times 10^3$	
		<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	$3,83 \times 10^3$	
		<i>I. orientalis</i>	$5,16 \times 10^2$	
	3	<i>P. membranifaciens</i>	$\geq 1,9 \times 10^4$	
		<i>K. marxianus</i>	$6,60 \times 10^1$	
	4	<i>P. membranifaciens</i>	$1,00 \times 10^2$	
		<i>Pichia guilliermondii</i>	$2,00 \times 10^1$	
	2	5	<i>P. guilliermondii</i>	$4,7 \times 10^3$
			<i>Candida</i> sp.	$4,66 \times 10^3$
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>			$3,00 \times 10^3$	
<i>I. orientalis</i>			$1,43 \times 10^3$	
<i>P. membranifaciens</i>			$5,33 \times 10^2$	
6			<i>P. membranifaciens</i>	$2,04 \times 10^4$
		<i>H. guilliermondii</i>	$7,76 \times 10^3$	
		<i>I. orientalis</i>	$4,66 \times 10^3$	
		<i>P. guilliermondii</i>	$3,15 \times 10^3$	
		<i>Candida</i> sp.	$7,33 \times 10^2$	
		<i>Pichia fermentans</i>	$1,00 \times 10^2$	
7		<i>P. guilliermondii</i>	$1,91 \times 10^4$	
	<i>P. membranifaciens</i>	$3,30 \times 10^3$		
	<i>Zygoascus hellenicus</i>	$1,60 \times 10^3$		
	<i>Candida</i> sp.	$1,40 \times 10^3$		
	<i>Hanseniaspora</i> sp.	$9,00 \times 10^2$		

	<b>8</b>	<i>P. membranifaciens</i>	$7,15 \times 10^5$
		<i>Candida</i> sp.	$2,60 \times 10^3$
		<i>P. guilliermondii</i>	$1,63 \times 10^3$
		<i>Z. hellenicus</i>	$9,66 \times 10^2$
<b>3</b>	<b>9</b>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	$\geq 1,44 \times 10^4$
		<i>P. membranifaciens</i>	$7,66 \times 10^2$
	<b>10</b>	<i>P. membranifaciens</i>	$4,00 \times 10^2$
		<i>P. fermentans</i>	$6,20 \times 10^3$
		<i>T. delbrueckii</i>	$6,55 \times 10^3$
		<i>Candida akabanensis</i>	$\geq 1,0 \times 10^4$
<b>4</b>	<b>11</b>	<i>P. membranifaciens</i>	$4,30 \times 10^1$
	<b>12</b>	<i>P. membranifaciens</i>	$\geq 3,0 \times 10^4$
<b>5</b>	<b>13</b>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	$1,0 \times 10^4$
	<b>14</b>	<i>Z. bailii</i>	$2,35 \times 10^3$
		<i>P. guilliermondii</i>	$3,00 \times 10^2$
		<i>Z. hellenicus</i>	$3,33 \times 10^1$
<b>6</b>	<b>15</b>	<i>Z. bailii</i>	$1,50 \times 10^2$
		<i>Z. fermentati</i>	$1,00 \times 10^2$
		<i>T. delbrueckii</i>	$1,00 \times 10^2$
		<i>P. membranifaciens</i>	$1,00 \times 10^2$

#### 5.3.4. Caracterização das leveduras quanto à produção de micocinas

No total foram realizados 2854 testes para verificar a produção de micocinas. Foram feitos 1310 testes com isolados que representavam 175 linhagens de *S. cerevisiae* e 1544 testes com os 82 isolados de leveduras não-*Saccharomyces*. Setenta e um isolados (34,7% do total de leveduras) apresentaram atividade micocinogênica contra as leveduras iniciadoras UFMGA-1031 ou UFMGA-1007 ou contra algum dos isolados de *S. cerevisiae* proveniente da mesma dorna. Destes 71 isolados micocinogênicos, 22 foram identificados como *S. cerevisiae*.

Na amostra 1, os isolados de *S. cerevisiae* foram sensíveis à atividade micocinogênica dos isolados de *Pichia membranifaciens* e *Issatchenkia orientalis*, sendo que estes últimos também apresentaram uma fraca atividade contra a linhagem UFMGA-1031. No entanto, todos os isolados desta amostra eram sensíveis à atividade micocinogênica da iniciadora utilizada nesta fermentação, a UFMGA-1007.

Na amostra 2, um dos isolados de *S. cerevisiae* apresentou atividade micocinogênica fraca contra a iniciadora UFMGA-1007, contra a linhagem UFMGA-1031 e contra outros *S. cerevisiae* isolados a partir da mesma amostra. Os isolados de *P. membranifaciens* apresentaram uma atividade fraca contra a levedura iniciadora. As leveduras não-*Saccharomyces* apresentaram atividade contra a linhagem UFMGA-1031.

Na amostra 3, na qual a fermentação foi espontânea, desenvolvida com fermento “caipira”, isolados de *Kluyveromyces marxianus* e *P. membranifaciens* apresentaram fraca atividade contra as linhagens de *S. cerevisiae* selvagens presentes na dorna.

Na amostra 4, na qual a fermentação foi conduzida por UFMGA-1007, nenhum isolado apresentou atividade contra a iniciadora. Isolados de *Pichia guilliermondii* apresentaram atividade micocinogênica fraca contra *S. cerevisiae* isolados a partir da mesma amostra.

