

SORAYA ROSELY CORRÊA

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

BELO HORIZONTE

- 1999 -

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.

Soraya Rosely Corrêa

**MICROHABITATS OCUPADOS 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.

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.

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 associadas ao processo fermentativo para produção de aguardente artesanal e os substratos utilizados como microhabitats pela espécie *Saccharomyces cerevisiae* durante o período de entressafra foram estudados. As coletas de mosto fermentado, fermento, amostras de solo, cana, drosófilas e "swabs" dos equipamentos foram obtidas em três destilarias de aguardente artesanal localizadas próximas à cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. O período de coletas abrangeu a finalização 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. A análise do cariótipo mostrou uma grande variação no perfil molecular das linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de destilarias diferentes ou isoladas 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 apresentou cariótipo igual aos das linhagens isoladas durante o período de produção. Os isolados de *S. cerevisiae* obtidos no período de entressafra à partir do solo e moenda sugerem que estes substratos são utilizados como microhabitats por esta espécie durante o período de entressafra no caso das destilarias de aguardente estudadas.

1) RELEVÂNCIA

A aguardente de cana é classificada pela legislação brasileira, Lei 5823, de 14 de novembro de 1972, como sendo uma bebida alcoólica fermento-destilada. Sua produção data de meados do século XVI, quando passou a ser consumida em grande escala. No Estado de Minas Gerais a preparação de aguardente é tradicional, e um volume de 100 a 1000 litros diários da bebida são produzidos através da fermentação espontânea do caldo de cana-de-açúcar. A aguardente atualmente é produzida por milhares de pequenos produtores, sendo que em Minas Gerais o número de alambiques cadastrados subiu de 1,5 mil para 8 mil nos últimos 14 anos. A produção nacional é estimada em cerca de 1,5 bilhão de litros com um consumo de 30 garrafas por segundo, ou 10 litros/habitante/ano. O comércio de aguardente tem movimentado anualmente cerca de 6,0 bilhões de dólares (dados fornecidos pelo INDI - Instituto de Desenvolvimento Industrial de Minas Gerais). A produção mineira de aguardente, por motivos históricos e culturais, segue métodos artesanais há vários séculos, e não apresenta desenvolvimento tecnológico suficiente para disputar o mercado com as grandes engarrafadoras paulistas. Ainda assim, a produção de aguardente em Minas Gerais é uma atividade tradicional e encontra-se em expansão, com uma produção de 130 milhões de litros anuais, para uma demanda de 170 milhões de litros/ano.

Entidades governamentais e de pesquisa, juntamente com a AMPAQ - Associação dos Produtores de Aguardente de Qualidade - e Pró-Cachaça (programa de apoio aos produtores de aguardente no estado de Minas Gerais), pretendem direcionar esforços no sentido de assegurar a qualidade do produto artesanal. Para que se possa alcançar a qualidade desejada, o primeiro passo a ser tomado é definir os parâmetros que influem sobre a mesma. A falta de controle do processo fermentativo do ponto de vista microbiológico é um dos fatores que acarretam variações em características de aroma e sabor da aguardente (características organolépticas) de safra para safra. Esta inconstância das características organolépticas da aguardente artesanal compromete a idéia de regulamentar-se um padrão de qualidade do produto.

A necessidade de obtenção de características constantes da aguardente para conseqüente melhoria da qualidade requer estudos mais aprofundados sobre a ecologia e fisiologia das leveduras fermentadoras envolvidas na produção da mesma. Dentre as leveduras envolvidas no processo fermentativo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é apontada como predominante e principal responsável pela maior parcela da fermentação. Diversos trabalhos descrevem a dinâmica de populações que resulta na predominância desta espécie, e as variações moleculares que a mesma apresenta durante diferentes períodos da produção de vinho. Entretanto, dados a respeito da ecologia de *S. cerevisiae* são escassos, existindo ainda controvérsias a respeito de sua ocorrência em ambientes naturais, não associados a fermentações. Existem estudos a respeito da ocorrência desta espécie em diversos substratos associados a fermentação espontânea para produção de vinhos. Em destilarias de aguardente artesanais não foram feitos ainda estudos a respeito da ocorrência de *S. cerevisiae*, principalmente no período de paralisação da produção.

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de obter dados a respeito da ocorrência de *S. cerevisiae* em substratos associados a destilarias de aguardente artesanal. Um melhor entendimento sobre a ecologia desta espécie pode auxiliar os produtores no controle da produção, e na seleção de linhagens iniciadoras que promovam a melhoria da qualidade do produto final, a aguardente.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre os fungos, as leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares e sem motilidade própria, saprofiticos ou parasitas. Congregam um grupo funcional de organismos heterotróficos colonizadores de substratos contendo fonte orgânica de carbono e mesofílicos, crescendo a temperaturas entre 18 e 45° C. Taxonomicamente pertencem às classes Ascomycetes e Basidiomycetes dos fungos, quando apresentam formas de reprodução sexuada descrita, e Deuteromycetes, sem fase sexual observada (KREGER VAN RIJ, 1984). São, economicamente e quantitativamente, o grupo de microrganismos mais importante dentre aqueles utilizados pelo homem (MARTINI & VAUGHAN-MARTINI, 1995). Por serem organismos eucarióticos unicelulares, de fácil cultivo, manipulação e observação ao microscópio óptico, as leveduras são consideradas um excelente modelo de estudo, sendo que sua importância nas áreas de microbiologia de alimentos e bebidas, expressão gênica, melhoramento genético e medicina tem sido amplamente pesquisada.

As leveduras estão distribuídas em uma grande variedade de ambientes naturais como plantas (folhas, frutos, flores ou exsudatos de árvores), superfície e trato gastrointestinal de animais de sangue quente, superfície do corpo ou intestino de insetos e crustáceos, solos (cultivados ou não) de regiões com climas variados, e diversos outros ambientes (MARTINI, 1993). Algumas leveduras ocorrem primariamente em substratos que contêm açúcares, como frutos, onde as mesmas podem desenvolver um metabolismo fermentativo; podem ainda colonizar materiais que tenham sido alvo da atividade fermentativa de bactérias, graças à sua capacidade de crescer sob uma ampla faixa de valores de pH. Entretanto, a maioria das espécies carece da capacidade de fermentar açúcares, ou fermentam hexoses em níveis baixos. A habilidade de utilizar um largo espectro de compostos orgânicos não fermentáveis através do processo de respiração expandiu a capacidade de determinadas leveduras ocuparem nichos ecológicos onde compostos que podem ser metabolizados especificamente por enzimas respiratórias estejam presentes. A ocupação de substratos naturais pelas leveduras é diretamente dependente da presença de compostos metabolizáveis (carbono e nitrogênio principalmente), da presença

de compostos tóxicos e inibitórios, pH, pressão osmótica e temperatura, além da interação com insetos dispersores e vetores (PHAFF & STARMER, 1987; MORAIS *et al.*, 1992; MORAIS, 1994).

As leveduras são microrganismos comercialmente importantes na área de alimentos e bebidas, seja pelos danos que podem causar a determinados processos, como contaminantes, seja pela capacidade de conduzir fermentações desejáveis para obtenção de diversos produtos. Sua capacidade de fermentar substratos diversos vem sendo explorada pelo homem há séculos, ainda que por muito tempo essa utilização tenha se dado de forma inconsciente.

A fermentação, seja ela alcoólica ou não, é um processo metabólico que consiste na oxidação parcial do carbono de substâncias orgânicas, o que leva à liberação de energia (energia esta menor que aquela liberada no processo de respiração). O que caracteriza a fermentação alcoólica é a formação de duas moléculas de CO₂ e duas moléculas de etanol a partir de uma molécula de glicose. A formação de ésteres, aldeídos, glicerol e inúmeras outras substâncias orgânicas conhecidas como produtos secundários da fermentação alcoólica, responsáveis pelo "flavor" da bebida, ocorrem simultaneamente, através de outras transformações químicas. Este tipo de fermentação é desenvolvida por um grupo restrito de microrganismos, dentre os quais a indústria utiliza leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces*, além da bactéria *Zimomonas mobilis* (MAIA *et al.*, 1994). A relação entre crescimento e produção de etanol não é ainda completamente entendida; em uma fermentação típica, a taxa da produção de etanol aumenta paralelamente ao período de crescimento, mas quando o crescimento cessa, a produção de etanol continua alta, até que o substrato remanescente seja utilizado totalmente (BERRY, 1988).

A fermentação alcoólica pode ser conduzida por três sistemas distintos: o convencional (em batelada), o descontínuo-alimentado e o contínuo. O sistema convencional consiste em associar de uma só vez o fermento e todo o meio a ser fermentado. No sistema descontínuo-alimentado o meio é adicionado ao mosto de maneira intermitente. No sistema contínuo, após realizada a fermentação, alíquotas do mosto são

retiradas e submetidas a um processo de separação de biomassa, que é reintroduzida no tanque para o reinício de um novo ciclo fermentativo (MAIA *et al.*, 1994).

No que se refere à utilização de microrganismos, o processo fermentativo pode ser conduzido (quando iniciado por linhagens previamente selecionadas, que são adicionadas ao meio), ou espontâneo. A fermentação denominada espontânea caracteriza-se por ser feita pela microbiota presente naturalmente nos substratos e/ou equipamentos utilizados. Este tipo de fermentação é tradicionalmente utilizado na produção de vinhos na Europa, bem como na produção de diversas bebidas africanas (pitu, burukutu, sekete), do Brasil (aguardentes) e do México (tequila) (QUEROL *et al.*, 1992; SANNI & LONNER, 1993; LACHANCE, 1995; MORAIS *et al.*, 1997;). Estudos sobre a microbiota envolvida no processo fermentativo para produção dessas bebidas revelaram a espécie *Saccharomyces cerevisiae* como responsável pela maior parcela da fermentação, além de ser a espécie dominante após uma sucessão de leveduras (SHEHATA, 1959; SANNI & LONNER, 1993; LACHANCE, 1995; MORAIS *et al.*, 1997).

Dentre as espécies de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* é talvez a mais conhecida, seja no que refere à sua morfologia, genética, fisiologia ou aplicações industriais. Entretanto, conhecimentos sobre aspectos da sua ecologia em ambientes naturais não apresentam ainda grandes avanços, e os estudos sobre a ocorrência dessa espécie na natureza são muitas vezes controversos (MARTINI & VAUGHAN-MARTINI, 1995; TÖRÖK *et al.*, 1996). Segundo MARTINI & VAUGHAN-MARTINI (1995), a ocorrência de *S. cerevisiae* e espécies relacionadas taxonomicamente à mesma não só em mosto de uva, mas também em solos de pomares, frutos e plantas, além de ampla distribuição na natureza, foi confirmada por diversos pesquisadores em vários países. Entretanto, estes resultados seriam na realidade fruto de pesquisas direcionadas em favor das chamadas “leveduras do vinho”. Essa opinião baseia-se no fato de que os meios de cultura utilizados para isolamento foram meios enriquecidos, ou o próprio mosto de uva. O mosto de uva contém aproximadamente 20% de açúcar, sendo portanto um meio que favorece seletivamente leveduras fermentadoras e resistentes ao etanol; conseqüentemente, a chance de isolamento de espécies que não possuam estas características anteriores é muito

pequena (ROSINI *et al.*, 1982). Nos estudos sobre a ecologia de *S. cerevisiae* foi possível verificar que onde meios de cultura enriquecidos não foram utilizados, esta espécie esteve praticamente ausente de uvas e solo de vinícolas; a análise de cerca de 2000 bagas de uvas em diferentes estágios de maturação revelou a presença de somente um isolado de *S. cerevisiae* (MARTINI & VAUGHAN-MARTINI, 1995). Por outro lado, *S. cerevisiae* foi predominante quando substratos relacionados a vinícolas (dornas, adegas, vasilhames, e plantas presentes no ambiente, e até mesmo as mãos dos trabalhadores da vinícola) foram estudados durante o período de produção de vinho (PEYNAUD & DOMERQ, 1959).

Para confirmar a hipótese de que o habitat exclusivo de *S. cerevisiae* fosse na verdade a superfície dos diversos equipamentos das vinícolas, que ficam expostos a bilhões de células dessa levedura a cada safra, ROSINI *et al.* (1982) utilizaram uma linhagem de *S. cerevisiae* H₂S-negativa (produz colônias brancas em meio ágar Nickerson, ao contrário da linhagem H₂S-positiva, que produz colônias pretas) como iniciadora do processo fermentativo em uma vinícola recém instalada. Durante dois anos consecutivos de produção a linhagem H₂S-negativa foi a iniciadora da fermentação, e o resultado foi que todas as superfícies da vinícola foram colonizadas por essa linhagem. No terceiro ano de produção, a fermentação empregada foi espontânea, sendo que os resultados mostraram uma ocupação imediata do mosto pela linhagem H₂S-negativa, residente na vinícola, que inibiu quase completamente o desenvolvimento de leveduras selvagens como *Kloeckera apiculata*, proveniente da superfície das uvas. Baseado nesses resultados, naqueles obtidos após análise de superfície de uvas e em outros trabalhos, MARTINI & VAUGHAN-MARTINI (1995) afirmam que esta é uma espécie domesticada, ou seja, de ocorrência restrita a ambientes de fermentação criados pelo homem. *Saccharomyces paradoxus*, que foi isolada de drosófilas e exsudato de árvores, é apontada como única espécie relacionada a *S. cerevisiae* cuja ocorrência dá-se em ambientes naturais, e poderia representar um ancestral das leveduras fermentadoras domesticadas. Em seu estudo sobre a comunidade de leveduras associadas à produção artesanal de tequila, LACHANCE (1995) sugere que *S. cerevisiae* não tem como habitat as plantações de agave (planta utilizada para produção da tequila) ou a vegetação vizinha. Para o autor, esta espécie se desenvolve na própria

destilaria, e possivelmente ocorre um envolvimento de espécies de *Drosophila* que atuam como vetores de outras espécies de leveduras até o mosto.

TÖRÖK *et al.* (1996) utilizaram diferentes técnicas e meios de isolamento no estudo da microbiota de quatro vinícolas (localizadas em locais distintos) nas quais o processo de fermentação espontânea era utilizado; segundo estes, a utilização de procedimentos tais como lavagem intensa das uvas e uso de meio de cultura seletivo permitem isolar linhagens de leveduras fermentadoras de cachos e do suco de uva sob condições assépticas. Estes pesquisadores chamam ainda a atenção para o fato de que as uvas poderiam ser utilizadas como habitat pela espécie *S. cerevisiae*, uma vez que a formação de pseudohifas por essa levedura, para penetração em substratos, já foi relatada por outros estudos (FINK *et al. apud* TÖRÖK *et al.*, 1996). Segundo TÖRÖK *et al.* (1996), a dificuldade em isolar leveduras adaptadas a fermentações é consequência da sua baixa ocorrência na natureza, cerca de 0,1% da microbiota de leveduras em vinícolas, enquanto o título total de leveduras pode variar de 10^0 a 10^6 g⁻¹ de uvas. Apesar dos diversos estudos descritos na literatura sobre a ecologia de *S. cerevisiae*, ainda permanece a controvérsia a respeito de sua ocorrência em ambientes naturais. Para alguns pesquisadores, esta espécie, conforme proposto por MARTINI & VAUGHAN-MARTINI (1995), está restrita aos ambientes de fermentação. Para outros, como TÖRÖK *et al.* (1996), *S. cerevisiae* ocorre na natureza em populações muito baixas caracterizando a dificuldade de isolar esta espécie de ambientes naturais.

Estudos têm sido feitos em diversas destilarias de aguardente localizadas em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, visando a caracterização fisiológica e molecular da micobiota envolvida no processo fermentativo, bem como sua relação com a qualidade da bebida produzida (MORAIS *et al.*, 1997; PATARO *et al.*, 1998; PATARO *et al.*, no prelo). O acompanhamento da sucessão de espécies de leveduras durante a fermentação espontânea do caldo de cana em uma destilaria de aguardente mostrou que *S. cerevisiae* e *Candida sake* foram as espécies iniciadoras do ciclo fermentativo. O aumento da população de *S. cerevisiae* correspondeu ao desaparecimento de muitas espécies inoculadas com o caldo de cana, incluindo as espécies do gênero *Kloeckera*, ao final do

ciclo de fermentação (MORAIS *et al.*, 1997). No entanto, estudos sobre os substratos utilizados por *S. cerevisiae* neste tipo de fermentação ainda são inexistentes. Vários produtores acreditam que as leveduras fermentadoras estão associadas à superfície da cana, e alcançam as dornas através do caldo.

Nas destilarias de aguardente a produção da bebida inicia-se com a preparação de fermento ("pé-de-cuba"), que visa a propagação da microbiota presente nos substratos e equipamentos utilizados. A composição do fermento pode variar conforme a receita de cada produtor, havendo casos em que ocorre a mistura de arroz, milho moído, frutas e outros substratos ao caldo de cana. Este tipo de fermento é conhecido como "caipira", e juntamente com o processo de fermentação espontânea e produção artesanal, caracteriza a aguardente produzida em Minas Gerais. Decorrido um período de 7 a 20 dias da preparação do fermento, alíquotas do mesmo são distribuídas às demais dornas, com posterior adição do caldo de cana; essa mistura constitui o mosto de cana-de-açúcar. Após o processo fermentativo (que tem duração de cerca de 24 horas) as células da microbiota depositam-se no fundo da dorna, e o mosto é então destilado. O fermento presente no fundo das dornas é reutilizado nas fermentações seguintes, a menos que contaminações ocorram, quando a preparação de um novo fermento é então necessária.

