



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA**



**ALICE FERREIRA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS DE  
*Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE  
FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS DE CACHAÇAS DE  
ALAMBIQUE DA BAHIA**

**Feira de Santana, BA**

**2009**

**ALICE FERREIRA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS DE  
*Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE  
FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS DE CACHAÇAS DE  
ALAMBIQUE DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Trovatti Uetanabaro.

Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Carlos Augusto Rosa

**Feira de Santana, BA**

**2009**

Dedico este trabalho aos meus pais Adeilda Soares da Silva e Heribaldo Ferreira da Silva e ao meu noivo Frederic Mendes Hughes com carinho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Feira de Santana, ao Departamento de Ciências Biológicas, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Professora Dr. Ana Paula Trovatti Uetanabaro pela orientação, ensinamentos e oportunidades concedidas durante o curso.

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa pela co-orientação, ensinamentos, críticas e valiosas sugestões.

Ao Professor Dr. Aristóteles Góes Neto pelos ensinamentos, aconselhamento e motivação dispensada neste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Alessandra Schnadelbach, pela contribuição dada as análises de variabilidade genética.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Cosme Damião Cruz, pela gentileza em tirar minhas dúvidas por e-mail e contribuir para o desenvolvimento do meu aprendizado em diversidade genética.

À Fernanda Badotti e Pollyana Silva, pelos ensinamentos e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Suzi Barboni e Prof<sup>a</sup> Elinalva (LAMASP), ao Prof<sup>o</sup> Gilberto e Prof<sup>a</sup> Candida (LENT), ao Prof<sup>o</sup> Cássio (LAMOL), ao Prof<sup>o</sup> Antônio Azeredo (BIOTÉRIO), ao Prof<sup>o</sup> Carlos Wallace (LAFICO) pela viabilização de equipamentos para condução das diferentes etapas da parte experimental, na UEFS.

Aos produtores de cachaça, pela recepção e colaboração.

Ao Grupo GPCB (Bruno Oliveira, Cleber e Carla) pelo auxílio nas coletas e companhia.

Aos meus pais e toda família, ao noivo e as amigas da X-Bio (Alana, Alinne, Bruna, Cecília da Paixão e Laila), pelo constante apoio sem os quais jamais teria atingido mais uma etapa.

A Vasco e Hanna, pelo carinho e proteção.

À Suikinai, pela compreensão, apoio e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Áurea Barreto, Suzi Barboni e André Barboni, pelo estímulo, confiança, exemplo e amizade.

À Kelly Leite pelos valiosos ensinamentos, confiança e exemplo, os quais servirão por toda a caminhada acadêmica.

Aos amigos do bairro Feira VI, Luzia e família e Denise (do supermercado), Sr<sup>o</sup> Pedro (do bar), Lidi Rodrigues (do salão de beleza), Célia, Sílvio e Henrique (do pensionato Aconchego) e Tati (amiga da república “AAA”), pela atenção e cuidado.

Às amigas do pensionato de BH (Jane, Lilia, Miriam e Vanúbia), pela amizade e oportunidade em compartilhar distintas culturas.

À Clarissa Santana e Helton Ricardo pelo apoio administrativo, carinho e amizade.

Aos funcionários, Josa, Jackson, Luciana, Elizangela, Bel e Gorete, pelo café, amizade e companhia.

Aos amigos do LAPEM, Carol, Catinha, Fabíola, Getúlio, Ivana, Irís, Marcielle, Rafaella e Rita, pelo valioso apoio técnico e/ou psicológico.

Aos amigos do LAMOL, Tarciso e Paulo Ricardo, pelo apoio na análise de variabilidade genética e amizade.

Aos amigos do LENT, Vinina, Cinthia e Prof<sup>a</sup> Eddy, pela solidariedade e companhia durante as corridas de eletroforese.

Aos amigos do LAPRON, Josie Alves e Carlos Eduardo, pelas conversas divertidas, apoio moral e amizade.

Às amigas do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da UFMG (Aline Bruna, Anne, Cecília Mestre, Fernanda Badotti, Fernanda Piló, Lindiane, Mariana Costa, Mariana Vieira, Michelle, Nathália, Pollyana, Priscila e Raquel), as quais foram contagiadas em um ambiente de agradável convívio e/ou progresso profissional e pessoal.

Aos membros da banca Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fátima de Cássia Oliveira Gomes e Prof<sup>o</sup> Dr. Aristóteles Góes Neto por contribuírem com valiosas sugestões e correções.

À Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação do Estado da Bahia (SECTI), que nos cedeu caminhonete e motorista para duas coletas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio dissertação.

“Apliquei o coração a conhecer a sabedoria e, a saber, o que é loucura e o que é estultícia; e vim, a saber, que também isto é correr atrás do vento. Porque na muita sabedoria há muito enfado; e quem aumenta ciência, aumenta tristeza”.

Salomão (livro bíblico de Eclesiastes, cap. 1, versos 17 e 18).

## RESUMO

A melhoria na qualidade da cachaça e o aumento da eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo fermentativo. *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura que predomina durante o processo fermentativo. Este trabalho visou identificar, caracterizar geneticamente e analisar a diversidade genética das populações de *S. cerevisiae* isoladas de seis destilarias do estado da Bahia. A técnica mtDNA-RFLP detectou, dentre as 330 linhagens de *S. cerevisiae*, o total de 30 perfis moleculares, sendo os perfis exclusivos para cada destilaria. A Análise da Variância Molecular (AMOVA) constatou que a maior variação genética encontra-se entre as populações das destilarias, entretanto, não foi detectada correlação significativa entre divergência genética e a distância geográfica das populações pelo teste de Mantel. O programa STRUCTURE identificou que as 6 destilarias compartilham 3 *pools* gênicos sustentando a AMOVA e o dendrograma gerado a partir das dissimilaridade de Nei e Li. A distinção dessas populações naturais de *S. cerevisiae* por *pool* gênico pode refletir uma adaptação específica a microambientes. O presente estudo representa uma contribuição importante para compreensão e seleção de linhagens, o que torna este estudo indispensável para o desenvolvimento de estratégias cujo objetivo seja a seleção de linhagens de *S. cerevisiae* mais adaptadas à fermentação do caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça no estado da Bahia. Além disso, as fermentações das destilarias estudadas podem representar um importante reservatório de novos biótipos de levedura com potencial para aplicações industriais.

**Palavras-chave:** Variabilidade genética, *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentação, Diversidade, Cachaça de alambique, Bahia.

## ABSTRACT

The improvement in cachaça quality and increased efficiency of the production process are, necessarily, the selection of one or more appropriate yeast to the fermentation process. *Saccharomyces cerevisiae* is the predominant specie during the fermentation process. This study aimed to identify, genetically characterize and to analyze the genetic diversity of populations of *S. cerevisiae* isolated from six distilleries in the state of Bahia. The mtDNA-RFLP technique detected, among the 330 strains of *S. cerevisiae*, a total of 30 molecular profiles showing that the profiles were unique for each distillery. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) found that most genetic variation is between populations of distinct distilleries, however, no significant correlation was found between geographical distance and genetic divergence of populations by the Mantel test. The STRUCTURE program identifies the six distillery share 3 gene pools supported the AMOVA and dendrogram generated from the dissimilarity of Nei e Li. The distinction of natural populations of *S. cerevisiae* by gene pool may reflect an adaptation to specific microhabitats. This study represents an important contribution to understanding and selection of strains, which makes this study vital to the development of strategies wich goal is the selection of strains of *S. cerevisiae* more adapted to fermentation of the juice of sugar cane for production of cachaça in the state of Bahia. Furthermore, the fermentation of distilleries studied may represent an important reservoir for new yeast biotypes with potential industrial applications.

**Keywords:** Genetic variability, *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentation, Diversity, Cachaça of alambique, Bahia.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Ciclo de vida de leveduras por uma fase haplóide e outra diplóide 25
- Figura 2. Genes mitocondriais em *Saccharomyces cerevisiae* 29
- Figura 3. Mapa dos pontos de coleta determinado pelo sistema de informação geográfica (ArcViewGIS 3.3 Departamento de Geociências, UEFS, Bahia) 39
- Figura 4. Esquema representando a amostragem para colônias com morfotipo dominante e morfotipo(s) diferente(s) 40
- Figura 5. Ilustração da caracterização fisiológica das leveduras da série S (Destilaria “DEST4” de 1 a 13 e “DEST5” de 14 a 21). A) Base de nitrogênio para levedura: crescimento residual, resultado considerado negativo (-), exceto para a levedura número 12; B) Glicose: crescimento (+) de todas as leveduras; C) Sacarose: crescimento (+) para todas as leveduras; D) D-Manitol: resultado (-) para todas as leveduras, exceto para a número 12; E) Base de carbono para levedura: crescimento residual (-), exceto para a levedura número 12, F) Cicloheximida: resultado (-) para todas as leveduras, exceto para a número 12) e G) Lisina: crescimento (-) para todas as leveduras, exceto para a número 12) 48
- Figura 6. Riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo das seis destilarias estudadas, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I 49
- Figura 7. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST1, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 1 a 6, 9 a 13 e 15 a 36: perfil Molecular “A”, na pista 7: perfil molecular “B”, na pista 8: perfil molecular “C”, na pista 14: perfil molecular “D” e na pista 37 a 56: perfil molecular “E” 52
- Figura 8. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST1, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 56
- Figura 9. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST1, de

acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 56

Figura 10. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST2, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 57 a 75 e 77 a 88: perfil Molecular “F”, na pista 76: perfil molecular “G” e nas pistas 89 a 108: perfil molecular “H” 57

Figura 11. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST2, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 61

Figura 12. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST2, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 61

Figura 13. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST3, obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 109 a 119, 121 a 126, 128 a 131, 134 a 142, 144 a 146, 149 e 150, 152, 154 a 156: perfil Molecular “I”, nas pistas 120 e 148: perfil molecular “J”, na pista 132: perfil Molecular “L”, na pista 127: perfil molecular “K”, na pista 133: perfil molecular 133, na pista 143: perfil molecular “N”, na pista 147: perfil molecular “O”, na pista 151: perfil molecular “P” 62

Figura 14. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae*, com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST3, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 66

Figura 15. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST3, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 67

Figura 16. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST4, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 158, 159, 161 a 163, 165 a 181, 184 a 190 e 192 a 212: perfil molecular “Q”, na pista 164: perfil molecular “R”, na pista 182: perfil molecular “S”, na pista 183: perfil molecular “T” e na pista 191: perfil molecular “U” 68

Figura 17. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST4, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 72

Figura 18. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST4, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 72

Figura 19. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST5, obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas 213 a 232 e 234 a 270: perfil molecular “V”, na pista 233: perfil molecular “W” 73

Figura 20. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST5, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 77

Figura 21. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST5, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 77

Figura 22. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST6, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 271 A 273, 275 a 281, 284, 286 a 289, 292, 294, 298 a 301, 304 a 306, 312, 314 a 316, 322, 324 a 329: perfil molecular “X”, na pista 274: perfil molecular

“Y”, nas pistas 282, 283, 293, 308 a 310, 317, 318, 320, 323 e 330: perfil molecular “Z”, nas pistas 285, 296, 313 e 319: perfil molecular “AA”, nas pistas 290, 291 e 303: perfil molecular “AB”, nas pistas 295, 297, 302, 311 e 321: perfil molecular “AC” e na pista 307: perfil molecular “AD” 78

Figura 23. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST6, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 82

Figura 24. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST6, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%) 83

Figura 25. Dendograma realizado para as seis populações de *S. cerevisiae* gerado a partir da dissimilaridade de Nei e Li (1979), obtido par a par no programa GENES. A escala representa a saída gráfica, em que a distância correspondente ao último passo do agrupamento é convertida para 100% 86

Figura 26. Composição alélica das seis populações de *S. cerevisiae* estimada no programa STRUCTURE versão 2.3.1. Cada indivíduo está representado por uma linha vertical, enquanto cada população está delimitada por linhas verticais de cor preta 86

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Técnicas moleculares mais frequentemente utilizadas na caracterização de cepas de levedura de bebidas fermentadas, nos últimos 8 anos 37
- Tabela 2. Ocorrência de populações de leveduras em diferentes estágios do ciclo fermentativo nas diferentes concentrações de sólidos solúveis totais (% Brix) no mosto de seis destilarias de cachaça de alambique da Bahia. Valores expressos em populações de  $10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup> 46
- Tabela 3. Dados de coleta (número da amostra, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST1 localizada no município de Ibirataia-BA 54
- Tabela 4. Dados de coleta (número da amostra, tempo, temperatura e Brix), e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST2 localizada no município de Jaguaripe-BA 59
- Tabela 5. Dados de coleta (número da amostra, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST3 localizada no município de Ilhéus-BA 64
- Tabela 6. Dados de coleta (número da amostra, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST4 localizada no município de Condeúba-BA 70
- Tabela 7. Dados de coleta (número da amostra, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST5 localizada no município de Caculé-BA 75
- Tabela 8. Dados de coleta (número da amostra, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST6 localizada no município de Rio de Contas, BA 80
- Tabela 9. Variabilidade genética dos 40 *loci* de seis populações de *S. cerevisiae* de destilarias de cachaça de alambique da Bahia 84
- Tabela 10. Resultados da Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *S. cerevisiae* 84
- Tabela 11. Matriz de identidade e distancia genética obtida a partir da distância de Nei (1978) para populações de *S. cerevisiae*. Acima da diagonal estão os valores encontrados para a identidade genética e abaixo os valores da distância genética 85
- Tabela 12. Estimativa da probabilidade posterior para K e  $\Delta K$  da simulação realizada utilizando o modelo de mistura para a ancestralidade e de correlação para as freqüências alélicas 86

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1	PRODUÇÃO DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE	19
2.2	INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO FERMENTATIVO DA CACHAÇA	21
2.3	A ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.4	TÉCNICAS MOLECULARES EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE CACHAÇA	26
2.4.1	<b>Eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel electrophoresis - PFGE)</b>	27
2.4.2	<b>Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism – mtDNA-RFLP)</b>	27
2.4.3	<b>Marcadores baseados em Reação de Polimerase em Cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR)</b>	30
2.4.3.1	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD)	31
2.4.3.2	PCR <i>fingerprinting</i>	31
2.4.3.3	Amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repaeats - ISSR)	32
2.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
4.1	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	39
4.2	PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	40

4.3	POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL	41
4.3.1	<b>Extração do DNA</b>	41
4.3.2	<b>Digestão enzimática do DNA mitocondrial</b>	42
4.3.3	<b>Gráficos de frequência e riqueza</b>	43
4.4	ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE <i>S. cerevisiae</i>	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	46
5.1	CONTAGEM, PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	46
5.2	POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL	49
5.3	ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE <i>S. cerevisiae</i>	84
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	87
6.1	CONTAGEM, PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	87
6.2	POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL	89
6.3	ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE <i>S. cerevisiae</i>	92
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	96
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIA</b>	98

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Legislação Brasileira a cachaça é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume, obtida pela destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado (BRASIL, 2005).