Na amostra 5, isolados de *S. cerevisiae* apresentaram atividade contra a iniciadora UFMGA-1031, utilizada para conduzir a fermentação, além de fraca atividade contra UFMGA-1007. Isolados de *Candida* sp. e *I. orientalis* apresentaram fraca atividade contra

UFMGA-1007. Isolados de *I. orientalis* e *Hanseniaspora guilliermondii* apresentaram, respectivamente, atividade fraca e forte contra a iniciadora UFMGA-1031.

Na amostra 6, dois isolados de *S. cerevisiae* e de *Candida* sp. apresentaram fraca atividade micocinogênica contra a levedura utilizada para conduzir a fermentação, a linhagem UFMGA-1031. Isolados de *P. membranifaciens*, *P. guilliermondii*, *P. fermentans*, *I. orientalis* apresentaram atividade contra *S. cerevisiae* isolados a partir da mesma amostra.

Na amostra 7, coletada a partir de uma fermentação conduzida por UFMGA-1031, isolados de *P. guilliermondii* apresentaram atividade contra *S. cerevisiae* isolados a partir desta amostra.

Na amostra 8, também oriunda de uma fermentação conduzida por UFMGA-1031, esta linhagem foi sensível às micocinas produzidas por *Candida* sp. e por *P. membranifaciens*. *S. cerevisiae* isolados desta amostra foram sensíveis às micocinas produzidas por isolados de *Zygoascus hellenicus* e de *P. membranifaciens*.

Na amostra 9, isolados de *S. cerevisiae* selvagens apresentaram fraca atividade micocinogênica contra a iniciadora utilizada UFMGA-1031.

Na amostra 10, também conduzida por UFMGA-1031, esta iniciadora foi sensível às micocinas produzidas por isolados de *P. fermentans* e de *Candida akabanensis*. Um dos isolados de *S. cerevisiae* apresentou atividade contra outros isolados da mesma espécie provenientes desta amostra.

Nas amostras 11 e 12 a iniciadora utilizada foi UFMGA-1031. Isolados de *P. membranifaciens* apresentaram atividade micocinogênica contra a iniciadora UFMGA-1031 na amostra 11 e contra *S. cerevisiae* isolados da amostra 12.

Na amostra 13, realizada com fermento “caipira”, isolados de *S. cerevisiae* apresentaram atividade micocinogênica entre si, contra UFMGA-1031 e contra UFMGA-1007. Isolados de *Zygosaccharomyces bailli* produziram micotoxinas contra estes *S. cerevisiae* selvagens.

Na amostra 14, também realizada sem iniciadoras, isolados de *P. guilliermondii* apresentaram fraca atividade contra *S. cerevisiae* selvagens.

Na amostra 15, realizada com fermento “caipira”, os isolados de *P. membranifaciens* também apresentaram atividade micocinogênica contra *S. cerevisiae* isolados desta fermentação.

Nas duas amostras em que a fermentação foi conduzida pela iniciadora UFMGA-1007, os problemas encontrados quanto à produção de micocinas foram: as espécies *P. membranifaciens*, *Issatchenkia orientalis* e *P. guilliermondii* apresentaram atividade micocinogênica contra a iniciadora, entre os *S. cerevisiae* selvagens houve produção de micocinas e um deles produziu micocinas contra a iniciadora.

Nas oito amostras em que a fermentação foi conduzida pela linhagem UFMGA-1031, foi verificada a atividade micocinogênica entre *S. cerevisiae* selvagens, destes contra a iniciadora e das leveduras não-*Saccharomyces* contra a iniciadora. Esta iniciadora foi sensível às micocinas produzidas pelos isolados de *S. cerevisiae* selvagens em três (37,5%) amostras. Em cinco (62,5%) amostras as leveduras não-*Saccharomyces* identificadas como *P. membranifaciens*, *P. fermentans*, *Candida* sp., *Candida akabanensis*, *I. orientalis*, *Hanseniaspora guilliermondii* produziram micocinas contra a iniciadora. As leveduras das espécies *P. membranifaciens*, *P. guilliermondii*, *I. orientalis*, além de *Pichia fermentans* e *Zygoascus hellenicus* apresentaram atividade micocinogênica contra os *S. cerevisiae* selvagens em quatro amostras. As linhagens de *S. cerevisiae* também produziram micocinas entre si em uma amostra.

Nas quatro amostras coletadas a partir de fermentações espontâneas, o maior problema encontrado foi quanto à produção de micocinas pelas leveduras não-*Saccharomyces* contra os *S. cerevisiae* selvagens isolados destas fermentações. As leveduras identificadas como *P. membranifaciens*, *P. guilliermondii*, *Zygosaccharomyces bailli* e *Kluyveromyces marxianus* apresentaram atividade micocinogênica contra *S. cerevisiae* presentes na dorna de fermentação.

#### 5.4. Análises estatísticas

O primeiro teste estatístico realizado foi Análise de regressão multivariada. O modelo de regressão múltipla encontrou a seguinte equação, relacionando as demais variáveis com a acidez:

$$\text{Acidez total} = 1,379 - (0,0981 \times \text{Etanol}) - (0,0196 \times \text{Açúcares}) + (0,000403 \times \text{Glicerol}) + (0,000764 \times \text{Saccharomyces}) + (0,00212 \times \text{Não-Saccharomyces}) - (0,00178 \times \text{Bactérias Lácticas})$$

Nesse modelo, a variável acidez deveria ser predita a partir de uma combinação linear das variáveis independentes. As variáveis que se mostraram mais significantes para a determinação da acidez, de acordo com esse modelo, foram a Concentração de açúcares, de Glicerol e a contagem total de bactérias lácticas. Ainda assim, o valor  $R_{sq} = 0,483$  indica que os parâmetros testados nesse trabalho possibilitam no máximo uma predição da acidez em 48,30 % das amostras. Esse valor não foi aumentado quando uma nova equação foi produzida com apenas as variáveis mais relacionadas. Ao contrário do esperado, a qualidade da predição decaiu 5,7%, apresentando um valor de  $R_{sq} = 0,426$ . Essa comparação permitiria afirmar que todas as variáveis testadas nesse trabalho são importantes para a predição da acidez, mas isso deveria ser verificado em testes de regressão univariada.