Entidades governamentais e de pesquisa têm direcionado esforços no sentido de assegurar a qualidade da aguardente produzida artesanalmente. Para que isso possa ser alcançado, é necessário definir os parâmetros que influem nessa qualidade. A falta de controle do ponto de vista microbiológico é um dos fatores que acarretam variações em características de aroma e sabor da aguardente. A necessidade da obtenção de características constantes da aguardente para melhoria da qualidade requer estudos mais aprofundados em várias áreas, incluindo aqueles sobre a ecologia e fisiologia das leveduras envolvidas no processo de produção.

Considerando o papel da espécie *S. cerevisiae* no processo de produção da aguardente, é de grande importância esclarecer aspectos da sua ecologia, como por

exemplo, identificar os substratos que podem ser utilizados como habitat por essa levedura nas destilarias que utilizam o processo de produção artesanal. Os resultados obtidos neste e em outros trabalhos a respeito do processo fermentativo para produção da aguardente artesanal poderão auxiliar os produtores na melhoria da qualidade dessa bebida. O conhecimento das características fisiológicas, moleculares e da ecologia das leveduras envolvidas na produção da aguardente possibilitará a criação de um banco de leveduras selecionadas, que poderá ser colocado à disposição dos produtores.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo Geral

O objetivo principal desse trabalho consistiu na identificação dos microhabitats ocupados por comunidades de leveduras fermentadoras, principalmente *S. cerevisiae*, em três destilarias de aguardente artesanal no Estado de Minas Gerais, através do estudo dos diversos substratos associados ao processo de produção.

3.2) Objetivos Específicos:

- caracterizar a microbiota fermentadora no final da safra, período de entressafra, preparação do fermento e início da produção da aguardente artesanal em três destilarias;
- estudar a produção de micocinas pelas espécies isoladas na entressafra, preparação do fermento, final e início da produção;
- verificar a tolerância a diferentes concentrações de etanol das leveduras isoladas;
- caracterizar os isolados de *S. cerevisiae* predominantes no mosto e obtidos durante a entressafra através da análise do cariótipo e verificar se estas linhagens foram as responsáveis pelo reinício do ciclo fermentativo na safra de 1997.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Coleta das amostras

Coletas de mosto fermentado de cana-de-açúcar, solo, cana, folhas de cana, drosófilas e “swabs” de maquinaria foram feitas em três diferentes destilarias de aguardente : Brumado Velho (município de Brumado), Germana (município de Nova União) e Lapinha (município de Lagoa Santa), localizadas próximas à cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

O período de coleta abrangeu a etapa final da produção no ano de 1996 (entre os meses de setembro e dezembro), o período de entressafra, durante o qual a aguardente não é produzida (entre os meses de janeiro e abril), o período de produção do fermento (“pé-de-cuba”), geralmente preparado 15 dias antes do reinício da produção, e a primeira fermentação da safra do ano de 1997(entre os meses de maio e julho). No período de entressafra foram realizadas três coletas, com um intervalo de aproximadamente 30 dias entre cada uma.

A coleta do mosto fermentado foi feita em todas as dornas de fermentação de cada destilaria , utilizando-se frascos de 500 ml estéreis, que foram introduzidos nas dornas com o auxílio de um barbante amarrado à extremidade do frasco. Em seguida, os frascos foram acondicionados em gelo e transportados até o laboratório.

“Swabs” previamente embebidos em solução salina (NaCl 0,85%) foram passados nas dornas vazias, moendas, chão próximo às dornas, canal condutor de caldo de cana à dorna e acondicionados em tubos de ensaio estéreis.

As amostras de solo obtidas da superfície, cana e folhas foram coletadas no canavial e acondicionadas, separadamente, em sacos plásticos estéreis. A coleta de moscas do gênero *Drosophila* foi realizada com auxílio de uma isca preparada com banana fermentada (bananas e fermento tipo Fleshman); sobre o vasilhame foram colocadas camadas de gaze estéril para que as moscas não entrassem em contato com as leveduras presentes na isca. Atraídas pelo odor liberado pela isca, as moscas foram capturadas com sacos plásticos, aspiradas com

sugador e colocadas para caminhar por cerca de 8-12 horas em placas contendo ágar YM (extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%, cloranfenicol 0,01%). Este procedimento visou o isolamento das leveduras presentes na superfície externa do corpo do inseto, bem como daquelas presentes no trato digestivo (liberadas por regurgitação), aparelho ovopositor ou material fecal (MORAIS *et al.*, 1995).

4.2) Processamento das Amostras

Mosto fermentado

As amostras permaneceram no gelo por um período de no máximo três horas após a coleta; foram feitas diluições decimais seriadas em tubo de ensaio contendo água destilada estéril, sendo 0,1 ml retirado das diluições 10^{-5} e 10^{-6} e plaqueado em ágar nutriente WL (DIFCO) e SCY (ágar caldo de cana - extrato de levedura: garapa 10%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%, cloranfenicol 0,01%) em triplicata e incubado a 25° C por um período de 3 a 5 dias.

Solo

O número de amostras de solo foi de cinco por coleta (totalizando 15 amostras em cada destilaria). Duas sub-amostras de 1 grama foram retiradas de cada saco plástico e diluídas em 9 ml de água destiladas estéril. Após homogeneização em agitador tipo Vortex (velocidade máxima, durante dois minutos), foram feitas diluições decimais seriadas, sendo 0,1 ml retirado das diluições 10^{-4} e 10^{-5} , e plaqueado em meio YM, WL e SCY em triplicata e as placas incubadas a 25°C por um período de três a cinco dias.

Cana e folhas de cana

As amostras de colmo de cana tiveram a casca raspada em toda a sua extensão e na região próxima à inserção da folha com um estilete desinfetado com álcool 70% e flambado; o pó obtido foi diluído em água destilada estéril e após homogeneização em Vortex por dois minutos, 0,1 ml da solução foi plaqueado em meio WL e SCY. As amostras foram incubadas por três a cinco dias, a 25°C.

Drosófilas

Após o período de 8-12 horas no qual permaneceram nas placas, as moscas foram libertadas e as placas incubadas a 25°C por três a cinco dias.

“Swabs”

Os “swabs” foram estriados por esgotamento em placas contendo meio WL e SCY e incubados por três a cinco dias a 25°C; 30 dos “swabs” foram inseridos em tubos contendo caldo SCY acrescido de etanol nas concentrações 5, 8 e 10%. Os tubos foram incubados nas condições descritas anteriormente, sendo que a turvação do meio foi usada como indicativo do crescimento de microrganismos. Os “swabs” eram então retirados e estriados por esgotamento em placas contendo meio SCY e WL e incubadas nas mesmas condições anteriores.

Isolamento das leveduras

Transcorrido o período de incubação, as colônias presentes foram descritas com base na sua cor, textura, forma, tamanho e registradas com os dados de procedência (local, material, data de coleta). As colônias foram purificadas através da técnica de esgotamento com alça de platina em placas contendo ágar Sabouraud e armazenadas em tubos com meio de estoque GYMP (glicose 2%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 0,5%, fosfato de potássio dibásico 0,2% e ágar 2%) inclinado. As culturas puras foram estocadas em geladeira sob uma camada de óleo mineral esterilizado para posterior identificação. As leveduras que foram

submetidas a análise de cariótipo foram congeladas a -86°C em caldo GYMP acrescido de 20% de glicerol.

Todas as leveduras isoladas foram identificadas segundo procedimento padrão (VAN DER WALT & YARROW, 1984) e as chaves taxonômicas presentes em BARNETT *et al.* (1990), VAUGHAN-MARTINI & MARTINI (1993) e KURTZMAN & FELL (1998).

4.3) Cariotipagem

Realizada a identificação das leveduras, as linhagens de *S. cerevisiae*, cujas populações foram predominantes no mosto fermentado e no fermento, e aquelas isoladas durante a entressafra à partir dos substratos anteriormente citados foram submetidas à análise de cariótipo. Cada uma das linhagens foi inoculada em ágar Sabouraud e incubada por 24 horas a 25°C ; decorrido esse período, foram preparados os blocos contendo as células das linhagens de *S. cerevisiae*, seguindo a metodologia descrita por SMITH *et al.* (1988):

- uma alçada de cada inóculo foi transferida para Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio YPD (dextrose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 0,5%). Os mesmos foram incubados "overnight" sob agitação (aproximadamente 100 r.p.m) a 25°C .
- as células de cada linhagem foram contadas em câmara de Newbawer (foram utilizadas diluições 1:200 ou 1:300 das culturas em meio YPD em água destilada).
- os volumes obtidos após os cálculos de cada cultura foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados a 2000 r.p.m por 10 minutos; o sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspendidas em EDTA 50mM pH 8,0 e centrifugadas nas mesmas condições anteriores por três vezes;
- O sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspendidas em 1 ml de EDTA 50mM pH 8,0; 40 μl de enzima Novozym (20mg/ml) e 1 ml de agarose 1%. Após distribuição nos moldes, os blocos permaneceram a uma temperatura de aproximadamente 4°C por 15-20 minutos;
- Após a solidificação, os blocos foram transferidos para solução de β -mercaptoetanol (v/v) e incubados "overnight" a 37°C em banho-maria;

- Os blocos foram então lavadas com EDTA 50mM pH 9,0 e incubados com solução ESP (lauryl-sarcosyl) contendo proteinase K (1mg/ml), de ação detergente, durante 48 horas a 50°C em banho-maria.

Ao final do processo, foram obtidos blocos com esferoplastos com cromossomos íntegros, livres de proteínas e demais constituintes celulares que tenham sofrido fragmentação mecânica. Para obtenção de cariótipo pela eletroforese de pulso alternado foi utilizado o equipamento Gene Navigator (Pharmacia). Este sistema apresenta uma variedade de eletrodos dispostos de forma hexagonal, que permite a geração de campos elétricos uniformes. A voltagem, os intervalos de tempo (pulsos) e a duração da corrida eletroforética utilizados são aqueles apresentados nas legendas das figuras. Após obtido o gel, o mesmo foi corado com brometo de etídio, observado em transluminador de ultra violeta e fotografado.

4.4) Produção de Micocinas (toxinas "killer")

A atividade micocinogênica foi testada em meio YM suplementado com 0,003% de azul de metileno e tamponado com tampão citrato para pH 4,2. *Candida glabrata* (Y 55 NCYC 366) (sensível a quase todas as micocinas conhecidas) e *S. cerevisiae* (NCYC 1006) (sensível às micocinas produzidas por *S. cerevisiae*) foram as linhagens utilizadas como padrão de sensibilidade (YOUNG, 1987; STARMER *et al.*, 1992). Essas leveduras e aquelas a serem testadas como produtoras de micocinas foram previamente inoculadas em ágar Sabouraud por 24 horas. As linhagens sensíveis foram diluídas em água destilada estéril e espalhadas com o auxílio de um "swab" estéril na superfície das placas contendo o meio YM. Para as linhagens a serem testadas quanto a produção de micocinas, foi feito um inóculo pesado em ponto em cada uma das placas contendo as linhagens sensíveis. As placas foram incubadas a 22° C por 96 horas e observadas diariamente. Foram consideradas positivas para a produção de micocina aquelas leveduras que produziram um halo de inibição ao seu redor, com uma zona adjacente azul, indicando a morte celular da linhagem sensível (YOUNG, 1987; STARMER *et al.*, 1992).

4.5) Teste de resistência ao etanol

As leveduras foram crescidas em meio Sabouraud por 24 horas, diluídas em água destilada estéril e cerca de 10 µl inoculados em tubos contendo caldo Sabouraud acrescido de etanol nas concentrações de 5%, 8% e 10% (o etanol foi adicionado após esterilização do caldo) e cobertos com parafilme para evitar a evaporação. Os tubos foram incubados a uma temperatura de 25° C por 96 horas e o crescimento determinado pela turvação do meio.

5) RESULTADOS

Um total de 360 isolados de leveduras foram obtidos à partir dos substratos estudados durante a entressafra e o período de produção de aguardente nas três destilarias. Destes, 315 foram identificados a nível de espécie, oito somente a nível de gênero (**tabelas 1 e 2**) e 37 isolados morreram antes de serem identificados.

Dos isolados obtidos na entressafra, 41% assimilaram nitrato, 78,8% assimilaram lisina e 31,6% cresceram na presença de 1000 ppm de cicloheximida; 66,4% cresceram em meio contendo 10% de NaCl. O crescimento a 37° C e 40° C foi positivo para 87,8% e 56,4% dos isolados, respectivamente; a fermentação de glicose foi positiva para 71,4%.

Dos isolados do período de produção de aguardente, 5,7% assimilaram nitrato, 30,5% assimilaram lisina e 12,7% cresceram na presença de 1000 ppm de cicloheximida; 23,5% cresceram na presença de 10% de NaCl. O crescimento a 37° C e 40° C foi positivo para 89,1% e 73,8% dos isolados, respectivamente, e 93,6% fermentaram glicose.

Nas dornas vazias durante a entressafra, o menor número de espécies foi encontrado nas destilarias Brumado Velho e Germana e o maior na destilaria Lapinha (**tabela 1**). A espécie *Pichia anomala* foi predominante entre os isolados de dornas vazias das três destilarias (**tabela 1**).

Cryptococcus albidus var. *albidus* foi a espécie predominante na moenda da destilaria Lapinha (**tabela 1**). Um isolado pertencente à espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi obtido à partir da moenda da destilaria Lapinha (**tabela 1**).

Cinco espécies de leveduras isoladas de drosófilas foram comuns às destilarias Brumado Velho e Germana (**tabela 1**). Leveduras pretas, *P. membranifaciens* e *Issatchenkia occidentalis* foram isoladas em maior frequência à partir das drosófilas da destilaria Brumado Velho (**tabela 1**). Na destilaria Lapinha, o número de leveduras isoladas das drosófilas foi pequeno quando comparada às demais destilarias, provavelmente porque

nessa destilaria o número de moscas coletadas foi menor, sendo observada a ocorrência de duas espécies de *Candida* e um isolado do gênero *Rhodotorula* (tabela 1). Na destilaria Germana, a espécie *Cryptococcus albidus* var. *albidus* foi predominante entre os isolados de drosófilas, seguida por *C. norvegensis*, *C. stellata*, *P. anomala* e *P. membranifaciens* (tabela 1).

O número de leveduras isoladas do solo foi baixo e as espécies diferentes entre as destilarias, sendo que *S. cerevisiae* foi a única espécie de ocorrência comum entre amostras de solo de duas destilarias distintas. Dois isolados foram obtidos do solo na destilaria Lapinha, e um da destilaria Brumado Velho (tabela 1).

Candida parapsilosis, *Cryptococcus* sp 2, *Pichia* sp 2, *P. jadinii* e *Rh. acheniorum* foram as espécies isoladas à partir das amostras de cana na destilaria Brumado Velho. *Blastobotrys proliferans* e *Cr. flavus* foram as espécies isoladas da cana na destilaria Germana; na destilaria Lapinha somente um isolado (*Zygoascus hellenicus*) foi obtido à partir deste substrato (tabela 1).

Saccharomyces cerevisiae foi predominante no mosto fermentado durante a última fermentação da safra de 1996 nas três destilarias (tabela 2). Nas destilarias Brumado Velho e Germana, esta foi a única espécie presente nas dornas durante este período. Na destilaria Lapinha, *P. mucosa*-similar, *C. kefir*, *C. stellata*, *C. citrea*, *Cr. albidus* var. *albidus* e *Cr. dimennae* foram também espécies isoladas à partir do mosto da última fermentação (tabela 2).

Para a produção do fermento ("pé-de-cuba"), as destilarias Brumado Velho e Lapinha utilizaram os mesmos ingredientes, e somente um tipo de fermento foi produzido nestas destilarias. Na destilaria Germana, dois tipos de fermento foram preparados, ambos contendo ingredientes diferentes daqueles utilizados pelas outras duas destilarias.

Na destilaria Brumado Velho, *C. ingens*-similar foi predominante no fermento coletado cerca de duas a três horas após o preparo. *Candida krusei*, *C. lambica*, *Cr. albidus*

var. *albidus*, *K. lactis* var. *drosophilarum*, *I. occidentalis*, *P. norvegensis* e *K. waltii*-similar foram espécies também isoladas à partir do fermento nessa destilaria (**tabela 2**).

Na destilaria Germana, *S. cerevisiae* foi predominante nos dois tipos de fermento preparados. *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilarum* e *S. cerevisiae* foram as espécies isoladas à partir do fermento A. No fermento B o número de espécies de leveduras foi maior, sendo obtidos isolados das espécies *C. edax*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. holmii*, *C. spherica*, *C. valida*, *Cr. laurentii*, *K. lactis* var. *lactis*, *S. cerevisiae*, *S. exiguus* e um isolado pertencente ao gênero *Pichia* (**tabela 2**).