O Brasil produz anualmente cerca de 1,3 bilhões de litros de cachaça industrial e alambique, que rendem cerca de US\$ 2 bilhões ao país (CARDELLO; ISIQUE; FARIA, 1998; NASCIMENTO et al., 1998). O setor reúne cerca de 30 mil produtores ao nível nacional, que lançam no mercado 5 mil marcas e geram 400 mil empregos diretos. O estado de São Paulo é o líder na produção em cachaça, com 44%, seguido de Pernambuco e Ceará, com 12% cada. Os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás e Espírito Santo, cada um com 8% do mercado, completam a lista dos principais produtores (SEBRAE, 2001).

A cachaça de alambique é considerada um produto de maior qualidade pelos apreciadores da bebida, quando comparada com a cachaça industrial, mas ocupa um espaço que ainda não chega a 20% da produção total da bebida no Brasil. Analisando apenas os números da cachaça artesanal, Minas Gerais é o principal centro produtor. O estado possui cerca de 8.466 alambiques que produzem 230 milhões de litros por ano (SEBRAE, 2001).

A Bahia é hoje o segundo maior produtor de cachaça de alambique do Brasil. Por ano, é fabricado no mercado baiano em torno de 1,8 milhões de litros da bebida artesanal. Estima-se que três mil pequenos estabelecimentos rurais estejam, atualmente, envolvidos na produção de derivados da cana (melado, rapadura, açúcar mascavo, além de cachaça) e empreguem cerca de 60 mil pessoas direta e indiretamente. Apesar de uma produção inferior a dois milhões de litros, a capacidade de produção de cachaça no estado é bem superior, da ordem de 3,5 milhões de litros/ano de cachaça pura (SICM, 2006).

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



Por isso pesquisas têm sido realizadas em toda a cadeia produtiva da cachaça: seleção de variedades de cana-de-açúcar, aspectos fermentativos, seleção de cepas de levedura, aperfeiçoamento do processo de destilação, escolha de madeiras para envelhecimento do produto, e determinação das análises químicas que caracterizam o produto de alta qualidade, buscando tanto a melhoria do produto final quanto o incremento financeiro para o produtor (PATARO et al., 2002a).

Contudo, a seleção de leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam para a característica final dessas bebidas, pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos secundários responsáveis pelo sabor é formada (LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSSON, 1983; FLEET, 2003). A produção destes compostos varia com as espécies e as linhagens de leveduras, assim, a contribuição desses microrganismos para a individualidade dos sabores e aroma depende do papel ecológico dos mesmos na fermentação e de outros fatores, como composição química do mosto e condições do processo fermentativo, que determinam esta ecologia (FLEET, 2003).

A melhoria da qualidade da cachaça e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo. A identificação e o estudo da diversidade das leveduras associadas à produção de cachaça são informações importantes para determinar o papel desses microrganismos nos vários estágios da fermentação, buscando a seleção linhagens iniciadoras (PATARO et al, 2002a).

Paralelamente à seleção e desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* para fermentações etanólicas, métodos moleculares foram desenvolvidos e validados para o estudo da evolução da microbiota de leveduras em fermentações espontâneas e inoculadas (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, o acompanhamento das linhagens de leveduras por métodos moleculares pode trazer informações importantes à seleção de leveduras selvagens com alto potencial fermentativo (SCHULLER et al., 2005).

A diversidade genética das linhagens de *S. cerevisiae* tem sido analisada por diversos métodos moleculares tais como: análise de cariótipo por eletroforese em campo pulsado, análise de restrição do DNA mitocondrial

(mtDNA-RFLP ), análises baseadas nos microssatélites, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, dentre outros (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; SILVA-FILHO et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Neste trabalho se aplicou análise de mtDNA-RFLP utilizando a endonuclease *Hinf* I como marcador genético para distinguir linhagens de *S. cerevisiae*. O objetivo principal deste trabalho foi o de determinar a diversidade de linhagens de *S. cerevisiae*, que se encontrava em destilarias de cachaça localizadas na Bahia, como suporte para estudos futuros de seleção de linhagens indígenas boas produtoras de cachaça de alambique. O outro objetivo foi analisar a variabilidade genética das populações de leveduras estudadas por meio da análise de mtDNA-RFLP mensurando o número de *loci*, número de *loci* exclusivos e proporção de *loci* polimórficos e utilizando a análise molecular de variância, o coeficiente médio de dissimilaridade de Nei e Li (1979) e o programa STRUCTURE.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE

A produção de cachaça é iniciada com a escolha da variedade de cana-de-açúcar adequada para que proporcione aumentos significativos na produtividade desta bebida. Dentre as características desejáveis em uma variedade de cana para cachaça destaca-se: alto rendimento de colmos, alto teor de sacarose, teor de fibra médio/baixo, resistência as principais pragas e doenças e boa adaptação a diferentes tipos de solos e clima (ANDRADE, 2006).

Após a obtenção do caldo-de-cana pela trituração da cana através de moendas procede-se com a filtração e decantação para retirada das impurezas (CARDOSO, 2001). Recomenda-se que o intervalo entre corte e moagem não ultrapasse 48 horas. Além disso, o corte da cana deve ser feito rente ao nível do solo, a fim de evitar perda da matéria-prima, infestações de pragas nas cepas remanescentes e emissão de brotações aéreas, assim como o desponte deve ser realizado, pois se constitui em partes pobres de açúcar e sua presença podendo provocar embuchamento da moenda ou até diminuir o rendimento da cachaça (ANDRADE, 2006).

De acordo com Lima (2001) o caldo-de-cana é constituído de água em torno de 78 a 86%; sacarose, de 11% a 18%; açúcares redutores, de 0,2 a 1,0%; cinzas, de 0,3 a 0,5% e compostos nitrogenados entre 0,5 e 1,0%.

Passada as etapas de plantio, colheita, moagem da cana e decantação do caldo-de-cana, processa-se a fermentação. A fermentação alcoólica é considerada a principal etapa da produção devido aos componentes químicos dessa bebida que são produzidos através da atividade direta e indireta de leveduras e bactérias durante esta fase (NOVAES, 1992).

O caldo de cana-de-açúcar a ser fermentado deve apresentar valores de pH entre 5,2 e 5,8 e uma concentração de açúcar em torno de 14-16% Brix, ideal para fermentação; para isso, normalmente se efetua a diluição com água. Costuma-se acrescentar fubá, milho moído cru ou tostado, farelo de arroz e suco de limão ao caldo para auxiliar o desempenho do fermento (PINHEIRO; LEAL; ARAÚJO, 2003).

De acordo com Pataro et al. (2002a) o processo fermentativo consiste na transformação dos açúcares fermentáveis no mosto de cana-de-açúcar em álcool etílico, gás carbônico e outros compostos secundários com duração média de 24 horas. Geralmente a fermentação é conduzida por batelada e consiste em colocar todo o inóculo e todo meio a ser fermentado em uma dorna de fermentação (PATARO et al., 2002a).

Alguns alambiques iniciam o processo fermentativo com leveduras prensadas de panificação, enquanto outros desenvolvem o fermento na própria destilaria (fermento caipira), de acordo com técnicas regionais. Um importante fator na produção da cachaça de alambique é a produção do fermento caipira que surge a partir da microbiota presente no caldo-de-cana, dornas e equipamentos. O desenvolvimento do fermento ocorre dentro da dorna e é o resultado do caldo de cana associado com outros substratos, tais como grãos de milho, arroz ou soja em pó. Após um período de 5 a 20 dias, o número de leveduras atinge um nível alto o suficiente para permitir o início da fermentação (PATARO et al., 2000).

Outra possibilidade para conduzir o processo fermentativo é a utilização de fermento selecionado. O uso de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* na produção de cachaça tem contribuído para o aumento da produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitas destilarias, principalmente em relação aos teores de acidez e concentrações de alcoóis superiores (PATARO et al., 2002). Além disso, o processo fermentativo é mais rápido, há menor risco de contaminação e as características sensoriais da bebida são preservadas de safra para safra (GOMES et al., 2009b).

A fermentação é concluída quando todo açúcar é consumido pelas leveduras. O caldo fermentado, chamado de vinho de cana, é destilado em alambique, feito geralmente de cobre (ROSA et al., 2007). Durante a destilação separam-se as frações para melhorar a qualidade da bebida. A primeira fração, “cabeça”, apresenta maiores concentrações de metanol, a segunda fração, o “coração”, corresponde à cachaça e a terceira, a “cauda”, apresenta maiores teores de produtos não voláteis (SCHWAN, et al., 2006).

Com a separação das frações consegue-se retirar os compostos indesejáveis por meio da separação da “cabeça” e ajustar o teor alcoólico no

“coração”. Além disso, pode haver o reaproveitamento da “cauda” na próxima destilação (MAIA et al. 1994).

Além dos compostos principais produzidos pelas leveduras outros podem ser incorporados durante o armazenamento ou o envelhecimento da bebida em tonéis de madeira. (ROSA et al., 2007). O envelhecimento permite aprimorar as características da cachaça recém destilada tornando-a mais fina em aroma e paladar, além de modificar a coloração, atenuando a sensação desidratante do álcool (MENDES; MORI; TRUGILHO, 2002).

## 2.2 INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO FERMENTATIVO DA CACHAÇA

A qualidade da cachaça está fortemente relacionada com a ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante o processo de fermentação, sendo estes fatores determinantes no rendimento do etanol e na formação e proporções relativas dos compostos secundários (GOMES, et al., 2009a). A produção destes compostos varia com as espécies e as linhagens de leveduras (OLIVEIRA et al. 2004, 2005; DATO et al. 2005).

Estudos têm monitorado populações de leveduras durante o processo fermentativo da produção de cachaça e foi observada uma sucessão de espécies de leveduras, culminando com a predominância de *S. cerevisiae* (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 1998; PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; GOMES et al., 2007). Isto ocorre devido à capacidade adaptativa desta espécie às condições fermentativas associadas com a produção de cachaça (GUERRA et al., 2001; PATARO et al., 2002b; GOMES et al., 2007).

De acordo com Gilliland (1971) a definição popular de leveduras “selvagem” na indústria cervejeira se refere a qualquer levedura não utilizada sob total controle. A definição de leveduras selvagens é difusa e, por conveniência, é tradicionalmente dividido em (i) *Saccharomyces* e (ii) não-*Saccharomyces* (BOULTON; QUAIN, 2001).

Espécies de leveduras não-*Saccharomyces* apesar de serem encontradas em contagens populacionais menores que *S. cerevisiae*, também podem contribuir para a composição sensorial da cachaça (GOMES, et al., 2009a). No entanto, apesar de vários artigos relatarem o monitoramento de

leveduras não-*Saccharomyces* durante a fermentação da cachaça (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; GOMES et al., 2007) há pouca informação sobre a contribuição dessas leveduras para a qualidade e o aroma da cachaça. Essas leveduras não-*Saccharomyces* são frequentemente resistentes às condições adversas, tais como alta temperatura do meio, concentrações de nutrientes e substratos, taxa de crescimento, tempo de fermentação, entre outros (DATO et al., 2005).

Pataro et al. (2000) estudaram populações de três destilarias no início, meio e final da produção da cachaça. *Saccharomyces servazzii*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces unisporus* e *Torulaspota delbrueckii* foram isoladas exclusivamente no início da fermentação, e *Saccharomyces kluyveri* foi encontrada somente no meio da fase fermentativa. *Candida stellata*, *Candida valida*, *Saccharomyces exiguous*, *Kluyveromyces* spp. e *Schizosacharomyces pombe* foram encontradas no final da fermentação, enquanto *S. cerevisiae* prevaleceu durante todo o período da fermentação.