Nos testes de regressões univariadas realizados entre todas as variáveis deste trabalho, os valores de  $R^2$  foram muito baixos, indo desde 3,4 (relação entre acidez total e concentração de etanol) até 18,3 (relação entre acidez total e contagem de leveduras não-*Saccharomyces*). A análise comprovou que a concentração de glicerol e a acidez total são independentes entre si, uma vez que foi encontrado  $R^2(\%)$  igual a zero para a equação gerada durante a análise. As contagens de leveduras não-*Saccharomyces* e de bactérias lácticas não foram relacionadas diretamente ao aumento da acidez. A contagem total de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foi a melhor variável determinada com a análise de

regressão univariada, mas ainda assim o seu valor R<sup>2</sup> foi de 39,6% ao ser gerada a equação:

$$\text{Acidez total} = 0,6792 + 0,002403 \text{ Saccharomyces cerevisiae}$$

Assim, não foi verificado que qualquer uma das variáveis testadas nesse trabalho foi importante para a predição da acidez, pois nenhuma apresentou relevância individual no modelo construído durante os testes de regressão univariada. Ou seja, não houve correspondência entre nenhuma variável e a acidez.

## 6. Discussão

Não há uma legislação que determine os limites para os parâmetros químicos em fermentações para a produção de cachaça. A acidez é o único parâmetro sobre o qual se dispõe de alguma informação, e foi a referência durante todas as análises estatísticas realizadas. Informalmente considera-se que a acidez do mosto fermentado deve ser inferior a 0,6 g/100 mL, pois na maioria das vezes em que esse limite é ultrapassado, são produzidas cachaças que ultrapassam o limite de 0,15g/100 mL de ácido acético exigido pela legislação.

Ao contrário do esperado, as contagens totais de microrganismos, principalmente as bactérias lácticas, não se mostraram tão diferentes daquelas citadas em outros trabalhos para fermentações não contaminadas para a produção de cachaça em diferentes localidades do estado de Minas Gerais (SCHWAN et al., 2001; SILVA, 2007; GOMES et al, 2009). GALLO (1992) e YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) relacionam a presença de bactérias lácticas às fermentações contaminadas para a produção de etanol em escala industrial. Segundo os autores, a presença destes microrganismos na cana antes do início da produção pode ser relacionada à introdução de grandes populações de bactérias capazes de produzir grandes quantidades de diferentes ácidos orgânicos. As bactérias lácticas são consideradas contaminantes porque utilizam os açúcares do meio e produzem ácido láctico e acético, prejudicando o aproveitamento de nutrientes necessários ao crescimento e produção de etanol pelas leveduras (ROSA et al., 2009). Em uma pesquisa envolvendo a análise das sequências do gene 16S rDNA da comunidade bacteriana contaminante de fermentos para a produção de cachaça, CARVALHO-NETTO e colaboradores (2008) verificaram que as populações variaram entre as amostras coletadas no primeiro, nono e 30º dias de fermentação. Além disso, foram descobertas espécies de bactérias ainda não descritas, bem como gêneros que ainda não haviam sido relacionados a fermentos, demonstrando que a comunidade bacteriana apresentou maior diversidade do que se estimava anteriormente, não se restringindo às bactérias lácticas (CARVALHO-NETTO et al., 2008). Esse fato possivelmente acarreta alterações no equilíbrio do processo

fermentativo. Trabalhos futuros são necessários para investigar estas alterações mais detalhadamente, e verificar se outros gêneros de bactérias estão presentes em mostos fermentados contaminados. GOMES (2006) verificou que nenhum dos isolados bacterianos dominantes na produção de cachaça foi capaz de inibir o crescimento das leveduras iniciadoras, apesar de apresentarem efeito bacteriostático sobre outros isolados bacterianos. A autora não determinou se a substância inibidora era uma bacteriocina. GUEDES NETO (2004) afirma que os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias podem provocar estresse nas leveduras, prejudicando o crescimento e a produtividade em etanol das mesmas.

Provavelmente, o aumento da acidez durante as contaminações das fermentações de caldo de cana deve-se não só ao tamanho da comunidade bacteriana, mas também à diversidade, capacidade de produção de ácido lático e acético e de possíveis interferências sobre o crescimento das leveduras presentes na dorna. Sabe-se que não só as bactérias, mas também leveduras são capazes de produzir ácidos durante as fermentações (BASSO et al., 1997). Desta forma, é possível supor que o fator determinante da alteração dos parâmetros químicos nas amostras do presente trabalho relaciona-se com características das linhagens de leveduras e/ou bactérias presentes nas contaminações, principalmente relacionadas à produção de ácidos.