Pichia kluyveri foi a espécie predominante no fermento da destilaria Lapinha. *Candida cantarelii*-similar, *C. citrea*, *C. famata*, *P. guilliermondii*, *C. sake*, *Cr. albidus* var. *albidus*, *Cr. kuetzingii*, *K. lactis* var. *drosophilarum*, *P. norvegensis* e *S. cerevisiae* também foram isoladas desse fermento (**tabela 2**).

A predominância de *S. cerevisiae* no mosto ocorreu também durante a primeira fermentação da safra de 1997, nas três destilarias. Na destilaria Brumado Velho, as espécies isoladas nesse período foram *P. subpelliculosa*-similar, *S. cerevisiae*, *S. exiguus* e *S. kluyveri* (**tabela 2**). Na destilaria Lapinha foram isoladas linhagens de *S. cerevisiae* e *C. kefyri* (**tabela 2**). Na Germana, as dornas nas quais foi utilizado o fermento B apresentaram um número maior de espécies de leveduras quando comparadas às dornas onde foi utilizado o fermento A. *Candida dendrica*-similar, *C. famata*, *K. lactis* var. *drosophilarum*, *K. lactis* var. *lactis*, *Kl. apiculata*, *P. heimii*, *P. kluyveri* e *S. cerevisiae* foram isoladas à partir das dornas onde utilizou-se o fermento B; *C. valida*, *K. lactis* var. *lactis* e *S. cerevisiae* foram isoladas à partir das dornas onde utilizou-se o fermento A (**tabela 2**).

Algumas espécies isoladas durante o período de entressafra ocorreram também no período de produção da aguardente. Na destilaria Brumado Velho, as espécies *I. occidentalis*, *Cr. albidus* var. *albidus* e *S. cerevisiae* foram isoladas de moenda, drosófilas ou solo. Com exceção de *S. cerevisiae*, as demais espécies foram isoladas à partir do fermento, durante o reinício da produção da aguardente. Na destilaria Germana as espécies

comuns ao período de entressafra e produção foram *K. lactis* var. *drosophilorum*, *C. valida* e *C. guilliermondii* (tabelas 1 e 2). O maior número de espécies isoladas na entressafra e produção foi na destilaria Lapinha, onde *Cr. albidus* var. *albidus*, *P. guilliermondii*, *C. famata*, *Cr. kuetzingii*-similar e *S. cerevisiae* tiveram ocorrência registrada nos dois períodos (tabelas 1 e 2).

Os perfis fisiológicos das espécies isoladas são mostrados no ANEXO I. Isolados de *P. anomala* obtidos à partir de drosófilas nas destilarias Brumado Velho e Germana, assim como 50% daqueles obtidos das dornas vazias não assimilaram rafinose; algumas linhagens pertencentes a esta espécie assimilaram 2-ceto-gluconato, diferindo da descrição padrão (KURTZMAN, 1998). Considerando o total de linhagens de *Cr. albidus* isoladas dos diversos substratos, 75% apresentaram crescimento vigoroso a 37° e 40° C. *Cr. dimennae* assimilou melibiose, melezitose e cresceu a 37°C. Estes isolados diferiram das descrições taxonômicas para as espécies (FELL & STATZELL-TALLMAN, 1998). *Cr. elinovii* não assimilou trealose, 2-ceto-gluconato e manitol, diferindo da descrição padrão para a espécie (MIRANDA, 1984). Um dos isolados de *S. cerevisiae* obtidos à partir do solo não assimilou rafinose; nas três destilarias, em diferentes períodos, foram obtidas populações desta espécie cuja assimilação de trealose foi negativa, diferindo da descrição padrão (VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 1998). As duas linhagens de *C. stellata* isoladas de drosófilas na destilaria Brumado Velho cresceram a 37° C; *C. bombicola* assimilou trealose, 2-ceto-gluconato, lactato, cresceu a 37° C e na concentração de 1000 ppm de cicloheximida, diferindo das descrições taxonômicas para as espécies (MEYER *et al.*, 1984; MEYER *et al.*, 1998). *C. castellii* assimilou citrato e cresceu na concentração de 100 ppm de cicloheximida; *C. fennica* assimilou inulina, ramnose, lactato e cresceu a 37° C. *Candida insectorum*-similar assimilou sorbose, lactose, melibiose, rafinose, inulina, galactitol, 2-ceto-gluconato e cresceu a 40° C. *Candida magnoliae* não assimilou galactose, 2-ceto-gluconato, lisina, e não cresceu na concentração de 10% de NaCl; o crescimento dos isolados desta espécie foi positivo a 40° C. *Candida parapsilosis* assimilou celobiose, galactitol e não assimilou lisina. Os isolados de *C. kefir* não assimilaram rafinose e cresceram em sorbose. Todos os isolados descritos anteriormente diferiram das descrições taxonômicas para as espécies (MEYER *et al.*, 1998).

Dois isolados de *K. waltii*-similar e um dos isolados de *K. lactis* var. *drosophilarum* cresceram a 40° C. Estes isolados diferiram das descrições padrão para as espécies (LACHANCE, 1998). As linhagens de *P. membranifaciens* isoladas da destilaria Brumado Velho não assimilaram 2-ceto-gluconato nem cresceram na presença de 10% NaCl. *Pichia subpelliculosa*-similar assimilou sorbose, lactose, melibiose e galactitol, e não assimilou trealose e manitol. *Pichia burtonii*-similar assimilou lactose, não assimilou rafinose, ribose, eritritol e não cresceu na concentração de 10% de NaCl; o crescimento dos isolados foi positivo a 40° C. Todos os isolados de *P. mucosa*-similar apresentaram crescimento positivo a 37° e 40° C, sendo que algumas das linhagens assimilaram melibiose. Os isolados descritos anteriormente diferiram das descrições padrão para as espécies (KURTZMAN, 1998). *Dekkera bruxellensis* não cresceu a 37° C e assimilou succinato, diferindo da descrição padrão para a espécie (SMITH, 1998). *Rhodotorula acheniorum* não assimilou galactose, melezitose, ribose e cresceu a 37° C, diferindo da descrição padrão para a espécie (FELL & STATZELL-TALLMAN, 1998).

Dentre os isolados obtidos durante a preparação do fermento, *C. ingens*-similar assimilou manitol, xilose, glucitol e citrato. *Cryptococcus albidus* não assimilou manitol e glucitol; *K. lactis* var. *drosophilarum* não assimilou 2-ceto-gluconato e citrato. *Pichia norvegensis* não cresceu a 37° C, e *K. waltii*-similar assimilou glicerol e não cresceu em sorbose. Todos estes isolados diferiram das descrições padrão para as espécies (MEYER *et al.*, 1998; FELL & STATZELL-TALLMAN, 1998; KURTZMAN, 1998). *Candida cantarelii*-similar obtida do fermento da destilaria Lapinha não assimilou sorbose e trealose, e cresceu a 37° C, diferindo da descrição padrão para a espécie (MEYER *et al.*, 1998). Na destilaria Brumado velho, *P. subpelliculosa*-similar não assimilou xilose e salicina, e assimilou glicerol. Estes isolados diferiram das descrições taxonômicas para as espécies (KURTZMAN, 1998; MEYER *et al.*, 1998). *Kl. apiculata* assimilou glicerol, lactato, succinato e cresceu a 37° C, diferindo da descrição padrão para a espécie (SMITH, 1998).

Dentre as leveduras coletadas durante a entressafra e produção de aguardente, vários isolados foram produtores de micocinas. Das comunidades da entressafra, 27% da

comunidade total na destilaria Lapinha, 18% na Brumado Velho e 12% na Germana produziram toxinas contra as linhagens sensíveis testadas, *C. glabrata* Y-55 (NCYC 366) e *S. cerevisiae* NCYC 1006 (**tabela 3**). A distribuição das leveduras produtoras de micocinas nas três destilarias foi variável em relação ao substrato de isolamento. Enquanto a moenda foi a maior fonte de isolados micocinogênicos na destilaria Lapinha, na destilaria Brumado Velho os mesmos foram obtidos em sua maioria à partir das drosófilas (**tabela 3**). As espécies comuns às três destilarias que apresentaram isolados produtores de micocinas foram *P. anomala* (dornas das três destilarias e moenda das destilarias Germana e Lapinha), *I. orientalis* (drosófilas das destilarias Brumado Velho e Germana) e *S. cerevisiae* (solo das destilarias Brumado Velho e Lapinha). Nenhum isolado micocinogênico foi obtido à partir das drosófilas da destilaria Lapinha e do solo da Germana (**tabela 3**).

Espécies produtoras de micocinas estiveram presentes no mosto fermentado das três destilarias durante diferentes momentos da produção de aguardente. A destilaria Brumado Velho apresentou a maior população de *S. cerevisiae* micocinogênico durante a última fermentação (62,8% da comunidade); a menor população foi registrada na destilaria Lapinha (26% da comunidade). Nas destilarias Brumado Velho e Lapinha foi registrada a presença do biotipo *S. cerevisiae* (trealose negativo) produtor de micocinas, sendo o mesmo predominante na última (22,1% da comunidade total) (**tabela 4**).

Durante a produção do fermento, a destilaria Brumado Velho apresentou a maior porcentagem de leveduras micocinogênicas (**tabela 4**), sendo os isolados pertencentes às espécies *C. ingens*-similar (27,7% da comunidade), *Cr. albidus* var. *albidus* (3,02% da população) e *K. lactis* var. *lactis* (1,38% da população) (**tabela 4**); na destilaria Lapinha, linhagens de *C. famata* e *S. cerevisiae* foram produtoras de micocinas, na porcentagem de 0,07% e 11,33% da comunidade total, respectivamente. Na destilaria Germana, somente uma pequena porcentagem de linhagens pertencentes à espécie *S. cerevisiae* foram micocinogênicas representando 0,06% da comunidade total (**tabela 4**).

Na primeira fermentação, isolados de *S. cerevisiae*, representando 27,76% da comunidade de leveduras na destilaria Germana foram produtores de micocinas (sendo que

2,96% estavam presentes nas dornas onde foi utilizado o fermento A, e 24,8% nas dornas onde foi utilizado o fermento B) (**tabela 4**) ; na Lapinha, 82,2% da comunidade total de leveduras, representada por isolados de *S. cerevisiae*, foram produtoras de micocinas. Na destilaria Brumado Velho, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* (trealose negativa) e *S. exiguus* foram as espécies que apresentaram linhagens micocinogênicas, totalizando 40,8% da comunidade (**tabela 4**). Alguns dos isolados de *S. cerevisiae* produtores de micocinas foram predominantes nas dornas das três destilarias durante a fermentação. Durante a última fermentação, uma linhagem micocinogênica na Brumado Velho, duas na Lapinha e três na Germana, foram predominantes no mosto. Somente no fermento A da Germana houve a predominância de linhagens de *S. cerevisiae* micocinogênicas (três linhagens). Na primeira fermentação, uma linhagem micocinogênica na Germana e duas na Brumado Velho foram predominantes. As diferenças entre as destilarias quanto à produção de micocinas pelas linhagens não foram estatisticamente significativas (Teste Qui-Quadrado).

A resistência às concentrações de 5%, 8% e 10% de etanol de todos os isolados foi testada, e os resultados mostram que a mesma foi menor entre as leveduras isoladas durante a entressafra (**gráfico 1**) do que entre aquelas isoladas do mosto (**gráfico 2 A, B e C**). Para as leveduras da entressafra, a maior porcentagem de isolados resistentes a 5% de etanol foi obtida na destilaria Germana (80,9%), e a menor, na destilaria Brumado Velho (62,1%). Nessa última destilaria foram registradas ainda as maiores porcentagens de resistência às concentrações de 8% e 10% de etanol. As destilarias cujos isolados apresentaram menor resistência a 8% e 10% de etanol foram Lapinha (43,4%) e Germana (21,4%), respectivamente (**gráfico 1**).

Nos testes de resistência ao etanol feitos com as leveduras isoladas do período de produção, os resultados obtidos nas destilarias Brumado Velho e Germana foram semelhantes na última fermentação; nas duas destilarias 100% das leveduras foram resistentes às três concentrações de etanol utilizadas. Na Lapinha, 26%, 25,4% e 17% das leveduras foram resistentes a 5%, 8% e 10% de etanol, respectivamente (**gráfico 2 A**).

Das leveduras isoladas do fermento, aquelas pertencentes à destilaria Brumado Velho mostraram-se menos resistentes ao etanol, uma vez que somente 27,8% da população foram resistentes à concentração de 5%, e 24,5% foram resistentes a 10% de etanol. Na destilaria Germana, os resultados mostraram-se bem diferentes para as leveduras isoladas dos dois fermentos produzidos; aquelas obtidas à partir do fermento A apresentaram percentagens de resistência ao etanol muito superiores às daquelas obtidas à partir do fermento B, para as concentrações de 8% e 10% de etanol. Na concentração de 8% de etanol, 100% das leveduras do fermento A apresentaram crescimento, contra 47% das leveduras do fermento B; essa diferença foi maior na concentração de 10%, onde 70,7% das leveduras do fermento A apresentaram crescimento, e só 11,7% das leveduras do fermento B. Na destilaria Lapinha as percentagens de resistência a 5% e 8% de etanol foram iguais (100%), sendo que esse valor foi reduzido para 54% quanto ao crescimento na presença de 10% de etanol (**gráfico 2 B**).

Durante a primeira fermentação 100% dos isolados da Lapinha cresceram a 8% e 82,5% cresceram a 10% de etanol. Na destilaria Brumado Velho, as percentagens de crescimento foram iguais para as concentrações de 8% e 10% (84,9%). Na destilaria Germana as percentagens de crescimento foram semelhantes para as três concentrações de etanol utilizadas no caso do fermento A; no fermento B, 99,9% da comunidade foi resistente a 5% e 8% de etanol, enquanto 86,20% foi resistente a 10% de etanol (**gráfico 2 C**). As diferenças quanto à tolerância ao etanol pelas leveduras isoladas das três destilarias não foram estatisticamente significativas (Teste Qui-Quadrado).

A **figura 1** mostra a localização dos cromossomos no padrão de *S. cerevisiae* utilizado (BIO Rad - Y 265). Trinta e oito linhagens de *S. cerevisiae*, coletadas durante o período de produção e entressafra, foram submetidas à análise de cariótipo. Desse total, nove isolados foram coletados na destilaria Brumado Velho, 13 na Germana e 16 na Lapinha. Os resultados mostraram que essas linhagens possuíam perfis moleculares diferentes entre si (**figuras 2, 3 e 4**). A variação do padrão de cromossomos foi observada tanto entre linhagens de destilarias diferentes quanto entre linhagens de uma mesma destilaria, sendo que nesse caso a variação ocorreu também entre as populações predominantes em uma mesma dorna. Linhagens isoladas da última e primeira fermentação

não mostraram cariótipo igual em nenhuma das três destilarias (**figuras 2, 3 e 4**). Os cariótipos das linhagens isoladas dos fermentos não foram iguais aos das linhagens da última ou da primeira fermentação em nenhuma das destilarias. Os isolados obtidos à partir do solo (**canaleta 6 da figura 2; canaletas 10 e 11 da figura 4**) e moenda (**canaleta 12 da figura 4**) durante a entressafra mostraram cariótipos diferentes daqueles observados nas demais linhagens de *S. cerevisiae*, inclusive daquelas isoladas durante a produção. Nas três destilarias a variação maior entre o padrão de bandas ocorreu nas regiões dos cromossomos de menor peso molecular; variações a nível dos cromossomos VI e I foram frequentes, enquanto no cromossomo IX estas foram raras (**figuras 2, 3 e 4**). As fotos dos géis encontram-se no **ANEXO II**.

Tabela 3 - Frequência de isolamento de leveduras produtoras de micocinas (toxinas "killer") durante o período de entressafra em três destilarias de aguardente

Substratos	Espécies	Número de Isolados Micocinogênicos		
		Brumado		
		Velho	Germana	Lapinha
Dornas	<i>Candida famata</i>	-	-	1 (4%) ¹
	<i>Cryptococcus. albidus</i> var. <i>albidus</i>	-	-	2 (8%)
	<i>Pichia anomala</i>	1 (14,2%)	2 (20%)	1 (4%)
Moenda	<i>C. suecica</i> similar	1 (5,8%)	-	-
	<i>C. valdiviana</i>	-	-	1 (4,3%)
	<i>Cr. albidus</i> var. <i>albidus</i>	-	-	4 (17,3%)
	<i>Cr. terreus</i> similar	-	-	1 (4,3%)
	<i>P. anomala</i>	-	2 (15,3%)	2 (8,6%)
	<i>P. guilliermondii</i>	1 (5,8%)	-	-
	<i>P. subpelliculosa</i>	-	1 (7,6%)	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	1 (4,3%)
Drosófilas	<i>C. apicola</i>	1 (3,7%)	-	-
	<i>C. guilliermondii</i>	1 (3,7%)	-	-
	<i>C. stellata</i>	1 (3,7%)	-	-
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	1 (3,7%)	-	-
	<i>I. orientalis</i>	1 (3,7%)	1 (4,3%)	-
	<i>P. farinosa</i>	-	1 (4,3%)	-
	<i>P. kluyveri</i>	3 (11,1%)	-	-
	<i>P. membranifaciens</i>	2 (7,4%)	-	-
Solo	<i>P. sydowiorum</i>	-	-	1 (33,3%)
	<i>S. cerevisiae</i>	1 (20%)	-	1 (33,3%)
Total		14 (18%)	7 (12%)	15 (27%)

¹ Porcentagem dos isolados micocinogênicos em relação ao total de isolados de cada substrato.