Guerra et al. (2001) isolaram, além de *S. cerevisiae*, linhagens não-*Saccharomyces* em duas destilarias: *Candida azyma*, *Candida guilliermondii*, *Candida incommunis*, *Candida maltosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugopelliculosa*, *Kloeckera japonica*, *Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces kluyveri* em uma destilaria e *Candida bombicola* em outra. No entanto, essas espécies desapareceram nos estágios finais do ciclo fermentativo. Gomes et al. (2007) encontraram espécies não-*Saccharomyces* durante as fermentações estudadas, porém *S. cerevisiae* foi predominante com contagem entre  $10^5$  e  $10^8$  UFC/mL enquanto a contagem de espécies não-*Saccharomyces* ficou entre  $10^3$  e  $10^6$  UFC/mL.

Dato et al. (2005) determinaram os principais componentes das cachaças produzidas por quatro cepas de leveduras não-*Saccharomyces* e uma *S. cerevisiae* que foi utilizada como controle. As leveduras não-*Saccharomyces* produziram concentrações aceitáveis de todos os componentes secundários (acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol) estudados. De acordo com os níveis dos componentes secundários que foram produzidos dentro dos valores permitidos pela legislação brasileira, as leveduras não-*Saccharomyces* (*Pichia silvicola*, duas linhagens de *Pichia*

*anomala* e *Dekkera bruxelensis*) e *S. cerevisiae* podem ser utilizadas para produzir cachaça.

Apesar da capacidade de leveduras não-*Saccharomyces* produzirem concentrações aceitáveis de componentes secundários (Dato et al., 2005), Schwan et al. (2001) estudaram a variabilidade de populações microbianas em 15 alambiques do estado de Minas Gerais e atribuíram o baixo rendimento de cachaça encontrado em um alambique a alta quantidade da levedura não-*Saccharomyces*, do gênero *Rhodotorulla*. Este alambique também apresentou uma cachaça de baixa qualidade, em relação aos compostos do aroma e sabor, comparado com cachaças de outros alambiques estudados, porém os autores não relacionam este diagnóstico com a presença de leveduras não-*Saccharomyces*.

Bernardi et al. (2008) também encontraram dois alambiques com baixo rendimento de cachaça, cerca de 60% a menos da produção de cachaça observado para os outros oito alambiques investigados, os autores associaram este resultado ao alto nível de contaminação por leveduras não-*Saccharomyces*, provavelmente causada por poucas condições de higiene.

O uso de linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas constitui uma alternativa mais eficiente no controle microbiológico do processo fermentativo da cachaça (ROSA et al., 2009), por acidificar o mosto e aumentar o teor alcoólico, levando o desaparecimento de espécies não-*Saccharomyces* (PATARO et al. 2000; GUERRA et al. 2001).

De acordo com Gomes et al. (2007) as linhagens de *S. cerevisiae* são boas competidoras no processo fermentativo, quando o caldo de cana-de-açúcar não passa por um tratamento prévio, processo realizado a fim de diminuir a microbiota indígena. Além disso, as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* podem ser utilizadas como culturas iniciadoras por produzirem uma cachaça com boa aceitação sensorial quando comparadas com cachaças produzidas por fermentação espontânea.

### 2.3 A ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae*

De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *S. cerevisiae* está incluída no Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe

Saccharomycetes; Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (KURTZMAN, 1997). O gênero *Saccharomyces* normalmente são fungos unicelulares diplóides que se reproduzem assexuadamente por brotamento (BOULTON; QUAIN, 2001), ou sexuada por esporulação (meiose, segregação e formação de haplóides) e cruzamento com formação de diploides (PRETORIUS, 2000). *S. cerevisiae* consiste em células com aproximadamente 3 $\mu$ m de diâmetro que são capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas (PASSARGE, 2004).

O número dos "conjuntos" de cromossomos é descrito como a "ploidia". Cepas de *S. cerevisiae* de laboratório são geralmente haplóides ou diplóides. Linhagens haplóide de *S. cerevisiae* têm um conjunto ( $n$ ), linhagens diplóides têm dois conjuntos ( $2n$ ), e estirpes triplóides têm três conjuntos ( $3n$ ) e assim por diante (HAMMOND, 1996). Segundo Passarge (2004) células haplóides de tipos opostos podem fundir-se para formar uma célula diplóide, para tanto, essas células devem ser de um dos tipos de cruzamento, tipo **a** e  $\alpha$ , e serem mediados por feromônio. No início do processo um receptor na superfície celular reconhece o feromônio (polipeptídeo) e em seguida acontece o cruzamento e divisões mitóticas sob condições favoráveis de crescimento. Em caso de desnutrição as leveduras diplóides podem sofrer meiose e formar quatro esporos, dois do tipo **a** e o restante do tipo  $\alpha$  (Figura 1).



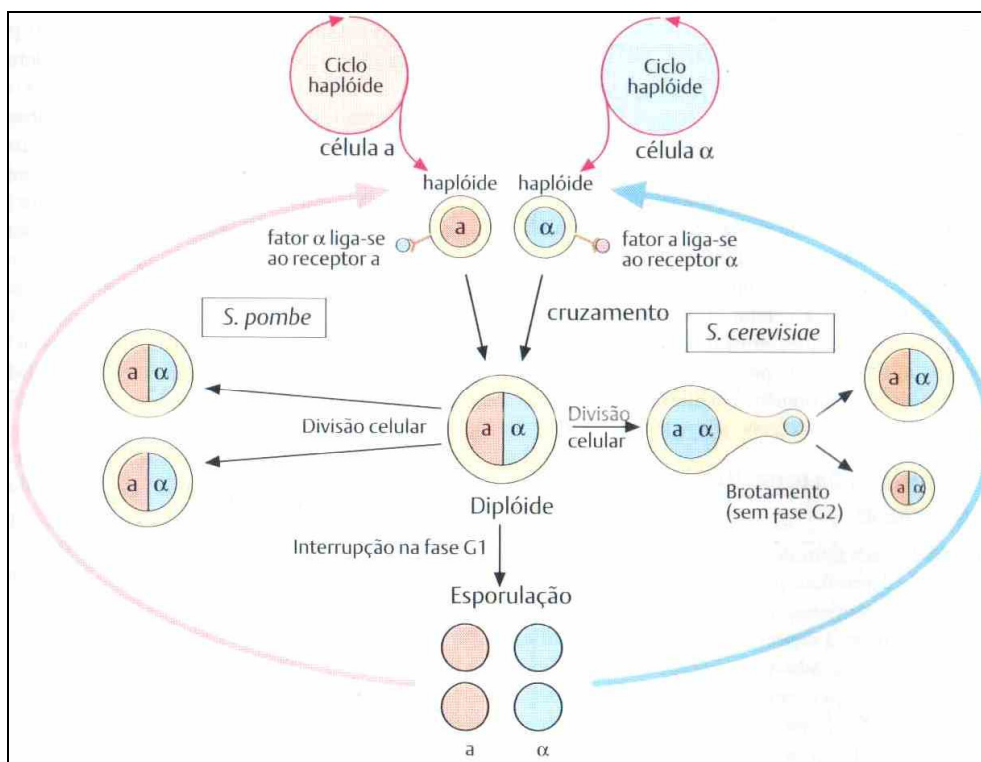


Figura 1. Ciclo de vida de leveduras por uma fase haplóide e outra diplóide. **FONTE:** PASSARGE, 2004.

O gênero *Saccharomyces* é composto por dez espécies, as quais estão divididas em três grupos. As espécies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus*, as quais não podem ser diferenciadas por testes fisiológicos, mas podem ser delimitadas por mensuração do grau de homologia do DNA, formam o grupo *Saccharomyces sensu stricto*. O segundo grupo *Saccharomyces sensu largo* é composto pelas espécies *S. exiguus*, *S. castelli*, *S. servazzi* e *S. unisporus*. E o terceiro grupo consiste somente da espécie *S. kluyveri* (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Somente o primeiro grupo inclui espécies de interesse enológico: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, e, possivelmente, *S. paradoxus*, caso sua aptidão para a vinificação seja demonstrada. Esta nova classificação tem criado uma grande confusão referente ao epíteto *bayanus*. Para os taxonomistas, *S. bayanus* é uma espécie distinta de *S. cerevisiae*. Para os enologistas e viticultores, *bayanus (ex-oviformis)* designa uma raça fisiológica de *S. cerevisiae* que não fermenta galactose e possui uma forte resistência ao etanol, sendo denominada de *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

De acordo com Vaughan-Martini e Martini (1997) um grande número de investigações ecológicas e tecnológicas tem estabelecido a hipótese que *S. cerevisiae* é a principal espécie responsável pela fermentação alcoólica de sucos de fruta.

#### 2.4 TÉCNICAS MOLECULARES EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE CACHAÇA

A utilidade de técnicas moleculares de análise genômica pode ser resumida a dois pontos: (I) identificação da variabilidade nas sequências de DNA dos indivíduos analisados em um nível de resolução várias vezes superior ao polimorfismo passível de detecção ao nível morfológico; (II) redução da enorme complexidade do genoma estudado à análise Mendeliana dos segmentos de DNA detectados e com isso permitindo através dos dados moleculares obtidos estimarem parâmetros genéticos úteis para um amplo espectro de estudos, desde testes de identidade genética e construção de mapas genéticos até análises filogenéticas e evolucionárias (FERREIRA, 2001).

Os métodos moleculares baseados no polimorfismo dos ácidos nucléicos são a melhor alternativa aos métodos tradicionais, uma vez que não dependem do estado fisiológico da célula e são mais reprodutíveis. Além disso, eles têm outras vantagens, como a alta precisão e discriminação, bem como a rapidez e simplicidade durante a realização da técnica (GUEROLA, 2006).

Diferentes técnicas baseadas na detecção de polimorfismo molecular têm sido utilizadas para a análise da diversidade genética de leveduras associadas à produção da cachaça, são elas: por eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel electrophoresis - PFGE), análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLPmtDNA), reação de polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified polymorphic DNA - RAPD) e amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repaeats - ISSR) (PATARO et al.,

2000; GUERRA et al., 2001; SILVA-FILHO et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; GOMES et al., 2009b; BADOTTI et al., 2009).

#### **2.4.1 Eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel electrophoresis - PFGE)**

*S. cerevisiae* tem 16 cromossomos com tamanho entre 250 e 2500 Kb. Esse DNA genômico é muito polimórfico sendo possível diferenciar linhagens de espécies por meio da eletroforese em gel de campo pulsado, que é usada para separar os cromossomos de *S. cerevisiae* e permitir a comparação dos cariótipos de linhagens de acordo com o padrão de bandas cromossômicas que está relacionado ao peso molecular e número dos cromossomos (MELO et al., 2002; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Assim, o polimorfismo é revelado por meio de mutações no conjunto cromossômico, como deleções, duplicações, inversões e as translocações, durante a evolução do genoma (GRIFFITHS et al., 2002).

Esta técnica tem sido utilizada nos estudos de análise do polimorfismo de linhagens de *S. cerevisiae* associadas à cachaça (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; BERNARDI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, a complexidade e a longa duração do processo, além do equipamento necessário limitam a sua utilização como técnica de rotina para caracterizar leveduras (DEÁK, 1995).

#### **2.4.2 Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism – mtDNA-RFLP)**

O polimorfismo é detectado por meio da capacidade das enzimas de restrição que clivam o DNA em posições específicas, gerando um número limitado de comparáveis fragmentos com diversos comprimentos. Em estudos com DNA de cloroplastos e mitocôndrias as variações podem ser detectadas para um *locus*, no caso dos fragmentos serem de um gene específico, ou para múltiplos *loci* se todo o genoma é fragmentado devido à sua pequena dimensão (GONZÁLEZ, 1998).

O marcador RFLP tem reprodutibilidade, já que o padrão de fragmentos

produzidos por uma determinada enzima de restrição para um dado DNA deve ser mantido e permanecer constante quando a digestão é refeita. Quando isto não ocorre, a causa pode ser devido a artefatos de técnicas produzidos por alteração em algum parâmetro específico, como o tempo de corrida, concentração do gel e do tampão, concentração do DNA ou da enzima, temperatura e tempo de digestão (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

A análise de polimorfismo mediante a restrição do DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizada como método para caracterização de linhagens isoladas de processos fermentativos como do vinho, cerveja e cachaça (VEZINHET et al., 1990; ARAUJO et al., 2007; BADOTTI, 2009).

O genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* (Figura 2) é extenso (120 kb) contém íntrons e apresenta genes para os tRNAs para a cadeia respiratórias, para 15S e 21S rRNA e para subunidades do sistema de ATPase (PASSARGE, 2004), e é extremamente rico em bases de adenina e timina cujo grau de variabilidade pode ser manifestado por restrição. Ele contém doze genes que codificam pigmentos e enzimas respiratórias como citocromo *b*, e várias subunidades da citocromo oxidase e do complexo ATP sintase. Algumas mutações que afetam esses genes podem resultar na resistência da levedura para determinados inibidores específicos mitocondriais, como a oligomicina (GUEROLA, 2006), droga inibidora da ATP sintase (NARITA et al., 1998). Alguns mutantes que são deficientes respiratórios apresentam-se em forma de pequenas colônias em meio sólido. Estes mutantes "*petiti*" não são utilizados na elaboração dos vinhos por possuírem deficiência respiratória (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

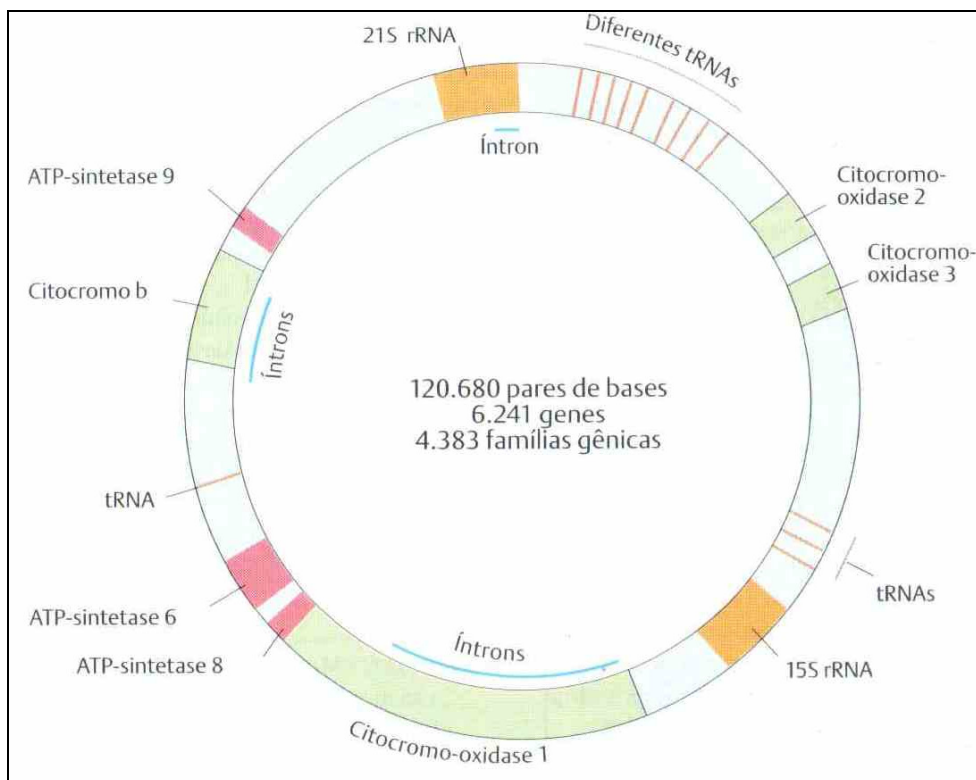


Figura 2. Genes mitocondriais em *Saccharomyces cerevisiae*. **FONTE:** PASSARGE, 2004.

O DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* tem duas vantagens: é extremamente polimórfico dependendo da linhagem e é estável durante a multiplicação vegetativa. Endonucleases de restrição cortam o DNA em sítios específicos. Esse processo gera fragmentos que variam em número e tamanho e podem ser separados por gel de agarose (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). No caso específico de *S. cerevisiae* as enzimas mais apropriadas para diferenciar ao nível de cepa são *HinfI* e *HaeIII* (GUILLAMÓN et al., 1994).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o isolamento de DNA mitocondrial de leveduras (AIGLÉ et al., 1984; GARGOURI, 1989; QUEROL e BARRIO, 1990). A extração de mtDNA inicia-se com a obtenção dos protoplastos obtidos por digestão enzimática, em seguida, o mtDNA é então separada do DNA cromossômico por ultracentrifugação em um gradiente de cloreto de céσιο, na presença de bisbenzimidazina que atua como um agente fluorescente intercalante mediante a uma forte afinidade a pares de bases de adenina e timina, cujo o DNA mitocondrial é rico. Finalmente, o mtDNA é purificado por uma extração baseada em fenol-clorofórmio e precipitado em etanol (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

No entanto, Querol e colaboradores (1992a) desenvolveram um método de análise do mtDNA que evita a utilização de gradientes de cloreto de céσιο e a utilização de uma ultracentrífuga, fator limitante para o uso na indústria. A simplificação da técnica é baseada no fato de que as enzimas do tipo AtCG utilizada para digerir o DNA total, não reconhecem sequências ricas em GC e nem em AT presentes no mtDNA. Portanto, dado o reduzido número de pontos de corte mtDNA, isto leva a grandes fragmentos que podem ser claramente visualizados através de bandas definidas, em cima de degradados fragmentos de DNA nuclear. Porém, nem todas as enzimas apresentam o mesmo grau de polimorfismo e este também é altamente dependente da espécie em estudo (GUEROLA, 2006).

Esta técnica permite análises de um maior número de cepas em menos tempo e é ideal pra ser utilizada na indústria por sua rapidez, segurança, economia e por não requerer material sofisticado, nem mão de obra especializada (GUEROLA, 2006).

#### **2.4.3 Marcadores baseados em Reação de Polimerase em Cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR)**

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genéticos-moleculares envolvendo grande número de organismos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

A PCR baseia-se na capacidade da enzima polimerase termorresistente de replicar sequências de DNA a partir de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica (primers), que flanqueiam a sequência que se deseja amplificar. Por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura processadas automaticamente em um equipamento chamado termociclador, é realizada a desnaturação, o anelamento e a extensão da fita complementar à fita molde, uma determinada sequência é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel de eletroforese na forma de uma banda (NEWTON, GRAHAM, 1997; FERREIRA, 2001).

A tecnologia da PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares na análise de diversidade genética como o PCR *fingerprinting*,

Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD) e a Amplificação de Sequências Simples entre Repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats - ISSR) (WILLIAMS et al., 1990; GODWIN; AITKEN; SMITH, 1997; VINUESA et al., 1998).

#### 2.4.3.1 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD)

O RAPD é basicamente uma modificação do protocolo de PCR, com duas características distintas: utiliza um único *primer* curto com até 10 bases, e este, tem sequência arbitrária. Para que a amplificação seja realizada duas sequências de DNA complementares ao *primer* devem estar suficientemente próximas (menor que 4000 pares de bases) e em orientação oposta permitindo a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela enzima DNA polimerase (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; GONZÁLEZ, 1998).

As técnicas baseadas na amplificação com apenas um *primer* são projetadas para detectar mudanças na sequência no sítio do *primer*. Uma substituição dentro das 10 bases do sítio afetará a eficiência da amplificação, alterando o padrão de fragmentos produzidos por um determinado *primer*. Além disso, a amplificação de uma sequência de DNA também será afetada por inserções ou deleções nas bases situadas entre os sítios do *primer* (CAETANO-ANOLLES et al., 1991; CAETANO-ANOLLÉS; BASSAM, 1993; GONZÁLEZ, 1998).

#### 2.4.3.2 PCR *fingerprinting*

A técnica de DNA *fingerprinting* consiste em utilizar *primers* que hibridizam de forma específica em várias regiões do genoma do organismo alvo. Inicialmente deve-se estabelecer o padrão mínimo de amplificação da espécie estudada, servindo como o primeiro parâmetro de distinção interespecífica. O polimorfismo do perfil de amplificação por estes *primers* deve refletir a variabilidade genômica entre indivíduos ou populações de indivíduos de uma determinada espécie, servindo também para análise de discriminação intra-específico (LUCENA, 2004).

Outros métodos têm sido aplicados para *Saccharomyces* utilizando

PCR/RFLP envolvendo fragmentos amplificados de sequências do DNA ribossomal (HENNEQUIN et al., 2001; CASAREGOLA et al., 2001).

#### 2.4.3.3 Amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats - ISSR)

Modificações na base do sistema do marcador microssatélite geraram o marcador ISSR. A técnica é rápida e fácil para visualizar polimorfismos a nível inter e intraespecífico (WEISING et al., 1995) e consiste na utilização da própria sequência do microssatélite como *primer* de amplificação do DNA, de modo que o polimorfismo é detectado pela variação de comprimento e número das sequências amplificadas (LATOUCHE et al., 1997).

Esta técnica envolve amplificações de DNA genômico utilizando um único *primer*. Além da desobrigação de obter informações sobre a sequência que flanqueia parte do genoma, a análise de ISSR é tecnicamente mais simples do que muitos outros sistemas marcadores. O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas (LIU; WENDEL, 2001).

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae*

A identificação e caracterização de linhagens de populações de *S. cerevisiae* são de grande importância para a compreensão do processo fermentativo da cachaça, uma vez que a qualidade da bebida pode depender das linhagens prevalentes durante o processo, principalmente em termos de sua dinâmica e ocorrência (ARAUJO et al., 2007).

Estudos têm sido realizados em diversas destilarias de cachaça localizadas em diferentes estados do Brasil, visando à caracterização molecular de leveduras envolvidas no processo fermentativo da cachaça (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2007; GOMES et al., 2007; VIANNA et al., 2008; BERNARDI et al., 2008; GOMES et al., 2009b; BADOTTI, 2009).

Pataro e colaboradores (2000) analisaram a diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* a partir de análise de cariótipo, hibridização de cromossomos e



PCR com o *primer* E11 (5'- CTGGCTTGGTGTATGT – 3'), um *primer* complementar os sítios de processamento de íntron composto por regiões mutáveis no genoma de *Saccharomyces*. O uso das três técnicas moleculares revelou uma alta diversidade molecular para as linhagens prevalentes de *S. cerevisiae* em três fermentações onde havia uma grande variação no perfil molecular tanto entre as linhagens isoladas de destilarias diferentes quanto entre aquelas isoladas de uma mesma dorna. Além disso, essas técnicas mostraram-se úteis para o estudo da sucessão de linhagens fermentativas de *S. cerevisiae* durante o curto ciclo de produção artesanal da cachaça.

Guerra et al. (2001) observaram durante um ciclo de 24 horas, em três destilarias de Minas Gerais pelos métodos de análise de cariótipo e RAPD com o *primer* M13 (5'- GAGGGTGGCGGTTCT – 3') e E11, que *S. cerevisiae* foi a principal levedura responsável pela condução da fermentação, sendo verificada a presença de diferentes linhagens ao longo do processo. Esta diversidade molecular encontrada entre as linhagens de *S. cerevisiae* pode ser devida às características de produção da cachaça. De acordo com os autores o ciclo fermentativo é curto, dura em torno de 18 a 30 h, a temperatura varia de 25 a 40°C, com altas concentrações de açúcar e de álcool, além de ciclos fermentativos diários durante quatro a seis meses do ano. Essas características podem agir como uma forte pressão seletiva sobre as linhagens e explicar o alto polimorfismo cromossômico observado.

Araújo et al. (2007) monitoraram populações de *S. cerevisiae* em três dornas de fermentações espontâneas no início, meio e final do período de produção. A diferenciação entre as linhagens isoladas de *S. cerevisiae* indígenas foi feita pela análise de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA), RAPD-PCR com os *primers* OPA1 (5'-CAGGCCCTTC-3') e M13, e PCR com o *primer* E11. As análises dos perfis de restrição do mtDNA mostraram a ocorrência de 12 perfis diferentes, sendo 11 correspondentes as leveduras indígenas e um a uma linhagem comercial de levedura de panificação, enquanto os métodos baseados em PCR permitiram a diferenciação de 41 perfis moleculares. Ambos os métodos mostraram flutuações populacionais nas linhagens de *S. cerevisiae* durante o período de produção da cachaça e entre as diferentes dornas da destilaria.

Gomes et al. (2007) utilizaram mtDNA-RFLP para monitorar três dornas com linhagens iniciadoras de *S. cerevisiae* (UFMG-A829, UFMG-A905 e UFMG-A1007), selecionadas em amostras coletadas durante início, meio e final de dois períodos fermentativos, e uma dorna com fermentação espontânea. A linhagem *S. cerevisiae* UFMG-A829 prevaleceu durante os dois experimentos (1º experimento foi realizado nos dias 7, 14, 21, 28 e 35 depois do início do processo fermentativo e no 2º experimentos nos dias 7, 14 e 25 dias), resultado similar foi encontrado para *S. cerevisiae* UFMG-A1007, exceto no final do segundo experimento onde foi encontrada outra linhagem indígena. As fermentações inoculadas com *S. cerevisiae* UFMGA905 foram eliminadas após 14 dias de fermentação. As linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação espontânea apresentam quatro distintos perfis de restrição no 1º experimento e seis perfis no 2º experimento.

Vianna et al. (2008) também utilizaram a técnica mtDNA-RFLP no estudo de seleção de linhagens de *S. cerevisiae*, onde foram detectados oito perfis moleculares dentre nove linhagens selvagens e uma comercial de *S. cerevisiae*. Três linhagens apresentaram perfis moleculares similares, porém estas apresentaram diferenças fisiológicas realizadas neste estudo. Esses resultados indicam que essas linhagens podem ser variantes uma das outras. Segundo os autores, essas variações podem aparecer espontaneamente como resultado de estresse que impactam o DNA durante a fermentação, de modo que essas linhagens podem ser favoravelmente selecionadas e conseqüentemente estarem bem adaptadas ao ambiente estressante.

Bernardi et al. (2008) estudaram a diversidade genética de populações de *S. cerevisiae* através de PCR usando o *primer* SCREC114, PFGE e mtDNA-RFLP. Alguns alambiques que tiveram alta frequência de linhagens de *S. cerevisiae* caracterizadas por PCR e PFGE mostraram baixa diversidade genética através do RFLP.

Oliveira et al. (2008) analisaram a diversidade de *S. cerevisiae* por meio de PCR-RFLP, RAPD, amplificação de microsatélite, mtDNA-RFLP e PFGE. A utilização dos métodos, RAPD e PCR com *primers* baseados no sítio de *splicing* de *intron* que flanqueiam a região do gene *COX1*, bem como, as análises de microsatélites não foram suficientes para diferenciar as linhagens.