Estes dados são justificados pelos relatos de alguns produtores no momento das coletas das amostras analisadas neste trabalho. Foi relatada a utilização de cana que estava cortada há mais de 24 h ou, em alguns casos, com até sete dias de corte devido à escassez de matéria prima. Em 2006, ano anterior à coleta das amostras, os índices pluviométricos elevados no estado de Minas Gerais teriam acarretado a redução da safra em 2007, o que pode ter trazido à linha de produção a cana de açúcar coletada de forma não ideal para a produção de cachaça. Isso pode ter influenciado negativamente a fermentação com a introdução de espécies indesejáveis de microrganismos.

De BARROS-LOPES e colaboradores (1996) afirmam que a microbiota transitória tem uma participação importante nas fermentações de vinho, apesar de haver dominância das culturas iniciadoras durante o processo porque estas são

adicionadas em altas concentrações nas dornas. As baixas contagens de leveduras não-*Saccharomyces* encontradas neste trabalho podem ser devidas à realização de coletas na fase final da fermentação, quando geralmente predomina *S. cerevisiae*. As leveduras não-*Saccharomyces* geralmente não se tornam dominantes, apesar de persistirem pequenas populações até o final da fermentação, pois não resistem às crescentes condições de estresse presentes nas dornas, principalmente as altas concentrações de etanol (SCHWAN et al. 2001; PATARO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2007; GOMES et al., 2007).

Segundo JOLLY e colaboradores (2006), a comunidade de leveduras não-*Saccharomyces* depende do local de origem e do estágio da fabricação nos quais as amostras são coletadas. A utilização do meio de cultura para o isolamento também influencia na seleção de populações, já que algumas leveduras não-*Saccharomyces* podem não ter a habilidade de crescer em meio Lisina, e desta maneira não serem detectadas pelo isolamento. De acordo com FLEET (2003), na produção de vinhos, os números de não-*Saccharomyces* variam de  $10$  a  $10^3$  ufc/g em uvas não maduras, mas chegam a  $10^4 - 10^6$  ufc/g à medida que as uvas amadurecem. O crescimento populacional é devido à difusão de açúcares pela superfície da uva durante o amadurecimento, provendo nutrientes às leveduras. O amadurecimento das uvas e/ou a deterioração podem ser responsáveis por determinar os números populacionais.

Os gêneros de leveduras encontrados neste trabalho são distribuídos mundialmente, geralmente capazes de fermentar açúcares, sendo comumente isolados a partir de equipamentos de indústrias de bebidas, materiais, frutas e sucos, alimentos e bebidas fermentados ou deteriorados (KURTZMAN & FELL, 1998). Tanto as contagens populacionais de leveduras não-*Saccharomyces* quanto as espécies identificadas nas amostras contaminadas estão de acordo com os trabalhos sobre fermentações não contaminadas estudadas durante a produção de cachaça (GOMES et al, 2009; MARINI et al., 2009, Silva et al., 2009). Somente a espécie *Zygoascus hellenicus* ainda não havia sido encontrada em fermentações para a produção de cachaça, e a espécie *Candida akabanensis* foi descrita em apenas um trabalho (MARINI et al., 2009). Essas espécies são relacionadas a fezes de insetos que habitam

troncos de videiras, sucos de frutas congelados, mostos, fermentações ácidas orgânicas (NAKASE et al., 1994; KURTZMAN & FELL, 1998). O gênero *Pichia* tem sido relatado como contaminante de fermentações para a produção de vinhos, por produzir filmes na superfície do mosto, além de substâncias como ácido acético, acetato de etila e acetaldeído, além de resistir a elevados teores de acidez (JOLLY et al., 2006). Além disso, um isolado identificado como pertencente ao gênero *Candida* parece constituir uma nova espécie de levedura e outros testes serão realizados para confirmar este resultado.

A existência de baixas contagens de leveduras não-*Saccharomyces* associadas a maiores valores de acidez em vinhos contaminados pode indicar que as leveduras presentes em contaminações da fermentação para a produção de cachaça apresentam um perfil fisiológico semelhante ao que é encontrado em fermentações não contaminadas. Sabe-se que a variação entre as contagens totais de cada amostra pode ser decorrente da propagação inicial do fermento utilizado (POVHE JEMEC et al., 2001) e que leveduras não-*Saccharomyces* podem afetar a fermentação diretamente – por meio da produção de substâncias que potencializam o aroma, ou indiretamente – modulando o crescimento ou o metabolismo da população dominante de *S. cerevisiae* (MILLS et al., 2002). Portanto, caso as condições de propagação do fermento tenham sido favoráveis às leveduras capazes de estimular o crescimento de linhagens fermentativas, seria esperado que as populações das mesmas reduzissem ao final do processo. Também é aceitável considerar que as linhagens favorecidas nessa relação ecológica apresentassem populações superiores em estágios finais. No entanto, para que essas inferências sejam verificadas, são necessários testes sobre as relações de antagonismo entre leveduras e a identificação das leveduras presentes no caldo de cana que foi utilizado para a fermentação.

Um dos testes de antagonismo constitui a verificação da produção de micocinas entre as leveduras isoladas. No presente trabalho, a variedade de linhagens de *S. cerevisiae* presentes nas amostras, associada à atividade micocinogênica das mesmas, mostra que as leveduras dominantes podem ser responsáveis por parte do desequilíbrio ocorrido durante as contaminações. A atividade micocinogênica de

gêneros não-*Saccharomyces* pode ter afetado a população de *S. cerevisiae* selvagens, e assim os nutrientes que seriam destinados à fermentação podem ter sido utilizados para a produção de outros compostos químicos, sendo que as espécies encontradas estão de acordo com a literatura (CORRÊA, 1999). De acordo com a produção de micocinas, a iniciadora UFMGA-1007 pode ter auxiliado no controle da contaminação, devido à sua atividade micocinogênica contra *S. cerevisiae* selvagens e sensibilidade às micocinas produzidas por apenas uma linhagem selvagem. Uma coleta de amostras da água e do caldo de cana utilizados na destilaria poderia auxiliar a identificação das origens destas leveduras micocinogênicas.