Tabela 4 - Frequência de isolamento de leveduras produtoras de micocinas durante o período fermentativo em três destilarias de aguardente

Período	Espécies	População de leveduras micocinogênicas (U.F.C x 10 ⁸)		
		B. Velho	Germana	Lapinha
Última Fermentação	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10,3(61,78%) ¹	0,13 (33,3%)	0,2 (3,9%)
	<i>S. cerevisiae</i> (trealose negativa)	0,14(1,02%)	-	2,28 (22,1%)
Fermento	<i>Candida famata</i>	-	-	0,001 (0,07%)
	<i>C. ingens</i> -similar	0,1 (27,7%)	-	-
	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	0,10(3,02%)	-	-
	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	0,05 (1,38%)	-	-
	<i>S. cerevisiae</i>	-	0,01 (0,06%)	0,01 (11,3%)
Primeira Fermentação	<i>S. cerevisiae</i>	0,84 (21,6%)	20,9(27,76%)	2,7(82,2%)
	<i>S. cerevisiae</i> (trealose negativa)	0,002 (0,06%)	-	-
	<i>S. exiguus</i>	0,75 (19,2%)	-	-

¹ Porcentagem da população produtora de micocinas em relação à comunidade total de leveduras.

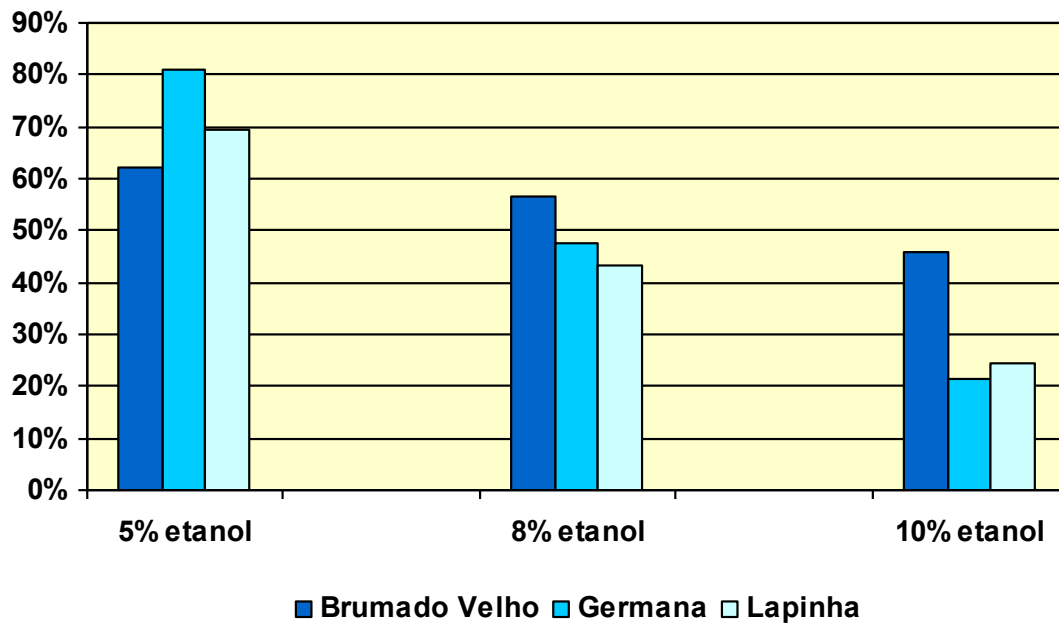
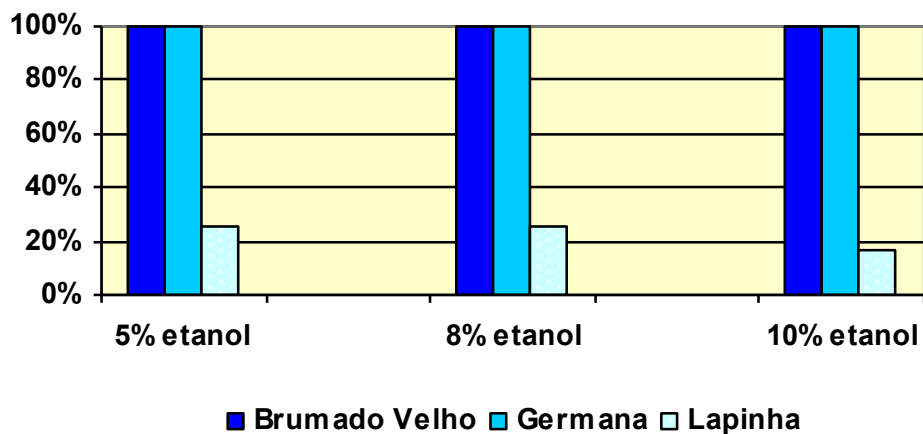
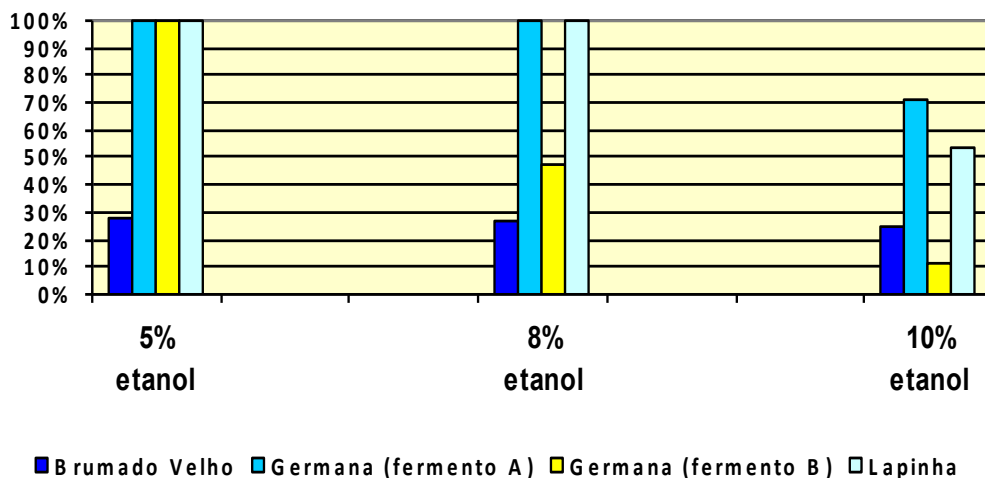


Gráfico 1 - Resistência ao etanol das linhagens isoladas durante o período de entressafra

A) Última fermentação



B) Fermento



C) Primeira fermentação

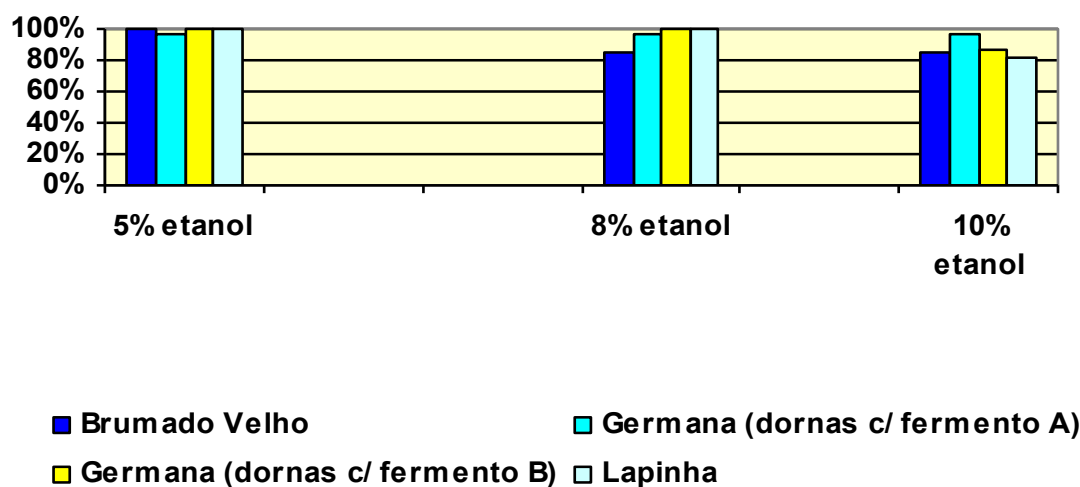


Gráfico 2 - Resistência ao etanol das linhagens isoladas durante o período de produção

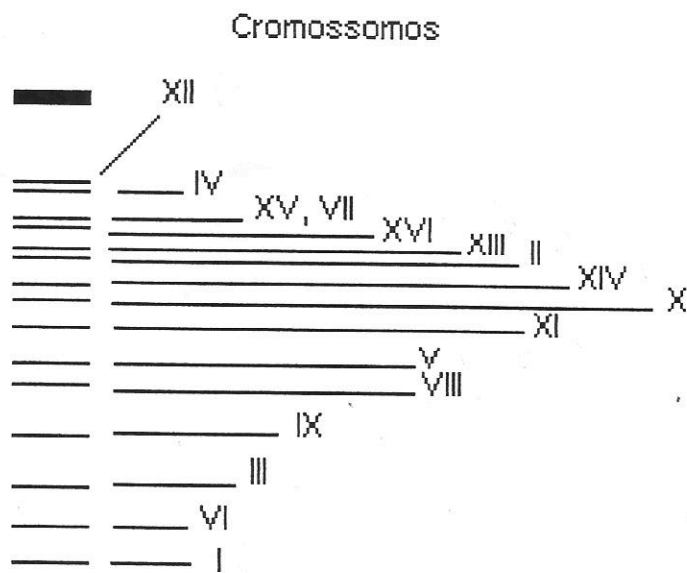


Figura 1 - Localização dos cromossomos no padrão de *Saccharomyces cerevisiae* utilizado (BIO Rad - Y 265).

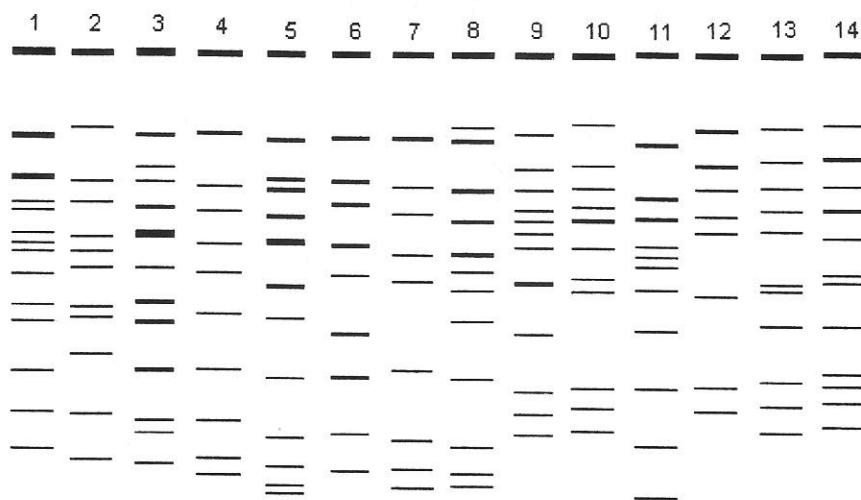


Figura 2 - Cariótipo das linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da destilaria Germana - Padrão *S. cerevisiae* BIO-Rad (canaleta 1); linhagens isoladas do mosto fermentado durante a última fermentação de 1996 (canaletas 2 a 6); linhagens isoladas dos fermentos A e B (canaletas 7 e 8, respectivamente); linhagens isoladas durante a 1ª fermentação de 1997 das dornas com fermento A (canaletas 9 a 11) e B (canaletas 12 a 14). Condições de corrida: 180 V, pulsos de 140" a 20" por 40h, e 75" a 15" por 7h, agarose (Seakean) 1%, em tampão TBE 0,5 X a 6,5° C.

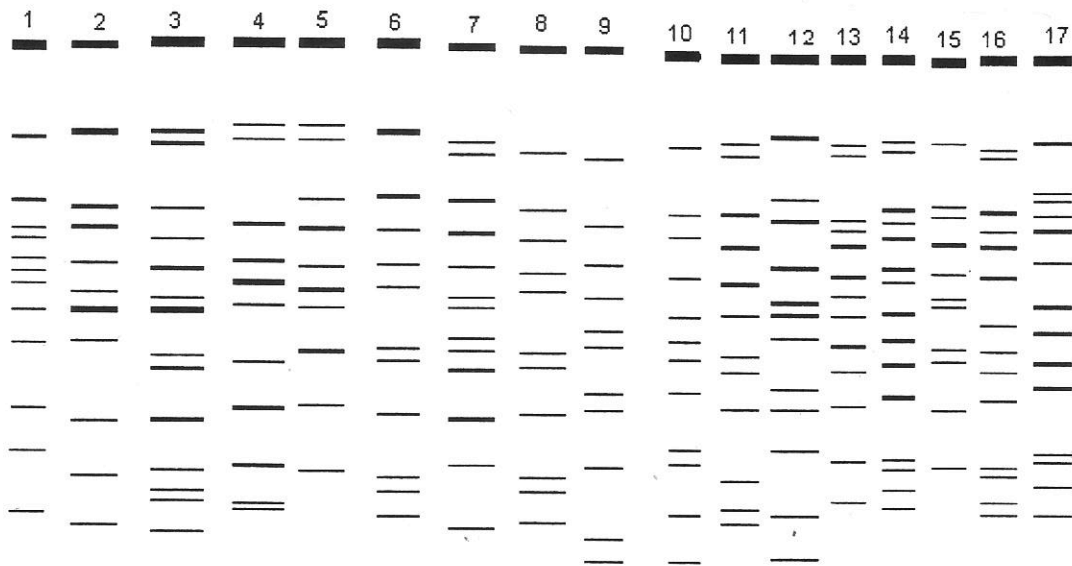


Figura 3 - Cariótipo das linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da destilaria Lapinha - Padrão *S. cerevisiae* BIO-Rad (canaleta 1); linhagens isoladas do mosto fermentado durante a última fermentação de 1996 (canaletas 2 a 9); linhagens isoladas do solo (canaletas 10 e 11) e moenda (canaleta 12) durante a entressafra; linhagens isoladas do fermento (canaletas 13 e 14); linhagens isoladas do mosto fermentado durante a 1ª fermentação de 1997 (canaletas 15 a 17). Condições de corrida: 180 V, pulsos de 140" a 20" por 40h, e 75" a 15" por 7h, agarose (Seakean) 1%, em tampão TBE 0,5 X a 6,5° C.

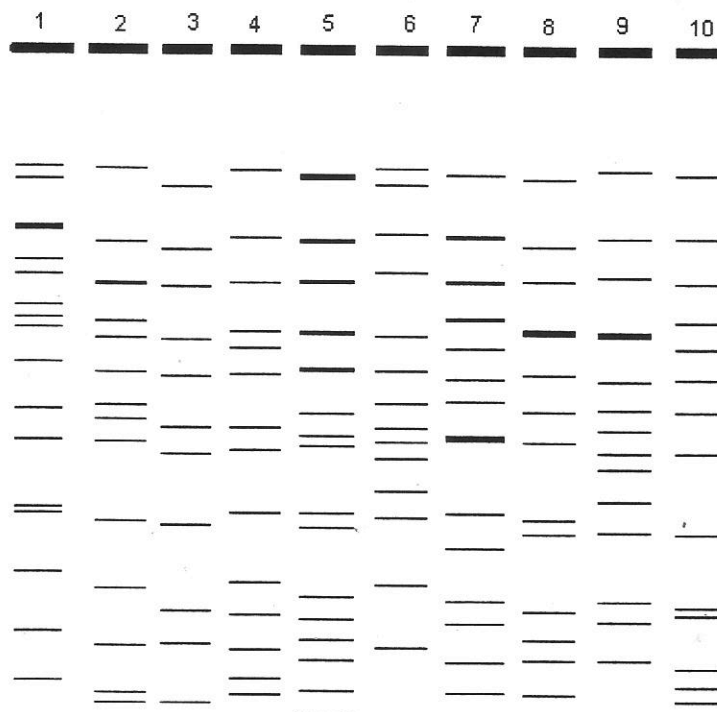


Figura 4 - Cariótipo das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas na destilaria Brumado Velho - Padrão *S. cerevisiae* BIO-Rad (canaleta 1); linhagens isoladas no mosto fermentado durante a última fermentação de 1996 (canaletas 2 a 5); linhagem isolada do solo durante a entressafra (canaleta 6); linhagens isoladas do mosto fermentado durante a 1ª fermentação de 1997 (canaletas 7 a 10). Condições de corrida: 180 V, pulsos de 140" a 20" por 40h, e 75" a 15" por 7h, agarose (Seakean) 1%, tampão TBE 0,5 X a 6,5° C.