Entretanto, a análise de cariótipo por PFGE mostrou distinção clara entre todas as linhagens estudadas.

Gomes et al. (2009b) testaram duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae* UFMG-A829, isolada de fermentação espontânea de cachaça, e *S. cerevisiae* K1-V1116, linhagem comercial de origem vinícola) como iniciadoras em uma destilaria de cachaça. O monitoramento das linhagens durante a fermentação foi determinada por RAPD utilizando o *primer* M13. As duas linhagens predominaram nas dornas de fermentação por aproximadamente 30 dias mostrando ser promissoras para serem utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo para a produção da cachaça. Leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* indígenas, as quais apresentaram perfis moleculares distintos em relação às linhagens iniciadoras, também foram isoladas, porém, em menor proporção durante o experimento. A caracterização das linhagens que potencialmente podem ser utilizadas como iniciadoras, bem como o monitoramento de linhagens por técnicas moleculares são importantes para a determinação do tempo que estas linhagens permanecem no processo de fermentação (GOMES et al., 2009b).

Outra técnica que está sendo utilizada para a diferenciação de linhagens de leveduras é a amplificação utilizando iniciadores de microssatélites. Alguns microssatélites têm sido utilizados com sucesso para caracterização e discriminação de linhagens de *S. cerevisiae* (BALEIRAS COUTO et al., 1996; SILVA FILHO, 2003). Silva-Filho et al. (2005) utilizou o *primer* (GTG)<sub>5</sub> para mostrar a sucessão de leveduras durante a fermentação de álcool combustível. Os resultados mostraram que linhagens de *S. cerevisiae* indígenas presentes no caldo-de-cana podem ser mais adaptadas ao processo industrial de álcool. Os autores também identificaram que linhagens *S. cerevisiae* indígenas dominaram a população de leveduras. Os resultados confirmaram o potencial deste marcador como ferramenta rápida e confiável para discriminação de levedura ao nível de linhagens e espécie.

Gonçalves et al. (2009) estudaram a diversidade de 32 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de uma cachaçaria do semi-árido baiano por meio das técnicas de ISSR, com *primer* específico (GTG<sub>5</sub>), e do RFLP do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. A técnica de ISSR encontrou 22

diferentes perfis, enquanto o RFLP apresentou 7 tipos, ambas mostraram a presença de um perfil dominante durante todo o ciclo fermentativo.

Outros trabalhos utilizando técnicas moleculares mais frequentes na caracterização de linhagens de levedura em bebidas fermentadas, durante os últimos 8 anos, seguem descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Técnicas moleculares mais frequentemente utilizadas na caracterização de cepas de levedura de bebidas fermentadas, nos últimos 8 anos.

Técnica	Espécies estudadas	Tipo de fermentação	Referências	
PCR-RFLP	<i>S. bayanus</i>	vinho	Valero et al., 2007	
	<i>S. cerevisiae</i>			
	<i>S. paradoxus</i>			
	<i>S. pastorianus</i>			
PFGE	não- <i>Saccharomyces</i>	vinho	Valero et al., 2007	
mtDNA-RFLP	<i>Saccharomyces</i>	vinho	Mercado et al., 2007	
	<i>S. cerevisiae</i>	vinho	Schuller et al., 2005	
	<i>S. cerevisiae</i>	vinho	Comi et al., 2000	
	<i>S. cerevisiae</i>	cachaça	Silva et al., 2009	
	<i>S. cerevisiae</i>	cachaça	Marini et al., 2009	
PCR	<i>Saccharomyces</i>	vinho	Mercado et al., 2007	
	<i>Candida diversa</i>	vinho	Hierro et al., 2006	
	<i>Candida tropicalis</i>			
	<i>Candida stellata</i>			
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>			
	<i>H. osmophila</i>			
	<i>Issatchenkia terricola</i>			
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>			
	<i>Issatchenkia hanoiensis</i>			
	<i>Issatchenkia orientalis</i>			
	<i>Zygoascus hellenicus</i>			
	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>			
	<i>S. cerevisiae</i>	álcool combustível		Silva-Filho et al., 2005
	PCR (GTG <sub>5</sub> ), mtDNA-RFLP e PFGE	<i>S. bayanus</i>		vinho
<i>S. cerevisiae</i>				
<i>S. paradoxus</i>				
<i>S. pastorianus</i>				
PCR e PFGE	<i>S. cerevisiae</i>	vinho	Vilanova et al., 2003	

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a diversidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas em diferentes alambiques do estado da Bahia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras de seis destilarias do estado da Bahia durante e o ciclo fermentativo;

- Identificar por métodos fisiológicos as linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas no processo de fermentação na produção de cachaça;

- Diferenciar as linhagens de *S. cerevisiae* por meio da análise de polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA-RFLP);

- Analisar a variabilidade genética das linhagens de *S. cerevisiae* por meio do mtDNA-RFLP mensurando o número de *loci*, número de *loci* exclusivos e proporção de *loci* polimórficos e utilizando a análise molecular de variância, o coeficiente médio de dissimilaridade de Nei e Li (1979) e o programa STRUCTURE.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Para o isolamento das leveduras do mosto de cana-de-açúcar foram selecionados seis alambiques do estado da Bahia localizados nos municípios de Ibirataia (DEST1), Jaguaripe (DEST2), Ilhéus (DEST3), Condeúba (DEST4), Caculé (DEST5) e Rio de Contas (DEST6) (Figura 3) no período de julho a novembro de 2007.

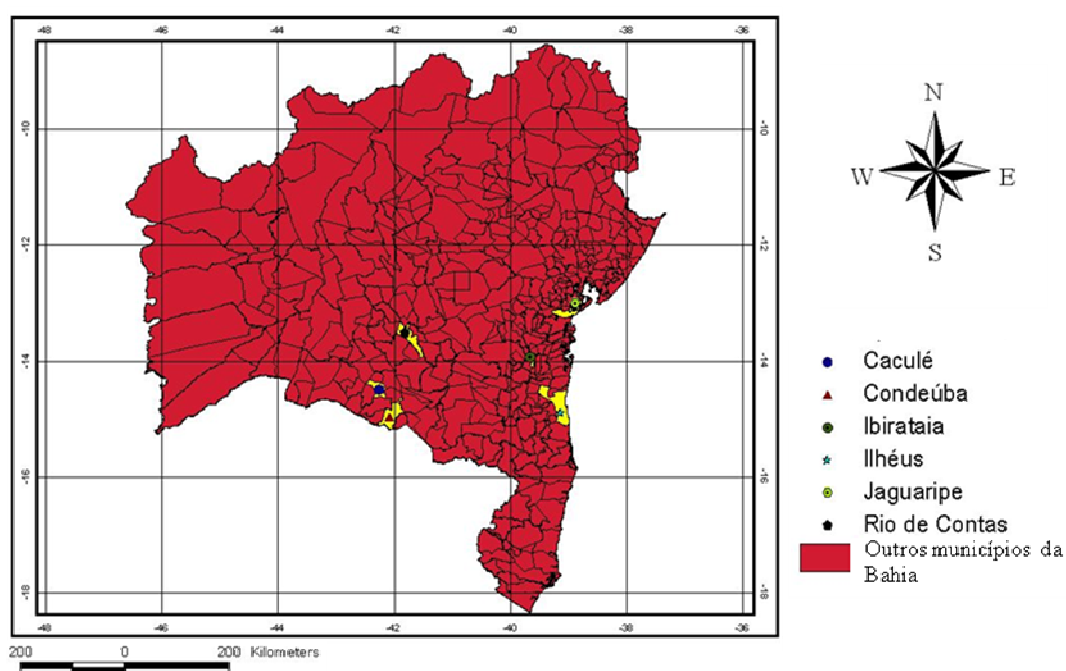


Figura 3. Mapa dos pontos de coleta determinado pelo sistema de informação geográfica (ArcViewGIS 3.3 Departamento de Geociências, UEFS, Bahia). MAPA: Frederic Mendes Hughes.

As amostras foram coletadas de uma dorna da fermentação espontânea, de cada destilaria, desde o início da fermentação ( $T_0$  = tempo zero) e depois em intervalos de decréscimo a cada 2% Brix até 0% Brix, etapa final do ciclo fermentativo. O Brix (%) foi aferido através de um sacarímetro. Com cada amostra foram feitas diluições decimais seriadas em tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%, sendo retirada uma alíquota de 0,1 mL das diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-10}$  e transferidas assepticamente para uma placa de Petri contendo ágar SCY (caldo-de-cana 10%, extrato de levedura 0,1%, ágar





de sódio 0,2%) a 28 °C, sob rotação (200 rpm), após o período de 24 horas foi acrescido de 15% glicerol e depositado no ultrafreezer a – 85 °C, de acordo com Kirsop e Kurtzman (1988).

Posterior identificação foi realizada utilizando como critério a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e resistência/sensibilidade ao antifúngico cicloheximida. A preparação dos meios de cultura foi realizado com adição de base de nitrogênio para levedura à 0,67% (DIFCO), ágar 2% e as fontes de carbono a 0,5%: glicose (AMRESCO), sacarose (MERCK) ou D-manitol (MERCK). Para a análise de assimilação de fonte de nitrogênio foi utilizado base de carbono para levedura 1,17% (DIFCO), ágar 2% e lisina 0,056% (MERCK). A análise de resistência/sensibilidade ao antifúngico cicloheximida foi realizada com base de nitrogênio para levedura 0,67% (DIFCO), glicose 0,5%, cicloheximida 0,01% (SIGMA) e 2% de ágar. Foram utilizados como controle de crescimento residual das leveduras os meios compostos por: base de carbono para levedura 1,17% (DIFCO); ágar 2% e base de nitrogênio para levedura 0,67% (DIFCO) e ágar 2%. Todas as placas foram incubadas a 28 °C.

As análises dos resultados foram realizadas no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia, apenas a leitura da sacarose foi realizada somente no quinto dia. Para a leitura dos resultados foram considerados dois grupos, segundo Kurtzman; Fell (1997):

- a) *S. cerevisiae*: glicose (+), sacarose (+), D-manitol (-), lisina (-) e sensível à cicloheximida.
- b) não-*Saccharomyces*: glicose (+), sacarose (+), D-manitol (+), lisina (+) e resistência à cicloheximida.

#### 4.3 POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL

##### 4.3.1 Extração do DNA

A análise de restrição do mtDNA foi realizada conforme descrito por Querol e colaboradores (1992a), com algumas modificações (COMI et al., 2000). As células foram crescidas em 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%; peptona 2% e glicose 1%) por 18 horas e então centrifugadas a 3000 rpm

por 15 min e suspensas em água ultrapura estéril e, em seguida, centrifugada sob as mesmas condições citadas acima. O sedimento foi ressuspendido em 0,5 mL de uma solução de enzima lítica de *Rhizoctonia solani* (SIGMA), contendo 25 mg.mL<sup>-1</sup> de enzima em sorbitol 1M e EDTA 0,1M (pH 7,5). A suspensão foi transferida para tubos de 1,5mL e incubadas a 45 °C por 2 horas com agitação a cada 30 min. Os esferoplastos obtidos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e suspensos em 0,5 mL de solução de Tris HCl 50 mM e EDTA 20 mM (pH 7,4). Foram adicionados 13 µL de SDS 10% e incubado à 65 °C por 5 min. Após isso, 0,2 mL de acetato de potássio 5M foram adicionados e os tubos foram mantidos em banho de gelo por 10 min. Novamente foram centrifugados a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e o DNA foi precipitado com o mesmo volume de isopropanol. A seguir, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 min e centrifugados a 12000 rpm por 10 min. O DNA foi lavado com etanol 70% e, depois de seco, solubilizado em 20 µL de água ultra pura estéril e congelado até o uso.

#### 4.3.2 Digestão enzimática do DNA mitocondrial

Para digestão enzimática do DNA mitocondrial foi utilizada a endonuclease *Hinf* I (Querol et al., 1994). O DNA, 10µL, foi adicionado a um mix contendo 1 µL enzima de restrição *Hinf* I (INVITROGEN) na concentração de 10 U/µL, 2 µL de tampão da enzima de restrição (INVITROGEN), 1 µL de inibidor de ribonuclease (INVITROGEN) a 20 mg/mL e 6 µL de água ultra pura estéril. Após a incubação por seis horas a 37 °C, os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2). O marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (INVITROGEN) foi utilizado com padrão de peso molecular. Após tratamento com brometo de etídio durante 30 min, os perfis de restrição do mtDNA gerados foram visualizados em transluminador e fotografados.

#### 4.3.3 Gráficos de frequência e riqueza

Após o diagnóstico dos tipos e números dos perfis moleculares durante os ciclos fermentativos das seis destilarias estudadas, obtidos por meio do RFLP do DNA mitocondrial, foram confeccionados gráficos de frequência e riqueza a partir do programa Microsoft Office Excel 2003. A frequência foi definida em porcentagem correspondendo ao número de perfis encontrados versus o número de colônias analisadas (QUEROL et al., 1994) para cada tempo de coleta (% Brix). A riqueza foi dada pelo número de perfis moleculares em cada tempo de coleta.