Apesar de serem adaptadas à fermentação para a produção de cachaça (MORAIS *et al.*, 1997; PATARO *et al.*, 2000), esperava-se que nas fermentações interrompidas, as linhagens de *S. cerevisiae* fossem encontradas em menores contagens, ou seja, poderiam ter sua população influenciada pela utilização de cana de pior qualidade por alguns produtores. Na produção de vinhos, existem relatos de que o uso de uvas danificadas durante as safras chuvosas e úmidas modula a microbiota, favorecendo a ocorrência de *Hanseniaspora uvarum* e *Metschnikowia pulcherrima* (FLEET, 2003). VALERO e colaboradores (2007) identificaram, durante três anos consecutivos, as populações de leveduras envolvidas em fermentações espontâneas na França e verificaram que a variação no amadurecimento das uvas favoreceu a prevalência e dominância de linhagens fermentativas. Os autores também concluíram que as linhagens iniciadoras comerciais de *S. cerevisiae* não foram isoladas a partir de substratos diferentes nos vinhedos, mesmo após décadas de uso em vinificações, comprovando sua dificuldade de competição e sobrevivência no ambiente. Contudo, as populações de leveduras *Saccharomyces* encontradas no presente trabalho foram prevalentes na fermentação e resistentes às condições de estresse, de forma semelhante àquela encontrada em fermentações não contaminadas.

Das cinco amostras com maiores contagens de *S. cerevisiae* (grupo B, figura 9), quatro encontram-se com valores de acidez inferiores ou próximas ao limite de 0,6 g/100 mL. Nesse grupo também se encontram dois dos quatro menores valores para a acidez.

Porém, na análise de regressão múltipla univariada, contagens de *S. cerevisiae* foram maiores em amostras mais ácidas, ou seja, houve uma relação positiva entre as variáveis. Esse resultado permite inferir que as linhagens de *S. cerevisiae* podem ser as responsáveis pela produção de ácidos e de etanol em altas concentrações, o que é justificável pela sua dominância na dorna e pelas características fisiológicas que comumente apresentam.

A presença de valores elevados para acidez permite inferir que nos mostos fermentados analisados, mesmo que haja interrupção da fermentação alcoólica, ainda poderia acontecer algum tipo de atividade microbiana. As maiores dosagens de acidez estão de acordo com o esperado, pois durante a fermentação, ocorre liberação de compostos secundários do metabolismo, como os ácidos orgânicos (BASSO, et al., 1997). Adicionalmente, elevadas dosagens de açúcares totais são decorrentes provavelmente da estagnação da fermentação, o que pode indicar que os açúcares foram consumidos por linhagens fermentativas com diferentes perfis que poderiam estar conduzindo o processo fermentativo e que poderiam estar competindo entre si. Conclui-se que a estagnação apresentada por algumas amostras coletadas poderia ter sido causada pela ação de microrganismos adaptados às condições de fermentação, com rápida taxa de crescimento, antes que houvesse aumento da concentração de etanol ou grande competição pelos nutrientes.

De acordo com RIBÉREAU-GAYON e colaboradores (2006), quanto maior a quantidade de açúcar do mosto, mais ácido acético e glicerol as leveduras produzem durante as fermentações. Isso ocorre porque em resposta à pressão osmótica do meio, *S. cerevisiae* aumenta o acúmulo intracelular de glicerol (BLOMBERG & ALDER, 1992), devido a uma cascata de transdução de sinais que acarreta o aumento da expressão dos genes envolvidos na produção de glicerol e também de acetato (ATTFIELD et al., 2001). E indícios disso foram verificados por meio da dosagem de glicerol encontrada em altas concentrações nas amostras de mosto fermentado.

A diversidade molecular encontrada entre linhagens de *S. cerevisiae* pode estar relacionada com as diferentes condições de estresse presentes no ecossistema de produção de cachaça (GUERRA et al., 2001). Estudando a fermentação espontânea

em uma destilaria no estado de Minas Gerais, foram encontrados 12 diferentes perfis de restrição do DNA mitocondrial para *S. cerevisiae*, sendo que as populações flutuaram durante a safra e entre as dornas da destilaria, atestando a grande variedade de linhagens envolvidas na fermentação (ARAÚJO et al., 2007). A caracterização das linhagens dominantes das pode auxiliar na compreensão das contaminações estudadas.

## 7. Conclusões

Neste trabalho verificou-se que a contaminação de fermentações para a produção de cachaça pode ser avaliada por meio do monitoramento da atividade fermentativa e dosagem dos teores de açúcares, comumente realizados pelos produtores. Adicionalmente, confirmou-se a validade da dosagem da acidez total titulável no monitoramento da contaminação durante as fermentações. As médias encontradas foram superiores ao valor de 0,6 g/100 mL, que informalmente é utilizado para avaliar a contaminação do fermento. Nenhuma amostra apresentou valores próximos a zero para a dosagem de açúcares. Estes dois parâmetros podem ser utilizados para monitorar a fermentação para a produção da cachaça de alambique.

Contagens totais de bactérias lácticas, *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces* parecem não constituir parâmetros a serem utilizados nas avaliações da contaminação, pois se assemelham àquelas encontradas em fermentações não contaminadas.