ESPÉCIES	ÚLTIMA FERMENTAÇÃO (1996)	PERÍODO DE ENTRESSARFRA					FERMENTO	PRIMEIRA FERMENTAÇÃO (1997)
		DORNAS	MOENDA	SOLO	DROSÓFILA	CANA		
							-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	-	-	-	-	-	-	13 x 106	-
<i>Pichia</i> sp. 1	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>P. anomala</i>	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>P. burtonii</i> -similar	-	4	3	-	-	-	-	-
<i>P. guilliermondii</i>	-	1	-	-	-	-	11 x 106	-
<i>P. guilliermondii</i> -similar	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. heimii</i>	-	1	1	-	-	-	-	-
<i>P. kluyveri</i>	-	-	-	-	-	-	83 x 106	-
<i>P. norvegensis</i> -similar	-	-	-	-	-	-	16 x 106	-
<i>P. ofunaensis</i> -similar	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>P. sydowiorum</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>P. mucosa</i> -similar	45 x 106	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 2	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	-	1	1	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	565 x 106	-	1	2	-	-	27 x 106	1373 x 106
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-	-	-	-	1	-	-

Tabela 2 - Espécies de leveduras isoladas na destilaria Lapinha durante os períodos de entressafra e produção de aguardente

Espécies	Dornas	Moenda	Solo	Drosófilas	Cana	Última fermentação/96	Fermento	Primeira fermentação/97
						Unidades formadoras de colônias (U.F.C)/ml		
<i>Candida berthetii</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>C. cantarelli</i> -similar	-	-	-	-	-	-	5 x 10 ⁶	-
<i>C. citrea</i>	-	-	-	-	-	-	53 x 10 ⁶	-
<i>C. dattila</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	1	1	-	-	-	-	1 x 10 ⁶	-
<i>C. glabrata</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	1	1	-	1	-	-	-	-
<i>C. ingens</i> -similar	-	1	-	-	-	-	300 x 10 ⁶	-
<i>C. kefir</i>	1	-	-	-	-	-	-	427 x 10 ⁶
<i>C. kefir</i> -similar	-	-	-	-	-	16 x 10 ⁶	-	-
<i>C. krusei</i>	2	4	-	-	-	-	10 x 10 ⁶	-
<i>C. magnoliae</i>	2	-	-	-	-	-	30 x 10 ⁶	-
<i>C. rhagii</i> -similar	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sake</i>	-	-	-	-	-	-	0,2 x 10 ⁶	-
<i>C. stellata</i>	-	2	-	2	-	0,2 x 10 ⁶	-	-
<i>C. valdiviana</i>	1	2	-	-	-	-	-	-
<i>Cr. albidus</i> var. <i>albidus</i>	3	5	-	-	-	-	13 x 10 ⁶	-
<i>Cr. albidus</i> var. <i>albidus</i> - similar	2	-	-	-	-	34 x 10 ⁶	-	-
<i>Cr. dimennae</i>	-	-	-	-	-	9 x 10 ⁶	-	-
<i>Cr. kuetzingii</i>	-	-	-	-	-	-	11 x 10 ⁶	-
<i>Cr. kuetzingii</i> -similar	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Cr. laurentii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cr. terreus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	1	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 – continuação

	Dornas	Moenda	Solo	Drosófilas	Cana	Última fermentação/96	Fermento	Primeira fermentação/97
Espécies								
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilorum</i>	-	-	-	-	-	-	83 x 10 ⁶	-
<i>Pichia</i> sp. 1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. anomala</i>	4	3	1	-	-	-	-	-
<i>P. burtonii</i> -similar	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. guilliermondii</i>	1	1	-	-	-	-	16 x 10 ⁶	-
<i>P. guilliermondii</i> -similar	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. kluyvery</i>	-	-	-	-	-	-	888 x 10 ⁶	-
<i>P. heimii</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. mucosa</i> -similar	-	-	-	-	-	9 x 10 ⁶	-	-
<i>P. norvegensis</i> -similar	-	-	-	-	-	-	17 x 10 ⁶	-
<i>P. ofunaensis</i> -similar	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. sydowiorum</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 2	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Rh. minuta</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	1	2	-	-	565 x 10 ⁶	27 x 10 ⁶	1373 x 10 ⁶
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-

Tabela 3 - Espécies de leveduras isoladas na destilaria Lapinha durante os períodos de entressafra e produção de aguardente

Espécies	Dornas	Moenda	Solo	Drosófilas	Cana	Última fermentação/96	Fermento	Primeira fermentação/97
						Unidades formadoras de colônias (U.F.C)/ml		
<i>Blastobotrys proliferans</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Candida apicola</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>C. fennica</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	2	-	-	1	-	-	10 x 10 ⁶	-
<i>C. norvegensis</i>	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>C. stellata</i>	-	-	-	2	-	0,2 x 10 ⁶	-	-
<i>C. valida</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 1		-	1	-	-	-	-	-
<i>Cr. albidus</i> var. <i>albidus</i>	-	2	-	5	-	-	13 x 10 ⁶	-
<i>Cr. albidus</i> var. <i>albidus</i> -similar	2	-	-	-	-	34 x 10 ⁶	-	-
<i>Cr. dimennae</i>	-	-	-	-	-	9 x 10 ⁶	-	-
<i>Cr. dimennae</i> -similar	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Cr. elinovii</i> -similar	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Cr. flavus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Cr. terreus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	1	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 – continuação

Espécies	Dornas	Moenda	Solo	Drosófilas	Cana	Última fermentação/96	Fermento	Primeira fermentação/97
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	-	-	-	-	-	-	83 x 10 ⁶	-
<i>Pichia</i> sp. 1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. anomala</i>	4	3	1	-	-	-	-	-

<i>P. burtonii</i> -similar	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. guilliermondii</i>	1	1	-	-	-	-	16 x 10 ⁶	-
<i>P. guilliermondii</i> -similar	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. kluyvery</i>	-	-	-	-	-	-	888 x 10 ⁶	-
<i>P. heimii</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. mucosa</i> -similar	-	-	-	-	-	9 x 10 ⁶	-	-
<i>P. norvegensis</i> -similar	-	-	-	-	-	-	17 x 10 ⁶	-
<i>P. ofunaensis</i> -similar	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>P. sydowiorum</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 2	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Rh. minuta</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	1	2	-	-	565 x 10 ⁶	27 x 10 ⁶	1373 x 10 ⁶
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-

GRÁFICO 1 - Perfil de Resistência ao Etanol das Linhagens Isoladas Durante o Período de Entressafra

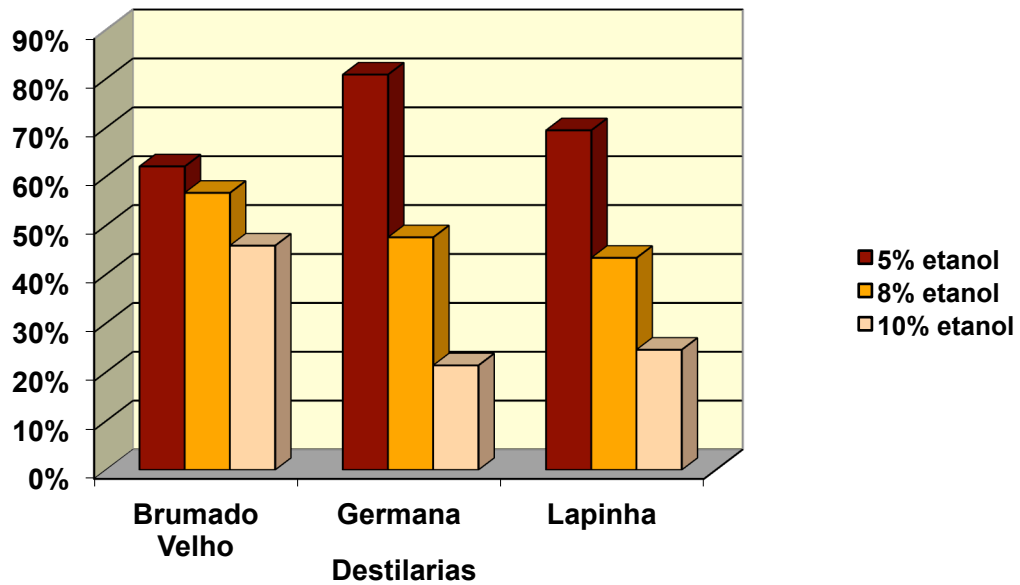
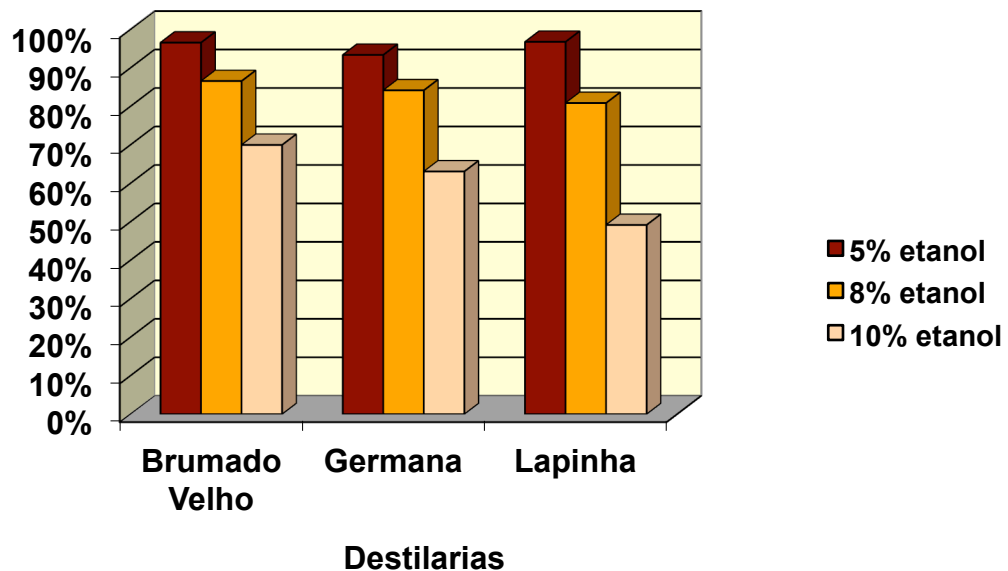


GRÁFICO 2 - Perfil de Resistência ao Etanol das Linhagens Isoladas do Mosto Fermentado



6) Discussão

A ocorrência de leveduras em um determinado habitat está diretamente relacionada aos tipos de compostos metabolizáveis disponíveis e à capacidade de utilização dos mesmos por esses microrganismos. Além disso, fatores como presença de compostos inibitórios, pH, pressão osmótica, temperatura e interação com insetos dispersores também exercem influência sobre a composição da comunidade de leveduras (PHAFF & STARMER, 1987; MORAIS *et al.*, 1992; MORAIS, 1994). A variação das comunidades de leveduras entre os substratos estudados nas três destilarias durante o período de entressafra (**tabela 1**) pode ser decorrente de diversas variáveis. Fatores como diferenças na arquitetura da destilaria, tipo de vegetação presente próxima às mesmas, presença de insetos vetores, e até mesmo variação de temperatura podem ter influenciado na estruturação das comunidades de leveduras. As destilarias Brumado Velho e Germana apresentam algumas características semelhantes no que se refere à localização dos equipamentos das destilarias (moendas, dornas, alambiques). Ambas são próximas a pequenos pomares existentes nas propriedades, e foi possível observar nos mesmos a presença constante de insetos. Os mesmos eram atraídos pelos frutos maduros ou por aqueles presentes no chão, já em processo de decomposição. Flores e frutos são considerados excelentes habitats para leveduras, oferecendo uma sucessão de microhabitats efêmeros durante seu desenvolvimento e deterioração (MORAIS *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1996). *Pichia kluyveri*, *Issatchenkia orientalis* e seu anamorfo *Candida krusei* foram espécies comuns isoladas de flores e/ou frutos maduros tropicais (SANTOS *et al.*, 1996). Isolados dessas espécies foram obtidos a partir dos diferentes substratos nas destilarias (**tabela 1**), sustentando a hipótese de que as leveduras presentes nos pomares podem ter alcançado o ambiente da fermentação por diferentes meios. No estudo sobre comunidades de leveduras envolvidas na produção de tequila, LACHANCE (1995) não obteve dados que comprovassem a atuação dos pomares próximos às destilarias como fonte de leveduras para as dornas. Entretanto, segundo o autor, isso não descarta a possibilidade de que essas plantas possam ser habitats transitórios para drosófilas, permitindo assim, a dispersão das leveduras.

Na destilaria Germana, em um galpão localizado ao lado daquele onde estavam instaladas as dornas e a moenda, periodicamente fazia-se a extração de polpa e preparação de doces de frutas, e foi possível observar durante a realização dessas atividades a presença de um grande número de insetos, principalmente moscas, dentre elas drosófilas. Esses insetos possivelmente atuaram como vetores de leveduras presentes nos frutos do pomar (ou naqueles utilizados para produção de polpa e doce) e aqueles caídos no solo. Vários estudos descrevem o modelo de interação entre drosófilas e leveduras, e mostram que além de serem fonte de nutrientes para esses insetos, estes microrganismos parecem estar envolvidos na estruturação das comunidades dessas moscas (MORAIS *et al.*, 1992; 1996). O perfil fisiológico (fermentação vigorosa de glicose e assimilação de poucos compostos) das leveduras isoladas de drosófilas sugere a preferência dessas moscas por alimentos como frutos (MORAIS *et al.*, 1992). A ocorrência de espécies como *P. membranifaciens*, *I. orientalis* e seu anamorfo *C. krusei*, *Cr. albidus* nas moendas, dornas e solo das destilarias Brumado Velho e Germana (**tabela 1**) pode ser tomada como exemplo da dispersão destas leveduras até as destilarias pelas drosófilas.

No caso da destilaria Lapinha foi grande o número de abelhas e moscas presentes na destilaria. Apesar de não ter sido feito um estudo com abelhas, estas podem ter influenciado na composição das comunidades de leveduras, devido à sua constante presença dentro das dornas e sobre a moenda. Estudos mostram que leveduras como *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *C. guilliermondii*, *Kl. apiculata*, *C. parapsilosis*, *C. magnoliae*, *P. anomala* e *Rhodotorula* spp., presentes em pólen, são dispersadas por abelhas produtoras de mel (GILLIAN, 1979; 1997). Nesta destilaria as dornas não foram pintadas internamente com cal durante o período de entressafra como ocorreu na Brumado Velho e Germana. Este procedimento é geralmente utilizado pelos produtores como uma maneira de limpar as dornas após o término de uma safra. Além disso, na Lapinha as dornas são feitas de madeira e possuem várias reentrâncias, onde células de leveduras ou seus esporos podem permanecer, enquanto na Brumado Velho e Germana as dornas são feitas de aço. Estes dois fatores, juntamente com a presença constante dos insetos nas dornas, podem justificar o maior número de leveduras isoladas desse substrato em comparação com as outras destilarias (**tabela 1**).

Embora a participação de leveduras do gênero *Saccharomyces* em fermentações seja conhecida e bem estudada, a ocorrência desse gênero na natureza é um assunto controverso. Enquanto uma hipótese considera que as espécies de *Saccharomyces sensu stricto* são restritas aos ambientes de fermentação criados pelo homem, outra afirma que a fonte primária dessas leveduras está nas vinícolas, especialmente nas uvas (MARTINI & VAUGHAN-MARTINI, 1995; TÖRÖK *et al.*, 1996). Esses estudos foram realizados a partir de uvas, vinícolas e do mosto fermentado de uva para produção de vinhos. SHEHATA (1959) observou que as leveduras isoladas a partir da cana-de-açúcar e garapa durante a produção de aguardente em São Paulo, eram na maioria espécies pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Torulopsis*. As leveduras isoladas a partir das amostras de cana coletadas durante a entressafra nas três destilarias foram também heterogêneas, sendo a maioria de perfil nutricional amplo, pertencente aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*; leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* não foram isoladas deste substrato (**tabela 1**). A análise da ocorrência de leveduras em drosófilas em florestas tropicais e uvas de vinícolas italianas mostrou a presença de *Saccharomyces cerevisiae* em 1,3% e 0,04% das amostras coletadas, respectivamente (MORAIS *et al.*, 1992; MARTINI & VAUGHAN-MARTINI, 1995). Nesse trabalho, durante o período de entressafra foram obtidos quatro isolados dessa espécie, sendo três do solo e um de moenda (**tabela 1**). SHEHATA (1959) sugere que resíduos de solo presentes na cana podem ser um dos mecanismos que permitem que células de leveduras alcancem os equipamentos das destilarias. Ao contrário do que ocorre nas uvas, a cana-de-açúcar, devido à rigidez de sua casca, não apresenta regiões onde possa ocorrer liberação de caldo, o que favoreceria o desenvolvimento de leveduras; isso pode justificar a ausência de leveduras *Saccharomyces* na superfície da cana.