#### 4.4 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *S. cerevisiae*

As fotografias dos géis foram processadas no programa Gelcompar II versão 5.0 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) para normalizar as bandas de acordo com o marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder) utilizado nas corridas de eletroforese. Para construção da matriz os dados foram interpretados como presença (1) ou ausência (0) de bandas. Com base nesta matriz foi mensurado o número de loci (N), números de loci exclusivos (NLE) e proporção de loci polimórficos (P) utilizando o método de Lynch e Milligan (1994), para dados que assumissem o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o programa GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

A análise molecular de variância – AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992), foi realizada no programa GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Foram conduzidos dois tipos de análises, com 999 permutações, para avaliar a variabilidade entre as seis populações de *S. cerevisiae* considerando todas as populações como único grupo a fim de obter uma medida de variação geral entre as populações de *S. cerevisiae*.

O coeficiente médio de dissimilaridade entre as populações foram calculados utilizando o complemento do coeficiente de Nei e Li (1979) por meio do programa estatístico GENES versão 2008.6.0, expresso por

$$Dis = 1 - [2a / (2a + b + c)]$$

Em que “Dis” representa a dissimilaridade entre as populações, “a” representa número de coincidências do tipo 1-1 para cada par de acessos, “b” é número de discordâncias do tipo 1-0 para cada par de acessos e “c” é o número de coincidências do tipo 0-1 para cada par de acessos (CRUZ, 2008).

As populações foram agrupadas seguindo os critérios de dissimilaridade pelo método hierárquico das médias aritméticas das medidas de dissimilaridade (UPGMA) utilizando o programa GENES versão 2008.6.0 (CRUZ, 2008). O dendrograma é estabelecido com base nas médias de dissimilaridade dos pares das populações, sendo apresentadas graficamente as ramificações que indicam o nível de similaridade entre elas (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

O teste de Mantel (MANTEL, 1967) foi utilizado para investigar a correlação entre distância geográfica e divergência genética (dadas pela dissimilaridade de Nei e Li, 1979) nas populações amostradas, através do programa GENES versão 2008.6.0 (CRUZ, 2008) com 1000 simulações. Com este objetivo a matriz de distância geográfica foi obtida estimando a distância geográfica linear em quilômetros (Km) entre as seis populações amostradas, usando o aplicativo ArcViewGIS 3.3.

O programa STRUCTURE versão 2.3.1 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) foi utilizado para diferenciar os pools gênicos através da composição alélica de cada indivíduo e a estimativa de estrutura nas populações. As simulações foram realizadas utilizando o modelo de mistura por ancestralidade (admixture – Q) e o modelo de correlação para as frequências alélicas (FALUSH et al., 2003). Foram empregadas 50.000 cadeias como burn-in (para a configuração inicial da estimativa dos parâmetros) e 50.000 cadeias (MCMC – Markov Chain Monte Carlo), partindo de K=2 até K=6 com 20 interações para cada K. O cálculo  $\Delta K$  foi realizado para corrigir a variância da probabilidade posterior entre as corridas de cada K, de acordo com EVANNO et al. (2005). Este método é baseado na estimativa taxa de variação da probabilidade log de dados entre valores de K sucessivos, tornando notória a quebra na inclinação da distribuição de L (K) e demonstrando o verdadeiro valor K (EVANNO et al. 2005).

Segundo Evanno et al. (2005) para calcular o  $\Delta K$  deve-se: (1) calcular a média dos valores de  $L(K)$  que foram gerados das 20 interações para cada suposto  $K$ ; (2) em seguida fazer a diferença das médias entre os valores sucessivos de  $K$  [ $L(K) = L(K) - L(K-1)$ ]; (3) e em uma terceira etapa traçar a diferença entre os valores sucessivos de  $L(K)$ , [ $L''(K) = [L'(K+1) - L'(K)]$ ]; (4) e finalmente, o  $\Delta K$  é estimado com os valores das médias de [ $L''(K)$ ] dividido pelo desvio padrão, sendo:

$$\Delta K = m[L(K+1) - 2 L(K) + L(K-1)] / s[L(K)].$$

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONTAGEM, PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

A partir da contagem das unidades formadoras de colônia de leveduras por mililitro do mosto de fermentação (UFC.mL<sup>-1</sup>) foram encontrados valores expressados na Tabela 2. Durante os ciclos fermentativos também foram observadas flutuações no número de UFC.mL<sup>-1</sup> entre os intervalos de tempo dentro de uma mesma destilaria, exceto a destilaria 6 (DEST6) que apresentou um aumento no número de UFC.mL<sup>-1</sup> até 20% Brix e, em seguida, houve o decréscimo da população até a finalização do ciclo fermentativo (Tabela 2).

Obteve-se o total de 358 isolados de leveduras das seis destilarias, os quais foram todos preservados a -85°C. Dentre eles, 330 foram identificados, por testes fisiológicos, como linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e as demais (28 isolados) receberam a designação de leveduras não-*Saccharomyces*. A Figura 5 ilustra a caracterização fisiológica de algumas leveduras isoladas da destilaria 4 (DEST4) e destilaria 5 (DEST5). Os isolados de *S. cerevisiae* foram caracterizados através do método de polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial.

Tabela 2. Ocorrência de populações de leveduras em diferentes estágios do ciclo fermentativo nas diferentes concentrações de sólidos solúveis totais (% Brix) no mosto de seis destilarias de cachaça de alambique da Bahia. Valores expressos em populações de 10<sup>7</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>DEST1</b>									
Brix (%)	12,5	11	9,5	7	5	3,5	2	0	
Tempo (h)	0	1:38	3:00	4:00	5:20	6:30	7:56	10:00	
UFC/mL	4,2	100	40	94,3	11,7	26	22,3	3,5	–
<b>DEST2</b>									
Brix (%)	14	11	9	8	6	5	2	0	
Tempo (h)	0	10:00	20:00	30:00	40:00	50:00	68:05	82:25	
UFC/mL	2,1	8,3	4,8	6,4	7	6,1	5,6	4,6	–
<b>DEST3</b>									
Brix (%)	13	11	9	7	5	3	1,6	0	
Tempo (h)	0	1:30	4:40	6:30	9:25	11:54	14:23	17:48	
UFC/mL	18,6	56	3,2	18,3	18,6	16,6	6,2	4,7	–

Tabela 2. Continuação

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>DEST4</b>									
<b>Brix (%)</b>	10	8	6	4	2	0			
<b>Tempo (h)</b>	0	12:00	24:48	35:16	50:16	75:51			
<b>UFC/mL</b>	0,74	4,2	6,1	0,64	0,64	6,4	–	–	–
<b>DEST5</b>									
<b>Brix (%)</b>	16	14	12	10	8	6	4	2	0
<b>Tempo (h)</b>	0	2:23	3:27	5:03	6:39	8:02	9:01	10:32	11:39
<b>UFC/mL</b>	7,5	38	25,3	40,3	23,6	22,3	27	4	2
<b>DEST6</b>									
<b>Brix (%)</b>	23	20	17	14	11	8	5	2	0
<b>Tempo (h)</b>	0	7:35	11:35	16:05	22:25	28:45	38:06	45:09	65:19
<b>UFC/mL</b>	11,6	39,6	16,3	8,5	6,3	6,5	4,1	1,3	0,6

“-” Coleta não realizada devido à finalização do ciclo fermentativo.

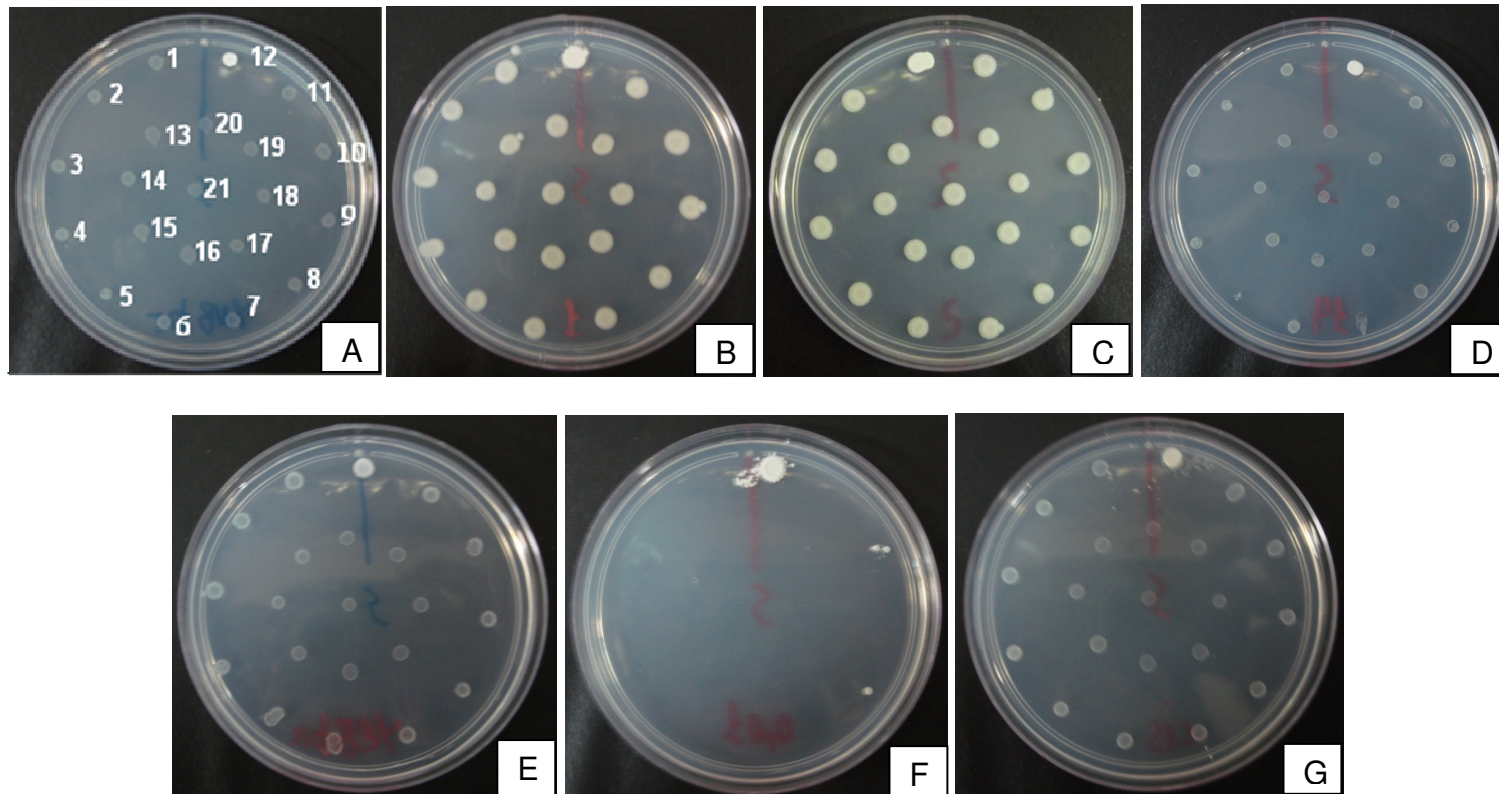


Figura 5. Ilustração da caracterização fisiológica das leveduras da série S (Destilaria “DEST4” de 1 a 13 e “DEST5” de 14 a 21). A) Base de nitrogênio para levedura: crescimento residual, resultado considerado negativo (-), exceto para a levedura número 12; B) Glicose: crescimento (+) de todas as leveduras; C) Sacarose: crescimento (+) para todas as leveduras; D) D-Manitol: resultado (-) para todas as leveduras, exceto para o número 12; E) Base de carbono para levedura: crescimento residual (-), exceto para a levedura número 12, F) Cicloheximida: resultado (-) para todas as leveduras, exceto para o número 12) e G) Lisina: crescimento (-) para todas as leveduras, exceto para o número 12). FOTOS: Luis Henrique Rosa.



## 5.2 POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL

Todas as destilarias estudadas apresentaram a presença de pelo menos um perfil molecular dominante durante todo o ciclo fermentativo. Ao todo foram encontrados 30 diferentes perfis moleculares (padrões de bandas), correspondente a 9,09% do total de colônias estudadas. Os perfis foram únicos para cada destilaria, correspondendo a um alto polimorfismo genético das linhagens de *S. cerevisiae* entre as destilarias (Figuras 7, 10, 13, 16, 19 e 22).

A maior riqueza de perfis moleculares foi encontrada na destilaria 3 (DEST3), com oito perfis, e na DEST6 com sete perfis. A destilaria 1 (DEST1) e DEST4 apresentaram cinco perfis moleculares cada e a menor diversidade de perfis moleculares foi detectada na destilaria 2 (DEST2) e DEST5 com três e dois perfis moleculares, respectivamente (Figura 6).