*Pichia membranifaciens* foi a levedura não-*Saccharomyces* predominante na maioria das contaminações estudadas. Outras espécies encontradas foram *P. fermentans*, *P. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Issatchenkia orientalis*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Z. bailii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Zygoascus hellenicus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida akabanensis*.

As médias de linhagens de *S. cerevisiae* encontradas por dorna foram menores para fermentações espontâneas, seguidas pelas conduzidas pela levedura UFMG-A 1031, e maiores naquelas conduzidas pela levedura UFMG-A 1007. Isso mostra que linhagens selvagens apresentam potencial para substituir as leveduras selecionadas inoculadas nas dornas de fermentação.

Do total de leveduras, 34,7% apresentaram atividade micocinogênica contra leveduras iniciadoras ou isolados de *S. cerevisiae* dominantes na dorna e, provavelmente, podem ter influenciado o processo de contaminação ou estagnação da

fermentação. A produção de micocinas pelas espécies não-*Saccharomyces* contra os isolados de *S. cerevisiae* foi muito expressiva em fermentações espontâneas.

Também pode-se concluir que a levedura iniciadora não garante a não contaminação do mosto, mas caso apresente atividade micocinogênica, a linhagem iniciadora pode inibir tanto o desenvolvimento de populações de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens quanto de não-*Saccharomyces* tipicamente encontradas em fermentações contaminadas.

## 8. Referências Bibliográficas

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *Acidez titulável total, volátil total e fixa* - NBR 13856. São Paulo, 1997a.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *Determinação do teor alcoólico* - NBR 13920. São Paulo, 1997b.
- ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, I.; CHARPENTIER, C. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microb Lett.* v. 124, p. 17–22, 1994.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, D.; BASSO, L. The effects of some variables on fuel ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast in the production and spoilage of food and beverages*. Nineteenth International Specialized Symposium on Yeast. Portugal, p. 117, 1998.
- AMPAQ (Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade). [http://www.ampaq.com.br/arquivos/etapas\\_para\\_producao.pdf](http://www.ampaq.com.br/arquivos/etapas_para_producao.pdf), 2007.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, V.A *Biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blucher. V. 4, 523 p., 2001.
- ARAÚJO, R.A.C.; GOMES, F.C.O.; MOREIRA, E.S.A; CISALPINO, P.S.; ROSA, C.A. Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* populations by mtDNA restriction analysis and other molecular typing methods during spontaneous fermentation for production of the artisanal cachaça. *Braz. J. Microbiol.*, v. 38, p. 217-223, 2007.
- ATTFIELD, P.V.; CHOI, H.Y.; VEAL, D.A.; BELL, P.J. Heterogeneity of stress gene expression and stress resistance among individual cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* v. 40, p. 1000–1008. 2001.
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. *Rev. Microbiol.*, v. 28, p. 77-82, 1997.

- BENTO DE LIMA, I.; SILVA, L.H.A.; ROCHA, L.E.V.; RIOS, K.M.M. Os impactos da produção da cachaça, com ênfase na exportação, como fonte alternativa de renda para os produtores rurais mineiros. *XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Londrina, PR., 2007.*
- BERNARDI, T.L.; PEREIRA, G.V.M.; CARDOSO, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). *World J Microbiol Biotechnol.*, v. 43, p. 2705-2712, 2008.
- BEVAN, E.A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. *Int. Congr. Genet.* v. 1, p. 203, 1963.
- BLOMBERG, A.; ALDER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.*, v. 33, p. 145–212, 1992.
- BRASIL. Instrução Normativa n.13, de 29/06/2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. *Diário Oficial*. Brasília. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n°. 4.072 de 4 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas *Diário Oficial da União*, Brasília. p. 9134-9136. 2002,
- BRYAN-JONES, G. Lactic acid bacteria in distillery fermentations. In: CARR J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. (Ed.) *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Londres: Academic Press Ltd. p. 165-176, 1975.
- CARDOSO, M.G. (Ed.) *Produção de cachaça de cana-de-açúcar*. Lavras: UFLA, p. 101-135, 2006.
- CARVALHO-NETTO, O.V.; ROSA, D.D.; CAMARGO, L.E.A. Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16S rDNA gene sequencing. *Sci. Agric.* v. 65, n° 5, p. 508-515, 2008.
- CIANI, M.; FATICHENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 67, p. 3058-3063, 2001.

- CLETO, F.V.G. Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da cachaça de cana. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Dissertação de Mestrado em Agronomia. 109 p., 1997.
- COOPERSUCAR. Manual de controle microbiológico da usina de açúcar e álcool. *Cadernos Copersucas - Série Industrial*. Piracicaba - SP, v. 5, 1983.
- CORRÊA, S.R. Microhabitats ocupados por *Saccharomyces cerevisiae* durante períodos de entressafra e produção em três destilarias de aguardente artesanal. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, *Dissertação de Mestrado em Microbiologia*. 74 p., 1999.
- DATO, M.C.V.; JÚNIOR, J.M.P.; MUNON, M.J.R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaça". *Braz. J. Microbiol.* v. 36, p. 70-74, 2005.
- DE BARROS-LOPES, M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. PCR Differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 4514-4520, 1996.
- DE BARROS-LOPES, M.; SODEN, A.; MARTENS, A. L.; HENSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeast using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 48, p. 279-286, 1998.
- ESTANISLAU, M.L.L.; CANÇADO JÚNIOR, F.L.; PAIVA, B.M. Mercado atual e potencial da cachaça, *Inf. Agrop.*, v. 23, p. 19-24, 2002.
- ESTEVE-ZARZOSO, B.; PERIS-TÓRAN, M.J.; GARCI-MAIQUEZ, E.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of Sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 2056-2061, 2001.
- FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. *Food Microbiol.* v. 86, p.11-22, 2003.
- FLEET, G.H. & HEARD, G.M. Yeasts: Growth during fermentation. In: FLEET, G.H. *Wine Microbiology Biotechnology*, Harwood Academic Publ. p. 27-54, 1993.
- FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Appl. Environ.*