Considerando que o número de amostras de solo e de "swabs" de moenda foi pequeno (quando comparado aos trabalhos acima, onde 228 amostras de drosófilas e 2000 uvas foram coletadas), o número de isolados de *S. cerevisiae* obtido sugere que nas destilarias de aguardente artesanal essa levedura pode permanecer no solo durante a

entressafra. Com base nesses resultados, pode-se sugerir que no caso das destilarias de aguardente artesanal estudadas as teorias propostas por MARTINI & VAUGHAN-MARTINI (1995) e TÖRÖK *et al.* (1996) são adequadas, uma vez que à partir de um dos equipamentos (moenda) e de um ambiente natural (solo), foram isoladas linhagens de *S. cerevisiae*.

A produção de fermento durou cerca de 15 dias nas destilarias Germana e Lapinha, onde foram feitas duas coletas com um intervalo de sete dias entre cada uma; na destilaria Brumado Velho, o período de produção do fermento foi de sete dias, e apenas uma coleta foi feita algumas horas após a preparação do mesmo. Esse tempo provavelmente não foi suficiente para que fossem criadas nas dornas condições favoráveis ao desenvolvimento de *S. cerevisiae*, o que pode explicar sua ausência no fermento da destilaria Brumado Velho (**tabela 2**). Por outro lado, há a possibilidade de que no momento da coleta *S. cerevisiae* estivesse presente nas dornas em populações muito menores que as das outras espécies, o que impossibilitou seu isolamento.

Na destilaria Germana foram preparados dois tipos de fermento, que só tinham como ingrediente comum o caldo de cana. Foram feitas duas coletas de cada um dos fermentos, entretanto, no caso do fermento A, não houve crescimento de microrganismos na primeira coleta. Como durante a preparação do fermento A um dos ingredientes foi acrescentado após cozimento, com temperatura ainda muito alta, é possível que a maior parte das leveduras presentes no caldo de cana e demais ingredientes tenham sido mortas. Na segunda coleta deste fermento foram isoladas as espécies *K. lactis* var. *drosophilarum* e *S. cerevisiae* (**tabela 2**). A presença de somente duas espécies neste fermento pode significar que o ingrediente utilizado na preparação (cuja quantidade de amido é grande) exige maior tempo para ser degradado e assimilado do que aqueles utilizados no fermento B, ou que seja necessária a hidrólise do substrato por bactérias para que o mesmo torne-se disponível para as leveduras. O número de espécies de leveduras isoladas do fermento B foi maior, (**tabela 2**) o que pode ter sido consequência de dois fatores: um dos ingredientes utilizados na preparação deste fermento foi maltado, o que pode ter ocasionado uma assimilação mais rápida dos nutrientes do que aquela ocorrida no fermento A, ou ser apenas

resultado do fato de que nas duas coletas do fermento B foram obtidas leveduras, ao contrário do que ocorreu no fermento A (tabela 2).

Na destilaria Lapinha, o fermento foi produzido em recipientes de plástico que permaneceram em um local onde a moagem de cana era constante, para preparação de outros produtos; posteriormente, esse fermento foi transferido para as dornas onde seria realizada a primeira fermentação. O grande número de espécies presentes no fermento durante todo o período de sua preparação pode ter sido resultante da constante moagem de cana próximo aos recipientes com fermento, uma vez que esse processo atrai diversos insetos que podem ter atuado como vetores de leveduras.

A produção da aguardente inicia-se quando o caldo de cana-de-açúcar é adicionado ao fermento (pé-de-cuba) previamente preparado. À partir da inoculação do caldo de cana nas dornas, instala-se um processo seletivo, onde geralmente somente espécies de leveduras com habilidade fermentativa poderão utilizar o caldo como fonte de nutrientes, devido às altas concentrações de açúcares. A quantidade de etanol torna-se maior com o desenvolver do processo de fermentação, até atingir concentrações toleradas somente por um número restrito de espécies. LACHANCE (1995) sugere que o aumento progressivo da concentração de etanol é provavelmente o fator mais importante na formação da comunidade de leveduras fermentativas. Na produção de vinhos, por exemplo, estudos mostram que *Kloeckera apiculata* é a levedura predominante nas uvas e mosto no início da fermentação; entretanto, devido a sua baixa tolerância ao etanol, esta espécie é completamente substituída por *S. cerevisiae* à medida em que o processo fermentativo desenvolve-se (ROSINI *et al.*, 1982). *Saccharomyces cerevisiae* é descrita como uma espécie resistente a altas concentrações de etanol e açúcar, elevadas temperaturas e baixos valores de pH (D'AMORE & STEWART, 1987). Somados, esses fatores possibilitam o crescimento e adaptação dessa levedura a ambientes onde essas condições sejam encontradas, como em fermentações. Segundo FLEET & HEARD (1993), essas características são mais acentuadas nas linhagens de *S. cerevisiae* indígenas presentes na fermentação espontânea do que naquelas linhagens selecionadas que são inoculadas. Essas características podem explicar a ocorrência de *S. cerevisiae* como única espécie nas dornas

das destilarias Brumado Velho e Germana e espécie predominante na destilaria Lapinha durante a última fermentação e sua predominância durante a primeira fermentação nas três destilarias (**tabela 2**). Estes resultados estão de acordo com diversos outros na literatura obtidos à partir de estudos sobre processos fermentativos para produção de bebidas (SANNI & LONNER, 1993; LACHANCE, 1995; MORAIS *et al.*, 1997).

A ocorrência de espécies como *C. kefir*-similar, *C. citrea*, *C. stellata*, *Cr. albidus*, *Cr. dimennae* e *P. mucosa*-similar no mosto fermentado, como no caso daquelas encontradas na destilaria Lapinha (**tabela 2**) pode representar uma microbiota transitória presente nas dornas durante a realização da coleta. Essas leveduras podem alcançar o mosto através de diferentes vetores como insetos, correntes aéreas, caldo de cana e utensílios utilizados nas destilarias. O contato dos trabalhadores das destilarias com o mosto é também um fator importante a ser considerado quando se fala em transporte de leveduras, pois já foi verificado que durante a produção de vinhos, espécies encontradas no mosto fermentado estavam presentes também nas mãos dos trabalhadores (MARTINI & VAUGHAN-MARTINI, 1995).

As linhagens de leveduras obtidas na entressafra que mostraram tolerância ao etanol podem ocorrer no mosto como parte de uma biota transitória. *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie relacionada à fermentação apontada como a mais resistente a altas concentrações de etanol. Linhagens desta espécie utilizadas em bebidas africanas foram resistentes a concentrações de até 18% de etanol (EZEUGU & EMERUWA, 1993). As maiores percentagens de resistência ao etanol foram observadas onde *S. cerevisiae* ocorreu como espécie única ou como população predominante, como na última fermentação das destilarias Brumado Velho e Germana (**gráfico 2**). A presença de populações de leveduras não adaptadas à fermentação durante a última fermentação na destilaria Lapinha provavelmente foi responsável pelos índices mais baixos de tolerância ao etanol observados (**gráfico 2 e tabela 2**). Os estudos de LACHANCE (1995) em uma destilaria produtora de tequila e PATARO *et al.* (1998) em destilaria de aguardente artesanal apontam as populações de *S. cerevisiae* como as mais tolerantes ao etanol. O processo fermentativo

certamente exerce uma pressão seletiva sobre a comunidade de leveduras, fazendo com que linhagens pertencentes esta espécie sobressaiam.

A produção de micocinas por populações de leveduras isoladas na entressafra provavelmente auxiliou as mesmas na ocupação dos microambientes estudados em cada destilaria. Isolados de *P. anomala*, *K. lactis* var. *drosophilorum*, *C. ingens*-similar, *C. famata* e *Cr. albidus* foram obtidos a partir de diferentes substratos durante a entressafra (**tabela 1**) e diferentes períodos durante a produção da aguardente (**tabela 2**). É importante ressaltar, entretanto, que em ambientes como o mosto fermentado, essa característica não oferece vantagem significativa, uma vez que linhagens micocinogênicas não adaptadas às condições de fermentação são rapidamente substituídas. É possível concluir, portanto, que a produção de micocinas não é um fator determinante na comunidade fermentativa (LACHANCE, 1995), a menos que esteja associado a outras características (resistência ao etanol, a altas concentrações de açúcares, entre outros), o que pode explicar a predominância de algumas populações de *S. cerevisiae* produtoras de micocinas durante a fermentação.

A variação do perfil molecular de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas tem sido descrita na literatura por diversos trabalhos (QUEROL *et al.*, 1992; BIDENNE *et al.*, 1992; LONGO & VEZINHET, 1993; MORTIMER *et al.*, 1994; CARDINALI & MARTINI, 1994; GUILLAMÓN *et al.*, 1996; NADAL *et al.*, 1996; CAVALIERI *et al.*, 1998). Segundo BRIONES *et al.* (1996), a análise do cariótipo pode oferecer uma visão mais detalhada da ecologia de *S. cerevisiae* durante a fermentação espontânea. Os resultados mostram que linhagens de *S. cerevisiae* obtidas da produção de vinho são caracterizadas por um grande polimorfismo do DNA cromossomal. Os mecanismos que levam a esse polimorfismo ainda não são totalmente conhecidos, mas sugere-se que hibridizações ou outros mecanismos interespecíficos sejam responsáveis pela variação (BIDENNE *et al.*, 1992; LONGO & VEZINHET, 1993). Este polimorfismo descrito para linhagens isoladas de mosto de vinho foi observado também nas linhagens de *S. cerevisiae* isoladas durante diferentes períodos de produção de aguardente e período de entressafra (**figuras 2, 3 e 4**). Linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de uma mesma dorna

durante a fermentação do caldo de cana apresentaram variação no padrão das bandas de cromossomos (**figuras 3 e 4**). O polimorfismo dentro de uma mesma dorna foi observado também por BRIONES *et al.* (1996) na análise do cariótipo de *S. cerevisiae* isolada do mosto de uva. Segundo LONGO & VEZINHET (1993), o rearranjo entre os cromossomos durante a mitose não é um evento raro, o que pode levar ao polimorfismo das linhagens; além disso, o caráter diplóide das linhagens pode levar a uma perda ou rearranjo das bandas. Bandas de cromossomos mais intensas foram observadas em algumas linhagens isoladas nas três destilarias de aguardente (**figuras 2, 3 e 4**). Segundo TÖRÖK *et al.* (1993), essas bandas podem ser resultantes da co-migração de cromossomos não separados, ou aneuploidia/ poliploidia de um grupo de cromossomos. O polimorfismo entre as linhagens de *S. cerevisiae* foi mais acentuado entre os cromossomos menores. A explicação sugerida por TOROK *et al.* (1993) para o polimorfismo nessa região é que cromossomos menores têm uma maior frequência de recombinação, e portanto, estão sujeitos a mudanças evolucionárias em uma maior taxa do que os cromossomos de maior peso.

Segundo MORTIMER *et al.* (1994), a propagação contínua de linhagens estaria associada com o acúmulo de danos genéticos que incluem mutações e perda de funções de genes relacionados à fermentação. Linhagens diplóides poderiam acumular mutações recessivas e produzir diferentes tipos de esporos, sendo que esses poderiam originar linhagens com características mais favoráveis que a parental, que seria então substituída. Para NADAL *et al.* (1996), os cariótipos variados são resultado da existência de diversas linhagens de leveduras geneticamente similares na micobiota natural; essas linhagens podem ser interpretadas como subpopulações geneticamente isoladas com traços genéticos distintos, cada uma ocorrendo em microambientes específicos, como solo ou plantas. No caso da aguardente, o caráter artesanal da produção (onde o espaço físico do processo fermentativo é aberto e medidas de assepsia não são tão rigorosas) provavelmente favorece o contato das subpopulações de *S. cerevisiae* presentes em diferentes microambientes com o mosto. A cana, por exemplo, não é lavada antes da moagem, o que pode facilitar o contato entre as leveduras presentes nas partículas de solo que acompanham a cana e o mosto, através do caldo. Uma vez que o ciclo fermentativo para produção de aguardente

(cuja duração é de aproximadamente 24 horas) é bem menor que o da produção de vinho, o número de gerações de leveduras produzidas é maior, o que aumenta a chance de ocorrência de diferentes tipos de mutações, rearranjos ou perda de genes. Em conjunto, estes fatores podem justificar a grande variação molecular apresentada pelas leveduras isoladas durante o processo fermentativo para produção da aguardente artesanal.

As diferenças entre os perfis moleculares das linhagens de *S. cerevisiae* isoladas durante a última fermentação de 1996 e a primeira fermentação de 1997 sugere que as populações desta espécie predominantes no final da safra (1996) não foram responsáveis pelo reinício do processo fermentativo na safra seguinte (1997). As populações de *S. cerevisiae* predominantes no fermento não apresentaram cariótipo igual ao de nenhuma das linhagens isoladas na última ou na primeira fermentação nas três destilarias. Esses resultados sugerem que as populações predominantes no fermento (assim como aquelas isoladas na última fermentação) não são necessariamente as responsáveis pelo início do processo fermentativo quando a produção é retomada.

7) Conclusões

- *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie predominante no mosto fermentado durante a última fermentação de 1996 e a primeira fermentação de 1997 nas três destilarias de aguardente estudadas. Durante a preparação do fermento ("pé-de-cuba"), *S. cerevisiae* foi a espécie predominante nas destilarias Germana e Lapinha;
- A predominância de *S. cerevisiae* em determinados períodos da produção de aguardente pode ser resultante da soma de fatores como produção de micocinas associada a tolerância a altas concentrações de etanol;
- Durante o período de entressafra foram obtidas quatro linhagens de *S. cerevisiae*, sendo três isoladas à partir do solo e uma à partir da moenda;
- A obtenção de três isolados de *S. cerevisiae* a partir do solo sugere que esse substrato pode ser um dos reservatórios desta espécie durante o período de entressafra;
- As diferenças observadas entre os perfis moleculares das linhagens isoladas na última fermentação de 1996 e na 1ª 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;
- Houve uma grande variação entre os cariótipos das linhagens de *S. cerevisiae* predominantes durante o processo fermentativo para produção de aguardente. Essa variação ocorre entre linhagens isoladas de destilarias diferentes, e entre linhagens isoladas de uma mesma dorna. O caráter artesanal da produção provavelmente favorece o constante desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* diferentes no mosto, levando ao grande polimorfismo de cromossomos obtido neste trabalho;
- No caso das três destilarias de aguardente estudadas, as teorias propostas por TÖRÖK *et al.* (1996) e MARTINI & VAUGHAN-MARTINI (1995) a respeito da ecologia de *S.*

cerevisiae são adequadas, uma vez que linhagens desta espécie foram isoladas à partir do solo e moenda.

8) ABSTRACT

Yeast communities, especially of *Saccharomyces cerevisiae*, were studied during the process of sugar-cane fermentation and production of *aguardente*, and also during the non-productive period (after the end of the fermenting season). Samples were collected from the fermented sugar cane must and from the starter, called "pé-de-cuba", during the period of *aguardente* production. Samples were also collected from the soil, the sugar cane, fruit flies (*Drosophila* spp) and swabs from the equipment, during the non-productive period. The samples were obtained from three different distilleries of *aguardente*, near to the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Samples collections were made at the end of the fermenting season of 1996, during the non-productive period, from the starter "pé-de-cuba", and in the first fermentation of 1997. All yeasts were tested for production of killer toxins and for resistance to different ethanol concentration. The predominant strains of *Saccharomyces cerevisiae* found in the fermented sugar cane must and the strains isolated during the non-productive period were compared by molecular karyotype. *Saccharomyces cerevisiae* was the predominant strain isolated in the fermented sugar cane must at the end of the fermenting season of 1996 and in the first fermentation of 1997, in all three distilleries. During the non-productive period, four strains of *S.cerevisiae* were recovered; three of them were isolated from the soil and the other one from the mill. Yeasts isolated during the process of *aguardente* production were more tolerant to ethanol concentration than the strains isolated during the non-productive period. On the other hand, a higher number of killer toxins-producing strains were isolated during the non-productive period. Electrophoretic karyotype analysis of 38 *S.cerevisiae* strains showed that all of them presented different molecular profiles, including the strains isolated in the same vats. The differences in the molecular profile of the strains isolated at the end of 1996's fermenting season and in the first fermentation of 1997 suggest that the predominant *S.cerevisiae* strains found in 1996 were not the same strains that restarted the fermentation process in 1997, in all three distilleries. None of the *S.cerevisiae* strains isolated during the non-productive period and from the starter presented a molecular karyotype similar to the strains isolated during the beginning of the *aguardente* production. The recovery of *S.cerevisiae* from the

soil and mill suggests that these substrates could be used as microhabitats for the yeasts during the non-productive period in the three distilleries of aguardente.

9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts, characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1990. 810p.
- BERRY, D. R. Microbiological, biochemical and genetic aspects of distilling processes. *Biochemical Society Transactions*, IBBG Meeting, v. 16, p.1079-1081, 1988.
- BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the cromossomal polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gen.*, v. 22, p.1-7, 1992.
- BRIONES, A. I.; UBEDA, J.; GRANDO, M. S. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 28, p.369-377, 1996.
- CARDINALI, G.; MARTINI, A. Electrophoretic kariotypes of strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 44, p.791-797, 1994.
- CAVALIERI, D.; BARBERIO, C.; CASALONE, E.; PINZAUTI, F.; SEBASTIANI, F.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Genetic and molecular diversity in *Saccharomyces cerevisiae* natural populations. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 36, p.45-50, 1998.
- D'AMORE, T.; STEWART, G. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 9, p. 322-330, 1987.