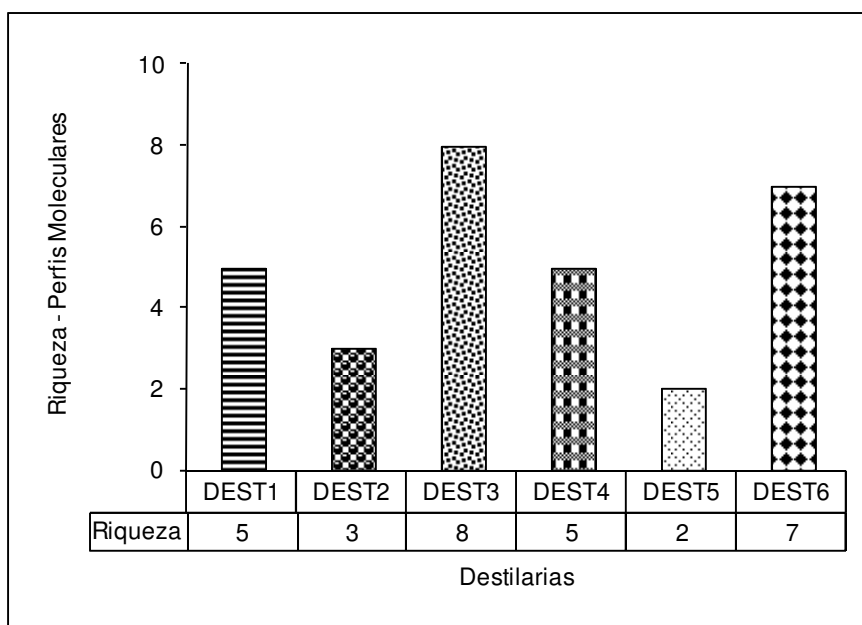


Figura 6. Riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo das seis destilarias estudadas, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I.

Na DEST1 os perfis moleculares “A”, obtidos de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes, e “E”, obtidos de *S. cerevisiae* com morfotipos dominantes, foram predominantes durante o ciclo fermentativo (Tabelas 3 e Figura 7), com frequência variando entre 3,70 – 12,96% e 1,85 - 7,40%, respectivamente (Figura 8). Os outros perfis apresentaram frequência de 1,85 %, o perfil “B” e “C” presente em 11% Brix e o perfil “D” em 7% Brix (Figura 8), o que explica o fato da distribuição da riqueza de perfis ser maior entre o 11 e 7% Brix (Figura 9), nesta destilaria.

A Figura 14 mostra a frequência das linhagens de *S. cerevisiae* durante a fermentação na DEST2, os perfis “F” (obtidos das linhagens de *S. cerevisiae* com morfotipo diferente) e “H” (obtidos das linhagens de *S. cerevisiae* com morfotipo dominante) foram predominantes durante toda fermentação e apresentaram frequências significativas variando de 5,76 - 13,46% e 1,92 - 7,69%, respectivamente. Em 5% Brix, além dos perfis predominantes também foi encontrando o perfil “G” com frequência de 1,92% (Tabela 4 e Figuras 10 e 11), por conseguinte, a maior riqueza foi observada em 5% Brix (Figura 12).

Na DEST3, os perfis “I” e “J” foram predominantes durante o ciclo fermentativo, ambos provenientes de colônias com morfotipos diferentes e dominante (Tabelas 5 e Figura 13). A frequência do perfil “I” variou entre 2,5 – 15% durante toda a fermentação, enquanto o perfil “J” apresentou frequência de 2,5 – 5%. Dentre outros perfis, o “O” apresentou frequência de 5% em 9% Brix, enquanto os demais, “K”, “L”, “M”, “N” e “P”, apresentaram frequência de 2,5% em diferentes valores de Brix (Figura 14). A riqueza de perfis moleculares da DEST3 foi maior em 9, 5 e 0% Brix (Figura 15).

O perfil molecular “Q” foi predominante na DEST4, tanto para as linhagens de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes quanto para os morfotipos dominantes com frequência entre 5,66 – 28,30% (Tabelas 6; Figura 16 e 17). Os demais perfis apresentaram frequência de 1,88%, o perfil “R” em 8% Brix, “S” e “T” em 2% Brix e “U” em 0% Brix (Figura 17), consequentemente a maior riqueza de perfis moleculares foi detectada no início (8% Brix) e no final (2 – 0% Brix) da fermentação (Figura 18).

A DEST5 apresentou apenas o perfil “V” como predominante, presente em colônias de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes, com frequência de 6,89 a 29,31% (Tabela 7; Figura 19). O perfil “W” foi detectado

apenas em 5% Brix com freqüência de 1,72% (Figura 20). A distribuição da riqueza para a DEST5 foi similar a encontrada na DEST2, devido à detecção dos perfis “W” e “V” em 5% Brix (Figura 21).

Para a DEST6 foram considerados dois perfis predominantes, “X” e “Z”, ambos obtidos de colônias com morfotipos diferentes e dominantes, com freqüências variando de 1,66-10% e 1,66-3,33%, respectivamente (Tabela 8; Figuras 22). Os perfis “Y” (obtido de colônia com morfotipo diferente) e “AD” (obtido de colônia com morfotipo dominante) foram presentes somente em 23% Brix, com freqüência de 1,66%. Os perfis “AA” “AB” e “AC” apresentaram freqüência de 1,66%, 1,66-3,33% e 1,66-5%, respectivamente, do meio para o final do ciclo fermentativo (Figura 23). Observaram-se flutuações de riqueza de perfis moleculares na fermentação da DEST6, porém houve maior proporção de perfis durante as seguintes faixas de Brix: 17, 8, 5 e 0% Brix (Figura 24).

Os perfis moleculares “G” e “W”, presentes em diferentes destilarias, apresentaram poucas bandas na análise de restrição do DNA mitocondrial, bem como menor crescimento nos meios de cultura utilizados na caracterização bioquímica e, portanto podem ser consideradas como deficientes respiratórios, linhagens “*petite*”, assim como as linhagens que apresentaram total ausência de bandas no mtDNA-RFLP nas destilarias DEST1 e DEST5 (Figuras 10 e 19).

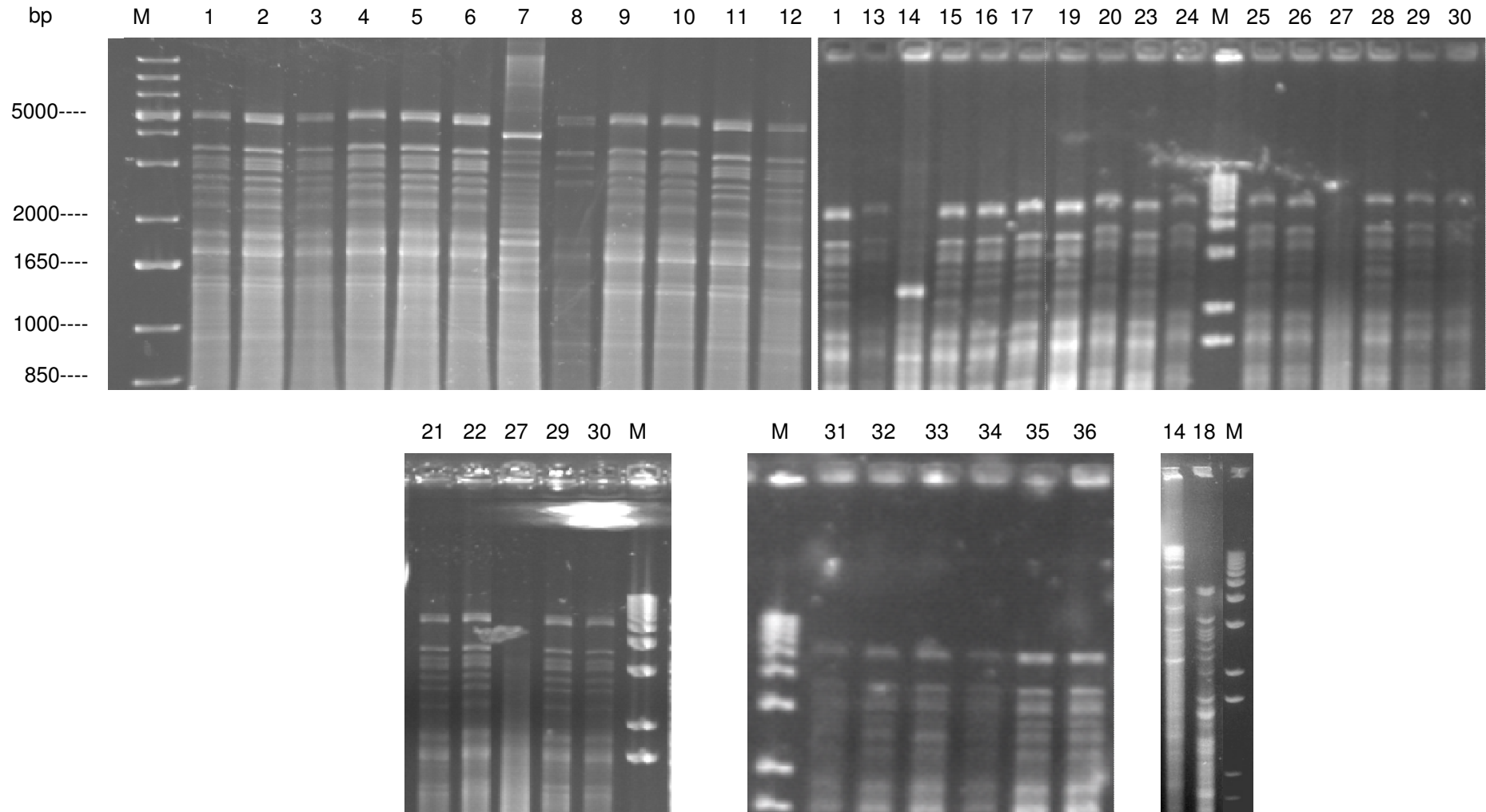


Figura 7. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST1, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 1 a 6, 9 a 13 e 15 a 36: perfil Molecular "A", na pista 7: perfil molecular "B", na pista 8: perfil molecular "C", na pista 14: perfil molecular "D" e na pista 37 a 56: perfil molecular "E".

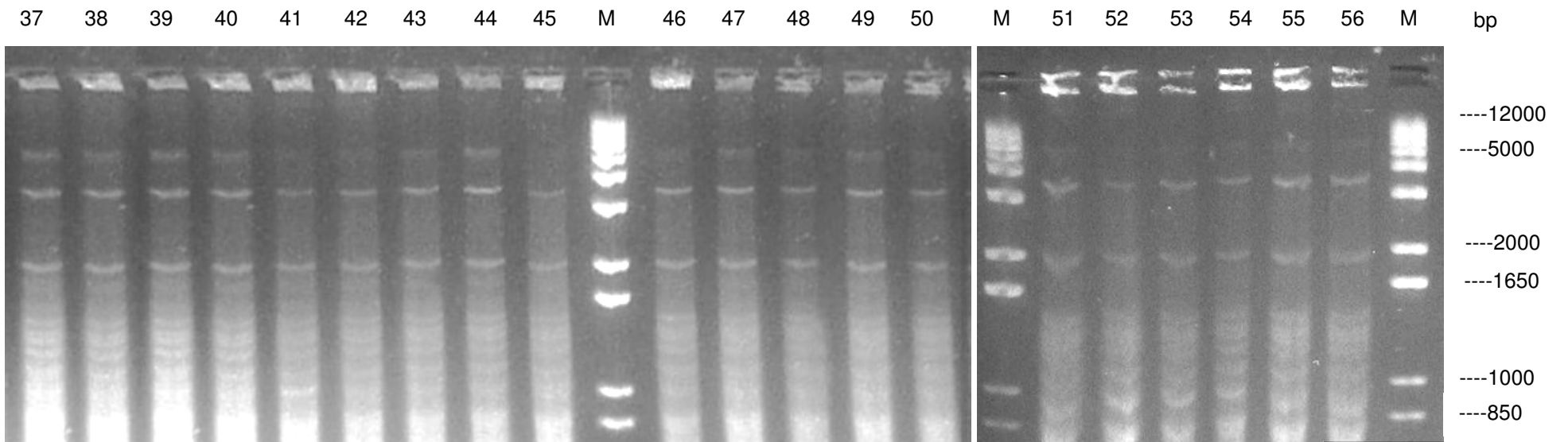


Figura 7: Continuação.

Tabela 3. Dados de coleta (número dos isolados, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST1 localizada no município de Ibirataia-BA.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
1	T0	21	12,5	A
2	T0	21	12,5	A
3	T0	21	12,5	A
4	T0	21	12,5	A
5	T1	24	11	A
6	T1	24	11	A
7	T1	24	11	B
8	T1	24	11	C
9	T2	27	9,5	A
10	T2	27	9,5	A
11	T2	27	9,5	A
12	T2	27	9,5	A
13	T2	27	9,5	A
14	T3	28	7	D
15	T3	28	7	A
16	T3	28	7	A
17	T3	28	7	A
18	T3	28	7	A
19	T4	30	5	A
20	T4	30	5	A
21	T4	30	5	A
22	T5	34	3,5	A
23	T5	34	3,5	A
24	T5	34	3,5	A
25	T6	35	2	A
26	T6	35	2	A
27	T6	35	2	-
28	T6	35	2	A
29	T6	35	2	A
30	T7	34	0	A
31	T7	34	0	A
32	T7	34	0	A
33	T7	34	0	A
34	T7	34	0	A
35	T7	34	0	A
36	T7	34	0	A
37*	T0	21	12,5	E
38*	T0	21	12,5	E
39*	T0	21	12,5	E
40*	T1	24	11	E
41*	T1	24	11	E

Tabela 3: Continuação

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
42*	T2	27	9,5	E
43*	T2	27	9,5	E
44*	T3	28	7	E
45*	T3	28	7	E
46*	T3	28	7	E
47*	T4	30	5	E
48*	T4	30	5	E
49*	T4	30	5	E
50*	T4	30	5	E
51*	T5	34	3,5	E
52*	T6	35	2	E
53*	T6	35	2	E
54*	T7	34	0	E
55*	T7	34	0	E
56*	T7	34	0	E

"-" Não houve o aparecimento de bandas. Experimento repetido 2 vezes.

