

Soraya Rosely Corrêa

**MICROBIOTAS OCUPADAS POR *Saccharomyces cerevisiae*
DURANTE OS PERÍODOS DE ENTRESSAFRA E PRODUÇÃO EM
TRÊS DESTILARIAS DE AGUARDENTE ARTESANAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

1999

Dedico este trabalho ao meu pai, à memória de
minha mãe, às minhas irmãs, ao Rodrigo e ao
Yago.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Carlos Augusto Rosa, pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade;
- Ao Prof. Valter Roberto Linardi, por assumir a minha orientação durante a ausência do Prof. Carlos Rosa;
- Aos companheiros de laboratório: Mara, Beatriz, Fátima de Cássia, Maria de Fátima, Cleuber, Adriana, Alice, Leonardo, Cláudia, Fabiana, Claudmeire, Raquel, João, Maristela, Vera e Janaína pela convivência, amizade e ajuda no dia-a-dia;
- À Carla Pataro, pela companhia nas coletas, nas capelas, e por toda a ajuda;
- À Juliana B. Guerra e Roberta Araújo, por toda prestatividade e auxílio, sem os quais teria sido difícil realizar parte deste trabalho;
- Charles Anacleto, pelas inúmeras assessorias prestadas;
- Aos proprietários das destilarias Brumado Velho, Germana e Lapinha, onde foram feitas as coletas que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Laboratório de Biologia de Microrganismos, pela colaboração;
- Ao Prof. Ivan (departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária), pelo auxílio na análise dos dados;
- À Cristina, secretária da pós-graduação, pela eficiência e prestatividade;
- À Goreti, pela amizade e por todo o material emprestado;
- Ao CNPq e Fundação Universitária Mendes Pimentel, pelo auxílio financeiro durante todo o período de realização deste trabalho;

- Às amigas: Ana Paula, Juliana Pimenta, Maria Cristina, Mariléia, Elaine, Frank e Vanessa, pela amizade e apoio;
- Agradeço, de forma muito especial, a todos da minha família, pelo apoio, interesse, carinho, e por dividirem comigo as dificuldades e alegrias de desenvolver este trabalho;
- A Deus, por TUDO.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
SUMÁRIO DAS TABELAS	ii
SUMÁRIO DOS GRÁFICOS	iii
SUMÁRIO DAS FIGURAS	iv
RESUMO	v
1 - RELEVÂNCIA	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3 - OBJETIVOS	10
3.1 - Objetivo Geral	10
3.2 - Objetivos Específicos	10
4 - MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 - Coleta das Amostras	11
4.2 - Processamento das Amostras	12
4.3 - Cariotipagem	14
4.4 - Produção de Micocinas (toxinas "killer")	15
4.5 - Teste de Resistência ao Etanol	16
5 - RESULTADOS	17
6 - DISCUSSÃO	39
7 - CONCLUSÕES	48
8 - ABSTRACT	50
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
10 - ANEXO 1	60
11 - ANEXO 2	72

SUMÁRIO DAS TABELAS

TABELA 1 - Espécies de leveduras isoladas durante o período de entressafra nas destilarias Germana (G), Brumado Velho (BV) e Lapinha (L).	26
TABELA 2 - Frequência das espécies de leveduras isoladas do mosto fermentado nas destilarias Germana, Brumado Velho e Lapinha.	29
TABELA 3 - Frequência de isolamento de leveduras produtoras de micocinas (toxinas "killer") durante o período de entressafra em três destilarias de aguardente	31
TABELA 4 - Frequência de isolamento de leveduras produtoras de micocinas durante o período fermentativo em três destilarias de aguardente	32

SUMÁRIO DOS GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Resistência ao etanol das linhagens isoladas durante o período de entressafra	33
GRÁFICO 2 - Resistência ao etanol das linhagens isoladas durante o período de produção	34

SUMÁRIO DAS FIGURAS

FIGURA 1 - Localização dos cromossomos no padrão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizado (BIO Rad - Y 265)	35
FIGURA 2 - Cariótipo das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas da destilaria Germana	36
FIGURA 3 - Cariótipo das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas da destilaria Lapinha	37
FIGURA 4 - Cariótipo das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas da destilaria Brumado Velho	38

RESUMO

As comunidades de leveduras, especialmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foram estudadas durante o período de produção de aguardente artesanal e entressafra. As coletas de mosto fermentado e fermento (pé-de-cuba), foram feitas durante o período de produção de aguardente. As amostras de solo, cana, drosófilas e "swabs" dos equipamentos foram obtidos durante o período de entressafra. As coletas foram feitas em três destilarias de aguardente artesanal localizadas próximas à cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. O período de coletas abrangeu o final da safra de 1996, entressafra, produção de fermento e início da safra de 1997. Todas as leveduras foram testadas quanto à produção de micocinas (toxinas "killer") e resistência a diferentes concentrações de etanol. As linhagens de *S. cerevisiae* predominantes no mosto fermentado e aquelas isoladas durante o período de entressafra foram comparadas através da análise do cariótipo. *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie predominante no mosto fermentado durante a última fermentação de 1996 e a primeira fermentação de 1997 nas três destilarias. Durante o período de entressafra, quatro linhagens dessa espécie foram obtidas, sendo três isoladas à partir do solo e uma da moenda. As leveduras isoladas durante o período de produção foram mais tolerantes às concentrações de etanol utilizadas. Um maior número de espécies produtoras de micocinas foi isolado durante o período de entressafra. A análise do cariótipo de 38 isolados de *S. cerevisiae* mostrou que todas as linhagens tinham perfis moleculares diferentes entre si, inclusive aquelas provenientes de uma mesma dorna. As diferenças entre os perfis moleculares das linhagens isoladas durante a última fermentação de 1996 e a primeira fermentação de 1997 sugerem que as linhagens de *S. cerevisiae* predominantes no final da safra de 1996 não foram responsáveis pelo reinício do ciclo fermentativo em 1997 em nenhuma das três destilarias. Nenhuma das linhagens de *S. cerevisiae* obtidas durante a entressafra ou na produção do fermento apresentou cariótipo igual aos das linhagens isoladas durante o início do período de produção. O isolamento de *S. cerevisiae* obtido no período de entressafra à partir do solo e moenda sugere que estes substratos são utilizados como microhabitats por esta espécie durante o período de entressafra no caso das destilarias de aguardente estudadas.