- EZEUGU, L.; EMERUWA, A. C. High level ethanol-tolerance *Saccharomyces* from nigerian palm wine. *Biotechnol. Letters*, v. 15, p.83-86, 1993.
- FELL, J. W. STATZELL-TALLMAN, A. *Cryptococcus* Vuillemin. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1998. p. 742-767.
- FELL, J. W. STATZELL-TALLMAN, A. *Rhodotorula* F. C. Harrison. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1998. p. 800-827.
- FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Yeasts: growth during fermentation. In: FLEET, G. H. *Wine Microbiol. Biotechnol.* Harwood Academic Publ., 1993.
- GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie* v. 34, p.43-53, 1979.
- GILLIAN, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Letters*, v. 155, p. 1-10, 1997.
- GUILLAMÓN, J. M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Appl. Microbiol.*, v. 19, p.122-132, 1996.

- KREGER VAN RIJ, N. J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1984. 1082p.
- KURTZMAN, C. P. *Pichia* E. C. Hansen emend. Kurtzman. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1998. p.273-352.
- KURTZMAN, C. P. & FELL, J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1998. 1035p.
- LACHANCE, M. A. Yeast communities in a tequila fermentation. *Antonie van Leeuwehoek*, v. 68, p.151-160, 1995.
- LACHANCE, M. A. *Kluyveromyces* van der Walt emend. Van der Walt. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1998. p.227-247.
- LONGO, E.; VEZINHET, F. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p.322-326, 1993.
- MAIA, A. B.; PEREIRA, A. J. G.; SCWABE, W.K. *2º Curso de Tecnologia para Produção de Aguardente de Qualidade*. Fundação Christiano Ottoni , 1994. 74p.
- MARTINI, A . Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.*, v. 4, p.165-176, 1993.
- MARTINI, A.; VAUGHAN-MARTINI, A. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* v. 14, p.514-522, 1995.

MEYER, S. A.; AHEARN, D. G.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KREGER VAN RIJ, N.J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1984. p. 585-844.

MEYER, S. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1998. p.454-573.

MIRANDA, L. R. *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer. In: KREGER VAN RIJ, N.J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1984. p.845-872.

MORAIS, P. B. Comunidades de leveduras associadas a *Drosophila* em ecossistemas de florestas tropical e úmida e restingas brasileiras. Rio de Janeiro: UFRJ, 1994. 112p. (Tese, Doutorado em Microbiologia).

MORAIS, P.B.; HAGLER, A. N.; ROSA, C. A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; KLACZKO, L.B. Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Can. J. Microbiol.*, v.38, p.1150-1155, 1992.

MORAIS, P. B.; MARTINS, M. B.; KLACZKO, L. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. & HAGLER, A. N. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p.4251-4257, 1995.

- MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; ABRANCHES, J.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts vectored by *Drosophila quadrum* (Culicoides group) in tropical rain forests. *Rev. Microbiol.*, v. 27, p.87-91, 1996.
- MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World J. Microbiol. Biotechn.*, v. 13, p.241-243, 1997.
- MORTIMER, R.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, M. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *S. cerevisiae* derived from natural fermentation of grape must. *Yeast*, v. 10, p.1543-1552, 1994.
- NADAL, D.; COLOMER, B.; PIÑA, B. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p.1944-1950, 1996.
- PATARO, C. SANTOS, A. ; CORRÊA, S. R.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in a *aguardente* distillery. *Rev. Microbiol.*, v. 29, p.104-108, 1998.
- PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILO-PEIXOTO, M. L.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and karyotype polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strain fermentation in Brazil . 1998.(No prelo).
- PEYNAUD, E. & DOMERQ, S. A review on microecological problems in wine making in France. *Amer. J. Vit. Enol.*,v. 10, p.69-77, 1959.

- PHAFF, H.J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants insects and soil. In: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. *The Yeasts*. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p.123-180.
- QUEROL, A; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p.2948-2953, 1992.
- ROSINI, G.; FREDERICI, F.; VAUGHAN, A. E.; MARTINI, A. Systematics of the species of the genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. *Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol.*, v. 15, p.188-193, 1982.
- SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of yeasts from Nigerian tradicional alcoholic beverages. *Food Microbiol.*, v. 10, p.517-523, 1993.
- SANTOS, E. A; OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. *Rev. Microbiol.*, v. 27, p.33-40, 1996.
- SHEHATA, A. M. el. T. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. *Appl Environ. Microbiol.*, v. 8, p.73-75, 1959.
- SMITH, C. L.; KLCO, S. R.; CANTOR, C. R. Pulse-field electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In: DAVIES, K. E. *Genome analyses*. Washington: IRL press, 1988.
- SMITH, M. TH. *Dekkera* van der Walt. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1998. p. 174-177.

SMITH, M. TH. *Klockera* Janke. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1998. p.580-581.

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, p.990- 997, 1992.

TÖRÖK, T.; ROCKHOLD, D.; KING, A. D. Jr. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 19, p. 63-80, 1993.

TÖRÖK, T.; MORTIMER, R. K.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, M. Quest for wine yeasts - an old story revisited. *J.Ind. Microbiol.*, v. 17, p.303-313, 1996.

VAN DER WALT, J. P. ; YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGER VAN RIJ, N.J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1984. p.45-104.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.*, v. 16, p.113-119, 1993.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier Science Publ. Amsterdam, 1998. p.358-371.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. ; CARDINALI, G. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 63, p.145-156, 1993.

YOUNG, T. W.(1987). Killer yeasts. In: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. *The Yeasts*. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p.131-164.

ANEXO I: Perfil fisiológico das espécies isoladas

	<i>Blatobotrys proliferans</i> (1)*	<i>Candida apicola</i> (2)	<i>Candida berthetii</i> (1)	<i>Candida bombicola</i> (1)	<i>Candida cantarellii</i> - similar (1)	<i>Candida castelli</i> (1)
Assimilação/Morfologia						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	v	-	+	-	-
L-Sorbose	+	-	-	+	-	-
Maltose	+	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	-	+	-	-
Celobiose	-	-	+	-	-	-
Trealose	+	-	-	+	-	-
Lactose	+	-	-	-	-	-
Melibiose	+	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	-	+	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	-	-	-	-	-
D-Arabinose	+	-	-	-	-	-
D-Ribose	+	-	-	-	-	-
L-Ramnose	+	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	-	-	+	+
Eritritol	+	-	-	-	-	-
Ribitol	+	-	-	-	-	-
Galactitol	+	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	-	+	-	-
D-Glucitol	+	+	-	+	-	-
Salicina	+	-	-	-	-	-
2-K-D-Gluconato	-	-	+	+	-	+
Lactato	-	-	+	+	+	-
Succinato	+	-	+w	-	+	-
Citrato	-	-	+	-	-	+
Inositol	+	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	+	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	-	v	+	+	-	-
Cicloheximida 100 ppm	+	-	+	+	-	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	-	+	-	-
37° C	+	-	+	+	+	+
40° C	-	-	+	-	-	-
Fermentação de Glicose	-	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	C	Dr	Dr	D	mosto	Dr

Legenda: moenda (M), *Drosophila* (Dr), dorna (D), solo (S).

* número de isolados obtidos.

	<i>Candida citrea</i> (1)	<i>Candida dattila</i> (1)	<i>Candida dendrica-similar</i> (1)	<i>Candida edax</i> (1)	<i>Candida famata</i> (7)	<i>Candida fennica</i> (1)	<i>Candida glabrata</i> (2)
Assimilação/Morfologia							
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	-	+	+	+	-
L-Sorbose	-	+	-	+	v	-	-
Maltose	-	+	-	+	+	+	-
Sacarose	-	+	-	+	+	+	-
Celobiose	-	-	+	+	+	+	-
Trealose	-	+	-	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	+	-	+	-
Melibiose	-	-	-	+w	v	+	-
Rafinose	-	+	-	+	+	+	-
Melezitose	-	+	-	+	+	+	-
Inulina	-	-	-	-	v,	+	-
Amido Solúvel	-	-	-	+	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	+	-	+	-
L-Arabinose	-	-	-	+	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-	+	+	-	-
D-Ribose	-	-	-	+	-	+	-
L-Ramnose	-	-	-	+	v	+	-
Glicerol	-	-	-	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	+	-	+	-
Ribitol	-	-	-	+	+	+	-
Galactitol	-	-	-	+	v	-	-
D-Manitol	-	+	-	+	+	+	-
D-Glucitol	-	+	-	+	+	+	-
Salicina	-	-	+	+	+	+	-
2-K-D-Gluconato	-	-	-	+	v	+	v
Lactato	-	+	-	+	-	+	+
Succinato	-	+	-	+	+	+	v
Citrato	+	-	-	+	v	+	v
Inositol	-	-	-	+	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	+	-	-	-
Lisina	-	-	+	+	+	+	-
NaCl 10%	-	-	-	-	v	+	-
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	v	+	-
Cicloheximida 1000 ppm	-	+	+	+	v	-	-
37° C	+	-	-	+	+	+	v
40° C	-	-	-	+	-	+	v
Fermentação de Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	mosto	D	S	mosto	M, D, mosto	Dr	M

Assimilação/Morfologia

	<i>Candida guilliermondii</i> (12)	<i>Candida holmii</i> (1)	<i>Candida ingens-similar</i> (2)	<i>Candida insectorum-similar</i>	<i>Candida kefir</i> (3)	<i>Candida krusei</i> (10)	<i>Candida lambica</i> (1)
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	-
L-Sorbose	+	-	+	+	+	-	-
Maltose	+	-	-	+	-	-	-
Sacarose	+	+	-	+	+	-	-
Celobiose	+	-	-	+	+	-	-
Trealose	+	+	-	+	-	-	-
Lactose	-	-	-	+	+	-	-
Melibiose	+	-	-	+	-	-	-
Rafinose	+	+	-	+	-	-	-
Melezitose	+	-	-	+	-	-	-
Inulina	-	-	-	+	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	-	+	+	-	-	+
L-Arabinose	+	-	-	+	-	-	-
D-Arabinose	+	-	-	+	-	-	-
D-Ribose	+	-	-	+	-	-	-
L-Ramnose	v	-	-	+	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	-	v	+
Eritritol	-	-	-	+	-	-	-
Ribitol	+	-	-	+	-	-	-
Galactitol	+	-	-	+	-	-	-
D-Manitol	+	-	+	+	-	-	-
D-Glucitol	+	-	+	+	+w	-	-
Salicina	v	-	+	+	+	-	-
2-K-D-Gluconato	+	+	-	+	v	v	+
Lactato	v	++	-	-	+w	v	+
Succinato	+	++	+	+	-	v	+
Citrato	+	-	+	+	-	v	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	-	+	+	-	+	+
NaCl 10%	v	-	-	-	-	+	-
Cicloheximida 100 ppm	+	-	+	+	-	v	-
Cicloheximida 1000 ppm	+	-	+	+	-	-	-
37° C	+	-	+	+	+	+	+
40° C	v	-	+	+	+	+	-
Fermentação de Glicose	+	++	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	M, Dr, D, mosto	mosto	mosto, M	M	M, D, mosto	M, D, mosto	mosto

	<i>Candida magnoliae</i> (2)	<i>Candida norvegensis</i> (2)	<i>Candida parapsilosis</i> (1)	<i>Candida rhagi-similar</i> (1)	<i>Candida sake</i> (1)	<i>Candida sphaerica</i> (1)
Assimilação/Morfologia						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	+	+	+	+
L-Sorbose	+	-	+	+	+	+
Maltose	-	-	+	+	+	+
Sacarose	+	-	+	+	+	+
Celobiose	-	+	+	-	-	+
Trealose	-	-	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+w	-	-	+	-	+
Melezitose	-	-	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	+	+	-	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	+
D-Ribose	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	+
Glicerol	+	-	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	+	-	-
Ribitol	-	-	+	+	+	+
Galactitol	-	-	+	-	-	+
D-Manitol	+	-	+	+	+	+
D-Glucitol	+	-	+	+	+	+
Salicina	-	+	-	-	+	+
2-K-D-Gluconato	-	-	-	+	+	+
Lactato	-	-	-	-	-	+
Succinato	+	v	+	+	+	+
Citrato	+	v	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
Nitrato	+	-	-	-	-	-
Lisina	-	+	-	+	-	+
NaCl 10%	-	-	+	+	-	-
Cicloheximida 100 ppm	-	+	+	-	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	v	-	-	+	-
37° C	+	-	+	-	-	+
40° C	+	-	-	-	-	-
Fermentação de Glicose	+	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	D	Dr	C	D	mosto	mosto

Assimilação/Morfologia	<i>Candida stellata</i> (9)	<i>Candida suecica</i> -similar (1)	<i>Candida valdiviana</i> (3)	<i>Candida valida</i> (3)	<i>Cryptococcus</i> sp. 1 (1)	<i>Cryptococcus</i> sp. 2 (1)	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i> (20)	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i> -similar (2)
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	+	-	-	+	+	+
L-Sorbose	-	+	+	-	-	+	v	+
Maltose	-	+	+	-	+w	-	+	-
Sacarose	+	+	+	-	+	+	+	+
Celobiose	-	+	+	-	-	+	+	-
Trealose	-	+	+	-	+	+	v	+
Lactose	-	-	-	-	-	+	+	+
Melibiose	-	-	+	-	-	+	v	+
Rafinose	+	-	+	-	-	+	+	v
Melezitose	-	-	+	-	+w	+	v	v
Inulina	-	-	-	-	-	+w	v	v
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	+	-	+w	+	+	+
L-Arabinose	-	-	v	-	-	+	+	v
D-Arabinose	-	-	v	-	-	+w	v	v
D-Ribose	-	-	v	-	-	+	+	v
L-Ramnose	-	-	-	-	-	+	v	v
Glicerol	-	+	+	-	-	+	+	+
Eritritol	-	-	v	-	-	+w	v	v
Ribitol	-	-	v	-	-	+	v	v
Galactitol	-	-	v	-	-	+	+	v
D-Manitol	-	+	+	-	-	-	-	+
D-Glucitol	-	+	+	-	-	+	-	+
Salicina	-	-	+	-	-	+	v	+
2-K-D-Gluconato	-	-	-	+w	-	-	v	v
Lactato	-	-	+	-	-	+w	v	+
Succinato	-	+	+	-	-	+w	v	v
Citrato	-	-	+	-	-	-	v	v
Inositol	-	-	-	-	+	+	+	+
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	+	-	-	-	+	+
Lisina	-	+	+	+	-	-	+	+
NaCl 10%	-	+	v	-	-	-	v	v
Cicloheximida 100 ppm	v	-	-	-	-	-	v	-
Cicloheximida 1000 ppm	v	-	-	-	-	-	v	-
37° C	v	-	+	-	-	-	v	-
40° C	v	-	+	-	+	+	v	+
Fermentação de Glicose	+	+	+	-	-	+	v	v
Cor da colônia	branca	branca	transparente	branca	transparente	branca	branca	branca
Origem	D. Dr. M. mosto	M	M. D	Dr	S	C	D. Dr. M. S	D

Assimilação/Morfologia

	<i>Cryptococcus dimennae</i> (4)	<i>Cryptococcus elinovii</i> -similar (1)	<i>Cryptococcus flavus</i> (1)	<i>Cryptococcus hungaricus</i> -similar (2)	<i>Cryptococcus kuetzingii</i> -similar (3)	<i>Cryptococcus laurentii</i> (4)	<i>Cryptococcus magnus</i> -similar (1)
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-	v	+	-
L-Sorbose	+	+	v	+	v	v	+
Maltose	-	+	+	+	-	+	+
Sacarose	+	-	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	v	+	+	+
Trealose	+	-	+	+	v	+	+w
Lactose	+	+	v	-	-	+	+
Melibiose	+	-	+	v	v	+	-
Rafinose	+	-	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	v	v	v	+w
Inulina	v	+	-	-	-	v	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	v	-
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	-
D-Arabinose	v	-	+	v	-	+	-
D-Ribose	+	-	+	+	v	v	+
L-Ramnose	v	+	v	-	-	+	-
Glicerol	v	+	+	+	v	-	+
Eritritol	v	-	+	v	-	+	-
Ribitol	v	-	+	+	+	+	+
Galactitol	+	-	+	+	+	+	+
D-Manitol	v	-	v	+	v	+	-
D-Glucitol	+	+	+	+	+	v	+
Salicina	+	+	v	+	+	+	+
2-K-D-Gluconato	v	-	+	+	-	v	+
Lactato	v	-	-	v	+	v	-
Succinato	v	+	+	+	v	v	-
Citrato	+	+	+	+	v	v	+
Inositol	+	+	+	-	+	+	+
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	+	-	-	+	-	-
Lisina	+	+	+	-	+	+	+
NaCl 10%	-	+	+	+	v	+	-
Cicloheximida 100 ppm	v	-	+	+	-	v	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	+	-	-	-	+
37° C	+	-	-	+	v	v	+
40° C	v	-	-	-	v	v	+
Fermentação de Glicose	-	-	-	-	-	-	-
Cor da colônia	branca	branca	branca	rosa	branca	transparente	branca
Origem	S	Dr	C	M	M	D	C