- Microbiol*, v. 48, p. 1034-1038, 1985.
- GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *STAB*, p. 30-34, 1992.
- GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. *STAB (Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil)*. p. 35-37, 1991.
- GOLUBEV, W. I. Mycocins (killer toxins). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeast: a taxonomic study*. 4ª ed. Amsterdam: Elsevier Science B. 1035 p., 1998.
- GOLUBEV, W. I. Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds). *Biodiversity and Ecophysiology of yeasts*. 1ª ed. Heidelberg Springer. p. 197-219, 2006.
- GOMES, F.C.O. Estudo comparativo de duas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadoras da fermentação para produção de cachaça artesanal. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, *Dissertação de Mestrado em Microbiologia*. 84 p., 2002.
- GOMES, F.C.O. Produção da cachaça artesanal utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e por fermentação espontânea, com a caracterização química e sensorial da bebida e das bactérias do ácido láctico associadas ao processo. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, *Tese de Doutorado em Microbiologia*. 134 p., 2006.
- GOMES, F.C.O.; BADOTTI, F.; SILVA, P.A.B.; CAMPOS, C.R.A.; SALES, A.C.; SCHWAN, R.F.; ROSA, C.A. Produção de cachaça de alambique utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Inf. Agrop.*, p. 7-13, 2009.
- GOMES, F.C.O; SILVA, C.L.C.; MARINI, M.M.; OLIVEIRA, E.S.O.; ROSA, C.A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* v. 103, p. 2438-2447, 2007.
- GONZALEZ, S.S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J. Appl. Microbiol.* v. 102, p. 1018-1025, 2006.

- GUEDES NETO, L.G. Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp. E de bactérias ácido-lácticas e de sua atividade antagonista in vitro. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Dissertação de Mestrado, 93 p., 2004.
- GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity de *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 33, p. 106-111, 2001.
- HEARD, G. & FLEET, G.H. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 60, p. 477-481, 1986.
- HIERRO, N.; GONZÁLES, A.; MAS, A & GUILLAMÓN, J.M. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast population during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res.*, v. 20, p. 1-10, 2005.
- INMETRO (Instituto nacional de metrologia). Normalização e qualidade industrial - Portaria nº 126, de 24 de junho de 2005. Regulamento de avaliação da conformidade da cachaça. <http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC000955.pdf>. 2005.
- JACOBS, C.J.; FOVRIE, I.; VAN VUUREN, J.J. Occurrence and detection of killer yeasts on chenin blanc grapes skins. *J. Enol. Vitic.*, v. 29, p. 28-31, 1988.
- JOLLY, N.P.; AUGUSTYN, O.P.H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, v. 27, nº 1, p. 15-39, 2006.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeast: a taxonomic study*. 4º ed. Amsterdam: Elsevier Science B. v. 1035 p., 1998.
- KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.*, v. 73, nº 4, p. 331- 371, 1998.
- LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S.F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can. J. Microbiol.* v. 45, p. 172-177, 1999.

- LEHTONNEN, M.; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOT, J. R. (ed.). *Flavour of distilled beverages: origin and development*. Verlag Chemie international. p. 64-78, 1983.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia - Biotechnologia na produção de alimentos*. São Paulo. Edgard Blücher. Cap 5: Cachaças. v. 4, p. 145-207, 2001.
- LONGO, E.; VELAZQUEZ, J.B.; SIERO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 8, p. 539-541, 1992.
- LONVAUD-FUNEL, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 76, n° 1-4, p. 317-331, 1999.
- LOPES, M.L.; AMORIM, L.C.; GODOY, A.; OLIVEIRA, A.J.; CHERUBIN, R.; BASSO, L.C. Interaction between yeast and acetic acid bacteria in industrial fermentation for ethanol production: a case study. In: *Yeast science and biotechnology - The quest for sustainable development*. Eleventh International Congress on Yeast. Rio de Janeiro, p. 182, 2004.
- LOWES, K.F.; SHEARMAN, C.A.; PAYNE, J.; MACKENZIE, D.; ARCHER, D. B.; MERRY, R.J.; GASSON, M.J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n° 3, p. 1066-1076, 2000.
- MAIA, A.B.R.A.; CAMPELLO, E.AP. *Tecnologia de cachaça de Alambique*. Belo Horizonte: SEBRAE/ Sindbebedas, 129 p., 2006.
- MARINI, M.M.; GOMES, F.C.O.; SILVA, C.L.C.; CADETE, R.M.; BADOTTI, F. OLIVEIRA, E.S.; CARDOSO, C.R.; ROSA, C.A. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 25, p. 235-242, 2009..
- MARTINI, A.; CIANI, M.; SCORZETTI, G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* v. 47. p. 435-440, 1996.

- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILLS, D.A.; JOHANNSEN, E.A.; COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, p. 4884-4893, 2002.
- 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 fermentation for Brazilian sugar-cane "aguardente" production. *World J. Microbiol. Biotech.* v. 13, p. 241-243, 1997.
- MORRISSEY, W.F.; DAVENPORT, B.; QUEROL, A.; DOBSON, A.D.W. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* v. 97, n° 3, p. 647-655, 2004.
- NAKASE, T.; SUZUKI, M.; TAKASHIMA, M.; ROSADI, D.; HERMOSILLO, A.M.; KOMAGATA, K. *Candida akabanensis*, a new species of yeast isolated from insect frass in bark of a grape-vine. *Microbiol. Cult. Collect.*, v. 10, p. 35-43, 1994.
- NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63 n° 11, p. 4158-4163, 1997.
- OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A; SERRA, G.E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* v. 21, p. 1569-1576, 2005.
- PALLMANN, L.C.; BROWN, J.A.; OLINEKA, T.L.; COCOLIN, L.; MILLS, D.A.; BISSON, L. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *Am.J. Enol. Vitic.* v. 52, n. 3, p. 198-203, 2001.
- PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Inf. Agrop.* v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002a.
- PATARO, C.; GUERRA, J.B.; GOMES, F.C.O.; NEVES, M.J.; PIMENTEL, P.F.; ROSA, C.A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast isolated from 24 fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian

- cachaça. *Braz. J. Microbiol.* v. 33, p. 202-208, 2002b.
- PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* v. 88, p. 1-9, 2000.
- PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an cachaça distillery. *Rev. Microbiol.* v. 29, p. 69-73, 1998.
- PBDAC. PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA. 2007.  
<http://www.cachacadobrasil.com.br>
- PEREIRA, J.A.M.; ROSA, C.A.; FARIA, J.B. *Cachaça de Alambique*. Brasília: LK editora & comunicações. v. 8, 179 p., 2006.
- PLESSIS, H.W.; DICKS, L.M.T.; PRETORIUS, L.S.; LAMBRECHTS, M.G.; TOIT, M. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbiol.* v. 91, p.19-29, 2004.
- POVHE JEMEC, K.P.; CADEZ, N.; ZAGORC, T.; BUBIC, V.; ZUPEC, A.; RASPOR, P. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiol.* v. 18, p. 247–259, 2001.
- PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* v. 16, p. 675-729, 2000.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 58, p. 2948-2953, 1992.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int J Food Microbiol.* v. 21, p. 315-323, 1994.
- RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *The Handbook of Enology: Microbiology of Wine*. John Wiley & Sons, LTD ED., v. 1, 2° ed., 2006.

- ROJAS, V.; GIL, J.V.; PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate Ester production by *non-Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol. Int.* v. 70, p. 283-289, 2001.
- ROMANO, P.; CARUSO, M.; CAPECE, A; LIPANI, G.; PARRAGGIO, M.; FLORE, C. Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape musts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 19, p. 311-315, 2003.
- ROSA, C.A.; SOARES, A.M.; FARIA, J.B. Cachaça production. In: INGLEDEW, W.M. (Org.). The alcohol textbook. Nottingham: Nottingham University Press, 5° ED., 2009.
- ROSINI, G. The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.* v. 29, p. 1462-1464, 1983
- SANZ, A.; MARTÍN, R.; MAYORAL, M.B.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; LACARRA, T.G. Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packer ham. *Meat Sci.*, v. 71, p. 230–237, 2005.
- SCHWAN, R.F.; CARVALHO, F.P.; DIAS, D.R; CASTRO, H.A. Fermentação. In: CARDOSO, M.G. (Ed.) *Produção de cachaça de cana-de-açúcar*. Lavras: UFLA, p. 101-135, 2006.
- SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA JR., J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek.* v. 79, p. 89-96, 2001.
- SEBRAE (Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas). Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais. 259 p., 2001.
- SHARPE, M.E. Identification of the lactic acid bacteria. In: SKINNER, F.A.; LOVELOCK, D.W. (Eds.) *Identification Methods for Microbiologists*. Academic Press. p. 233-259, 1979.
- SILVA, C.L.C. Utilização de linhagens floculantes e linhagens não-produtoras de H<sub>2</sub>S de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadoras do processo fermentativo na produção de cachaça de alambique. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, *Tese de Doutorado em Microbiologia*. 123 p., 2007.

- SILVA, C.L.C.; VIANNA, C.R.; CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; GOMES, F.C.O.; OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. *Int. J. Food Microbiol.* (in press), 2009.
- SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Brasília, EMBRAPA, 159 p. 1995.
- SORATTO, A.N.; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n° 4, p. 681-687, 2007.
- 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.* v. 58, n° 3, p. 990–997, 1992.
- TORIJA, M.J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* v. 80, p. 47-53, 2003.
- VALERO, E.; CAMBON, B.; SCHULLER, D.; CASAL, M.; DEQUIN S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* v. 7, p. 317–329, 2007.
- VAN VUUREN, H.J.J.; JACOBS, C.J. Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* v. 43, p. 119–128, 1992.
- VIANNA, C.R.; SILVA, C.L.C.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie van Leeuwenhoek.* v. 93, p. 205-217, 2008.
- YARROW, D. Methods for isolation and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. p. 77-100, 1998.
- YOKOYA, F. & OLLVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Rev. Microbiol.* v. 22, n° 1, p. 12-16, 1991.
- YOUNG, T.W. *Killer yeasts*. p. 131-164, 1987. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeast: a taxonomic study*. 4° ed. Amsterdam: Elsevier Science B. v. 1035 p., 1998.