Assimilação/Morfologia

	<i>Cryptococcus terreus</i> (1)	<i>Debaryomyces hansenii</i> (1)	<i>Dekkera bruxellensis</i> (1)	<i>Issatchenkia occidentalis</i> (5)	<i>Issatchenkia orientalis</i> (3)	<i>Issatchenkia terricola</i> (1)	<i>Kloeckera apiculata</i> (1)	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilae</i> (7)	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> (7)
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+w	+	+	-	-	-	-	+	+
L-Sorbose	-	v	-	-	-	-	-	-	+
Maltose	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Sacarose	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Celobiose	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Trealose	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Melezitose	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	+	v	-	-	-	-	v	+
L-Arabinose	+	+	-	-	-	-	-	v	-
D-Arabinose	-	+	-	-	-	-	-	v	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	v	+
Glicerol	-	+	-	+	-	+	+	v	-
Eritritol	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	-	-	-	-	-	v	-
Galactitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	-	-	-	-	-	+	+
D-Glucitol	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Salicina	+	+	-	-	-	-	+	v	+
2-K-D-Gluconato	-	+	+	-	-	-	-	v	+
Lactato	-	-	+	+	-	-	+	v	+
Succinato	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Citrato	-	+	-	v	-	+	+	v	+
Inositol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	-	-	-
NaCl 10%	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Cicloheximida 100 ppm	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Cicloheximida 1000 ppm	-	+	-	-	-	-	-	-	-
37° C	+	-	-	+	+	+	+	-	+
40° C	-	-	-	-	+	-	-	v	+
Fermentação de Glicose	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	transparente	branca	branca	branca	branca
Origem	M	M	M	D, M, Dr.	Dr	Dr	mosto	D, Dr	mosto

	<i>Kluyveromyces waltii</i> - similar (3)	<i>Pichia</i> sp 1(1)	<i>Pichia</i> sp 2 (1)	<i>Pichia</i> sp 3 (1)	<i>Pichia</i> sp 4 (1)	<i>Pichia anomala</i> (23)	<i>Pichia burtonii</i> -similar (1)
Assimilação/Morfologia							
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+	+	v	+
L-Sorbose	v	-	+	-	+	-	-
Maltose	-	+	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	-	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	+	+	+
Trealose	-	-	-	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	+	-	-	-	v	-
Melezitose	-	-	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	v	-
D-Xilose	-	-	-	+	+	v	v
L-Arabinose	-	-	-	-	+	v	v
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	v
D-Ribose	-	-	-	-	-	v	-
L-Ramnose	-	-	-	-	+	-	v
Glicerol	v	+	-	+	+	+	v
Eritritol	-	-	-	+	-	+	-
Ribitol	-	-	+	-	+	v	v
Galactitol	-	-	-	-	+	-	-
D-Manitol	+	-	+	+	+	+	+
D-Glucitol	-	-	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	+	-	+	v
2-K-D-Gluconato	-	-	+	+	+	v	v
Lactato	-	+	-	+	+w	+	v
Succinato	-	-	+	+	+	v	+
Citrato	+	-	+	+	+	v	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	+	-	+	+	-
Lisina	-	+	+	+	+	+	-
NaCl 10%	-	-	+	+	-	v	-
Cicloheximida 100 ppm	-	+	+	-	-	-	-
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	+	-	-	-	-
37° C	+	+	-	-	-	+	+
40° C	v	-	-	-	-	v	+
Fermentação de Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	Dr	M	Dr	C	mosto	M, D, S, Dr	D

	<i>Pichia farinosa</i> (1)	<i>Pichia guilliermondii</i> (4)	<i>Pichia guilliermondii</i> - similar (2)	<i>Pichia heimii</i> (3)	<i>Pichia jadinii</i> (1)	<i>Pichia kluyveri</i> (10)
Assimilação/Morfologia						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	-	-
L-Sorbose	-	+	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	-
Sacarose	-	+	+	+	+	-
Celobiose	-	+	+	+	+	-
Trealose	-	+	+	+w	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	+	+	-	-	-
Rafinose	-	+	+	+	+	-
Melezitose	+	+	+	+	+	-
Inulina	-	+	+	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	+	+	+	+	-
L-Arabinose	-	+	+	+	-	-
D-Arabinose	-	+	+	+	-	-
D-Ribose	+	+	-	+	-	-
L-Ramnose	-	+	-	+	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	-
Eritritol	+	-	-	+	-	-
Ribitol	+	+	+	+	-	-
Galactitol	-	-	+	+	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	-
D-Glucitol	-	+	+	+	+	-
Salicina	+	+	+	+	+	-
2-K-D-Gluconato	-	+	+	+	-	-
Lactato	+	-	v	v	+	+
Succinato	-	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	+	-
Lisina	+	+	+	-	+	+
NaCl 10%	-	+	+	+	+	+
Cicloheximida 100 ppm	-	+	+	v	+	-
Cicloheximida 1000 ppm	-	+	+	-	+	-
37° C	-	+	+	+	+	+
40° C	-	+	-	-	+	-
Fermentação de Glicose	+	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	Dr	M, D	D, M	M, D	C	Dr

	<i>Pichia membranifaciens</i> (6)	<i>Pichia mucosa</i> -similar (1)	<i>Pichia nakasei</i> -similar (2)	<i>Pichia norvegensis</i> (4)	<i>Pichia ofunaensis</i> -similar (1)	<i>Pichia subpelliculosa</i> -similar (2)	<i>Pichia sydowniorum</i> (3)
Assimilação/Morfologia							
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	+	-	v
L-Sorbose	-	+	-	-	+	+	v
Maltose	-	+	-	-	+	+	+
Sacarose	-	+	+	-	+	+	+
Celobiose	-	+	-	+	+	-	+
Trealose	-	-	-	-	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	+	+	-
Melibiose	-	v	-	-	+	+	+
Rafinose	-	-	-	-	+	+	+
Melezitose	-	+	-	-	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	+	v	+
L-Arabinose	-	-	-	-	+	-	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	+	-	+
L-Ramnose	-	-	-	-	+	+	+
Glicerol	+	+w	-	+	+	v	+
Eritritol	-	-	-	-	+	+	+
Ribitol	-	-	-	-	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	+	+	-
D-Manitol	-	+	-	-	+	-	+
D-Glucitol	-	+	-	-	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	v	+
2-K-D-Gluconato	v	+	+	+	+	-	v
Lactato	+	-	+	+	-	+	+
Succinato	+	+	+	-	+	+	+
Citrato	v	-	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	+	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	-	+
NaCl 10%	v	-	+	+	+	+	+
Cicloheximida 100 ppm	-	+	-	-	-	-	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	+	-	-	-	-	+
37° C	+	+	+	-	+	+	+
40° C	-	+	-	-	-	+	-
Fermentação de Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	Dr	mosto	Dr, D	mosto	M	M	S, M, Dr

	<i>Rhodotorula</i> sp1 (1)	<i>Rhodotorula</i> sp 2 (1)	<i>Rhodotorula acheniorum</i> (1)	<i>Rhodotorula glutinis</i> (1)	<i>Rhodotorula minuta</i> (2)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (89)
Assimilação/Morfologia						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+w	+	-	+	+	+
L-Sorbose	+w	+	-	+	+	-
Maltose	+	-	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+w	+	+	-
Trealose	+	+	+	+	+	v
Lactose	-	+	-	-	-	-
Melibiose	-	-	+	-	-	-
Rafinose	-	-	+	+	-	v
Melezitose	+	-	-	+	+	-
Inulina	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	+	+	+	+	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	-
D-Arabinose	+	+	+	+	+	-
D-Ribose	+	-	-	+	+	-
L-Ramnose	-	+	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	v
Eritritol	-	-	+	-	-	-
Ribitol	-	-	+	+	+	-
Galactitol	-	-	+	+	-	-
D-Manitol	-	+	+	+	+	-
D-Glucitol	-	+	-	+	+	-
Salicina	-	-	-	+	+	-
2-K-D-Gluconato	+	+	+w	+	+	-
Lactato	+	+	+	+	+	v
Succinato	+	+	+	+	+	-
Citrato	+	+	+	+	-	-
Inositol	+	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	+	+	+	-	-
Lisina	+	-	-	+	-	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	-
Cicloheximida 100 ppm	+	-	+	-	+	-
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	-	-	-	-
37° C	+	+	+	+w	v	+
40° C	-	+	-	-	v	v
Fermentação de Glicose	-	-	-	-	-	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	branca	branca	branca
Origem	D	Dr	C	M	D, M	S, M, Mosto

	<i>Saccharomyces exiguus</i> (4)	<i>Saccharomyces kluyveri</i> (1)	<i>Torulasporea delbrueckii</i> (1)	<i>Tremella encephala</i> (1)	<i>Trichosporon pullulans</i> (1)	<i>Zygoascus hellenicus</i> (1)
Assimilação/Morfologia						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	+	-	-
Melibiose	-	-	-	+	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	+	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	v	+	+
L-Arabinose	-	-	-	v	+	+
D-Arabinose	-	-	-	v	+	-
D-Ribose	-	-	-	v	+	-
L-Ramnose	-	-	-	v	-	+
Glicerol	-	-	+	+	-	+
Eritritol	-	-	-	-	+	-
Ribitol	-	-	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	+	+	+
D-Manitol	-	-	+	+	+	+
D-Glucitol	-	-	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	+	+	+
2-K-D-Gluconato	-	-	-	+	+	+
Lactato	-	+	-	+	+	-
Succinato	-	-	-	+	+	+
Citrato	-	-	-	+	+	+
Inositol	-	-	-	+	+	+
Metanol	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	+	-
Lisina	-	+	+	+	+	+
NaCl 10%	-	-	+	-	+	+
Cicloheximida 100 ppm	-	-	-	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	-	+	+	+
37° C	-	+	+	+	+	+
40° C	-	-	-	+	+	-
Fermentação de Glicose	+	+	+	-	+	+
Cor da colônia	branca	branca	branca	transparente	branca	branca
Origem	mosto	mosto	M	Dr	D	C

**ANEXO 2 - Fotos dos géis para obtenção dos cariótipos das linhagens de
*Saccharomyces cerevisiae***

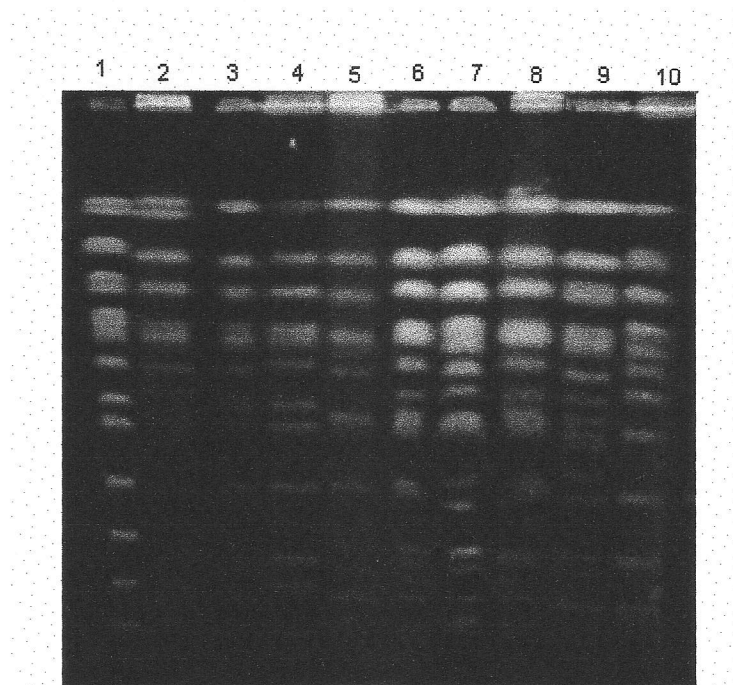


FIGURA 5 - Cariótipo das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas na destilaria Brumado Velho - Padrão *S. cerevisiae* BIO-RAD (canaleta 1); linhagem isolada a partir do solo (canaleta 2); linhagens isoladas durante a última fermentação de 1996 (canaletas 3 a 6); linhagens isoladas durante a primeira fermentação de 1997 (canaletas 7 a 10). Condições de corrida: 180 V, pulsos de 140" a 20" por 40h, e 75" a 15" por 7h, agarose (Seakean) 1%, tampão TBE 0,5 X a 6,5 ° C.

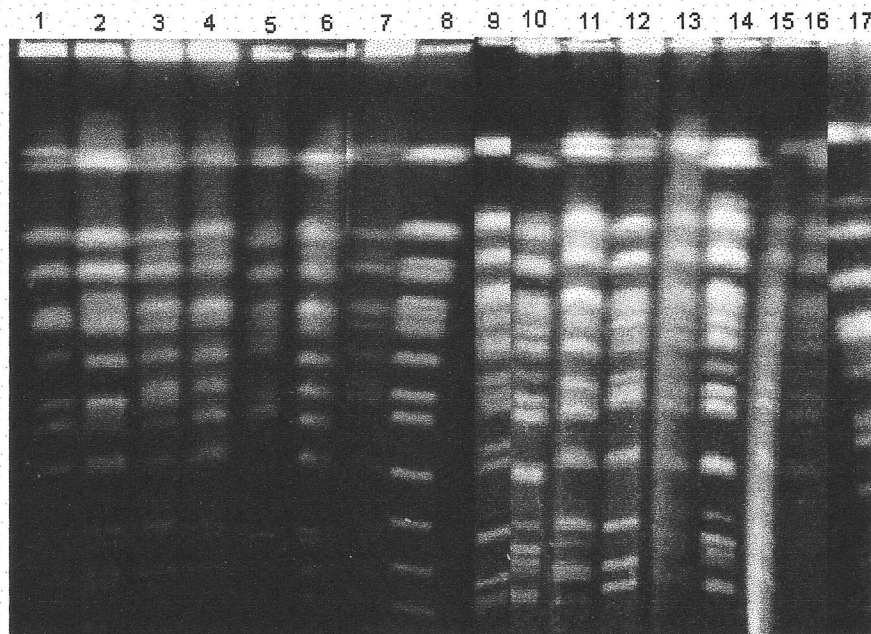


FIGURA 6 - Cariótipo das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas na destilaria Lapinha - Linhagens isoladas do solo (canaletas 1 e 2); linhagens isoladas do fermento (canaletas 3 e 4); linhagens isoladas durante a primeira fermentação de 1997 (canaletas 5 a 7); padrão *S. cerevisiae* BIO-RAD (canaleta 8); linhagens isoladas durante a última fermentação de 1996 (canaletas 9 a 16); linhagem isoladas da moenda (canaleta 17). Condições de corrida: 180 V, pulsos de 140" a 20" por 40h, e 75" a 15" por 7h, agarose (Seakean) 1%, tampão TBE 0,5 X a 6,5 ° C.

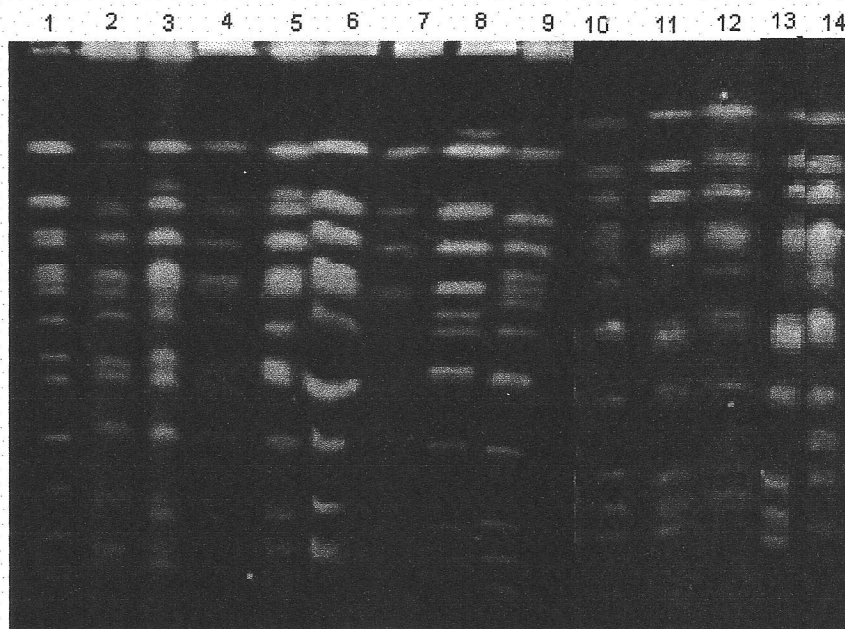


FIGURA 6 - Cariótipo das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas na destilaria Germana - Padrão *S. cerevisiae* BIO-RAD (canaleta 1); linhagens isoladas durante última fermentação de 1996 (canaletas 2 a 6); linhagens isoladas dos fermentos (canaletas 7 e 8); linhagens isoladas durante a primeira fermentação de 1997 (canaletas 9 a 14). Condições de corrida: 180 V, pulsos de 140" a 20" por 40h, e 75" a 15" por 7h, agarose (Seakean) 1%, tampão TBE 0,5 X a 6,5 ° C.