"\*" Colônia de *S. cerevisiae* com morfotipo predominante.

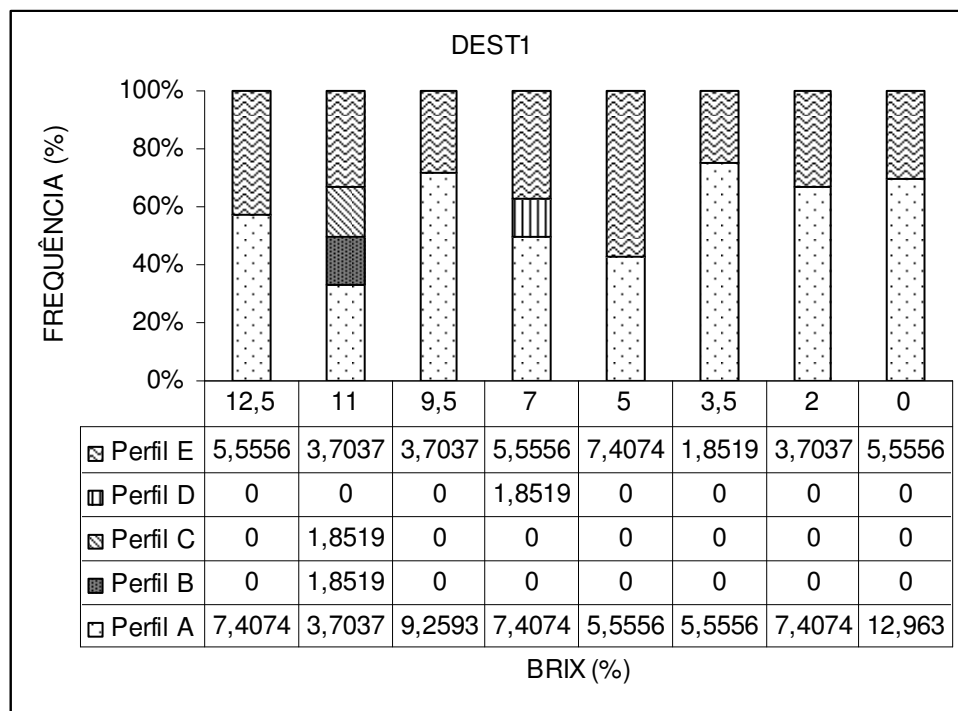


Figura 8. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST1, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

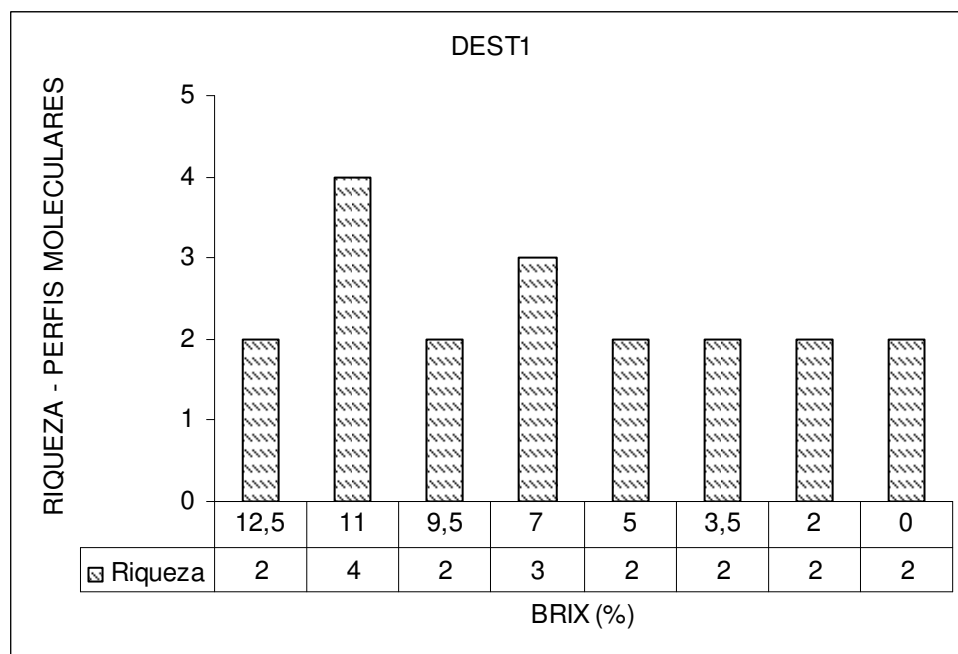


Figura 9. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST1, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).



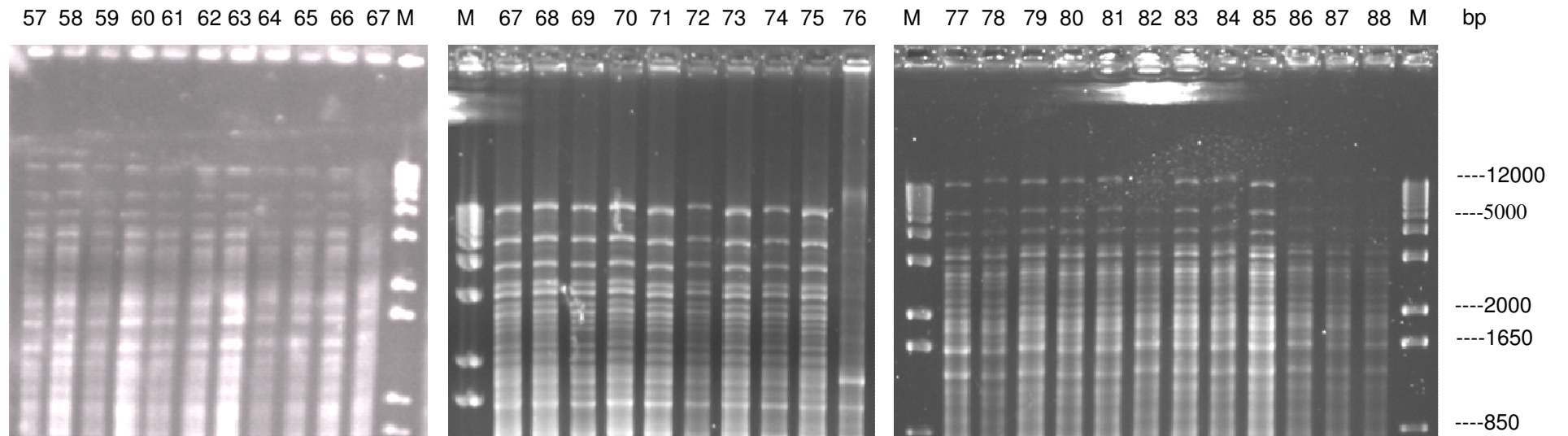


Figura 10. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST2, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 57 a 75 e 77 a 88: perfil Molecular "F", na pista 76: perfil molecular "G" e nas pistas 89 a 108: perfil molecular "H".

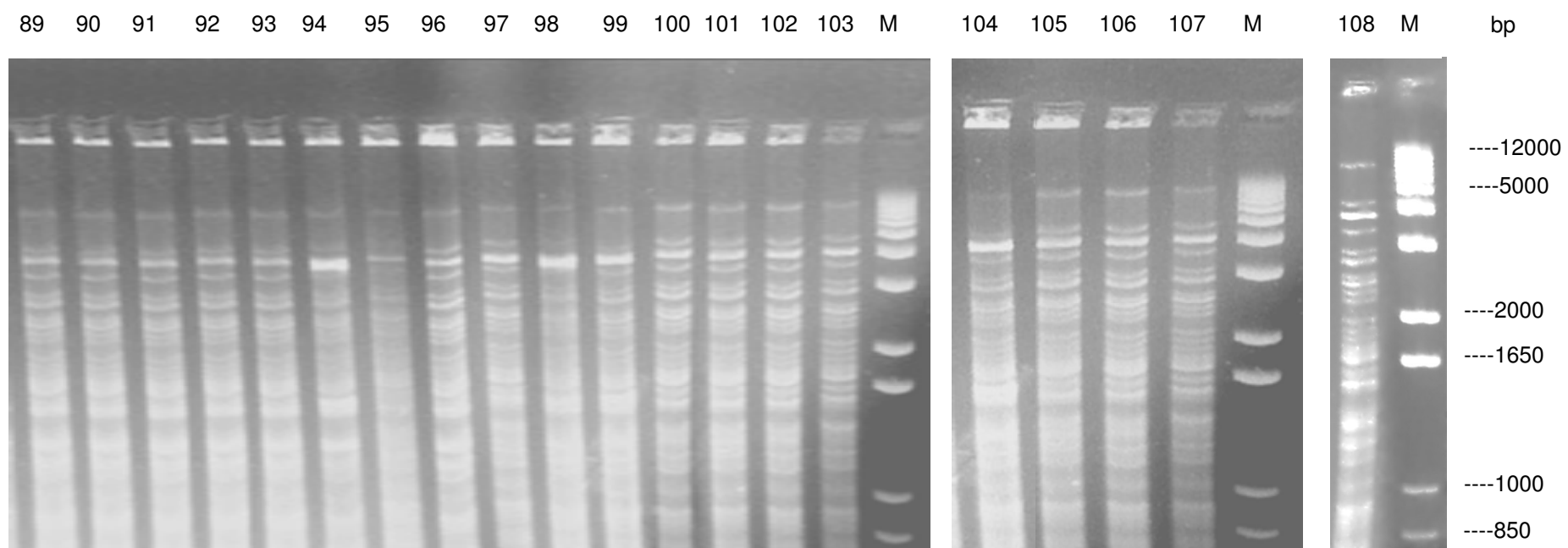


Figura 10: Continuação.

Tabela 4. Dados de coleta (número dos isolados, tempo, temperatura e Brix), e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST2 localizada no município de Jaguaripe-BA.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
57	T0	27	14	F
58	T0	27	14	F
59	T0	27	14	F
60	T1	28	11	F
61	T1	28	11	F
62	T1	28	11	F
63	T1	28	11	F
64	T1	28	11	F
65	T2	28	9	F
66	T2	28	9	F
67	T2	28	9	F
68	T3	30	8	F
69	T3	30	8	F
70	T3	30	8	F
71	T4	30	6	F
72	T4	30	6	F
73	T4	30	6	F
74	T5	31	5	F
75	T5	31	5	F
76	T5	31	5	G
77	T5	31	5	F
78	T5	31	5	F
79	T6	30	2	F
80	T6	30	2	F
81	T6	30	2	F
82	T7	31	0	F
83	T7	31	0	F
84	T7	31	0	F
85	T7	31	0	F
86	T8	29	0	F
87	T8	29	0	F
88	T8	29	0	F
89*	T0	27	14	H
90*	T0	27	14	H
91*	T1	28	11	H
92*	T1	28	11	H
93*	T1	28	11	H
94*	T2	28	9	H
95*	T3	28	8	H
96*	T3	28	8	H

Tabela 4. Continuação.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
97*	T3	28	8	H
98*	T3	28	8	H
99*	T4	30	6	H
100*	T4	30	6	H
101*	T4	30	6	H
102*	T5	31	5	H
103*	T5	31	5	H
104*	T6	30	2	H
105*	T6	30	2	H
106*	T7	31	0	H
107*	T7	31	0	H
108*	T7	31	0	H

\* Colônia de *S. cerevisiae* com morfotipo dominante.

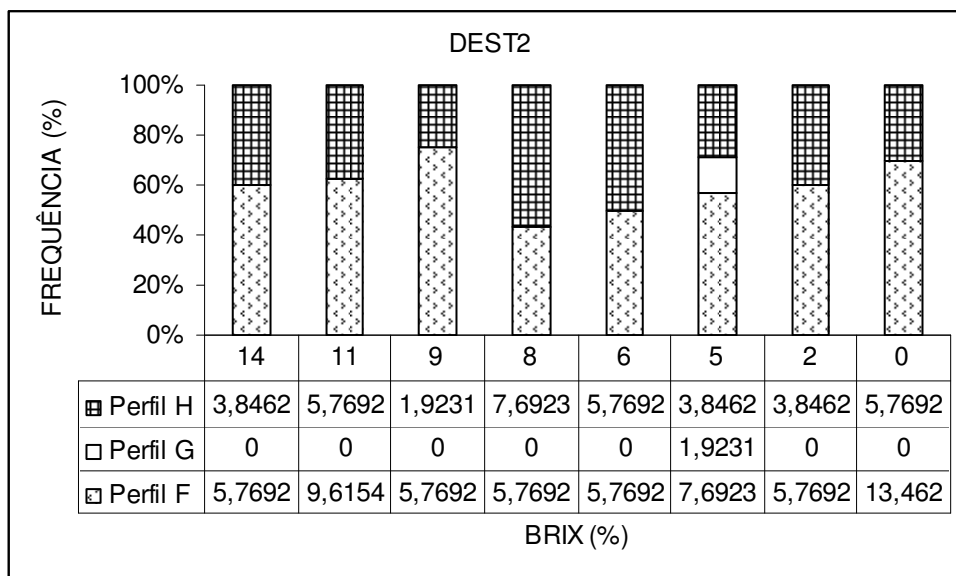


Figura 11. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST2, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

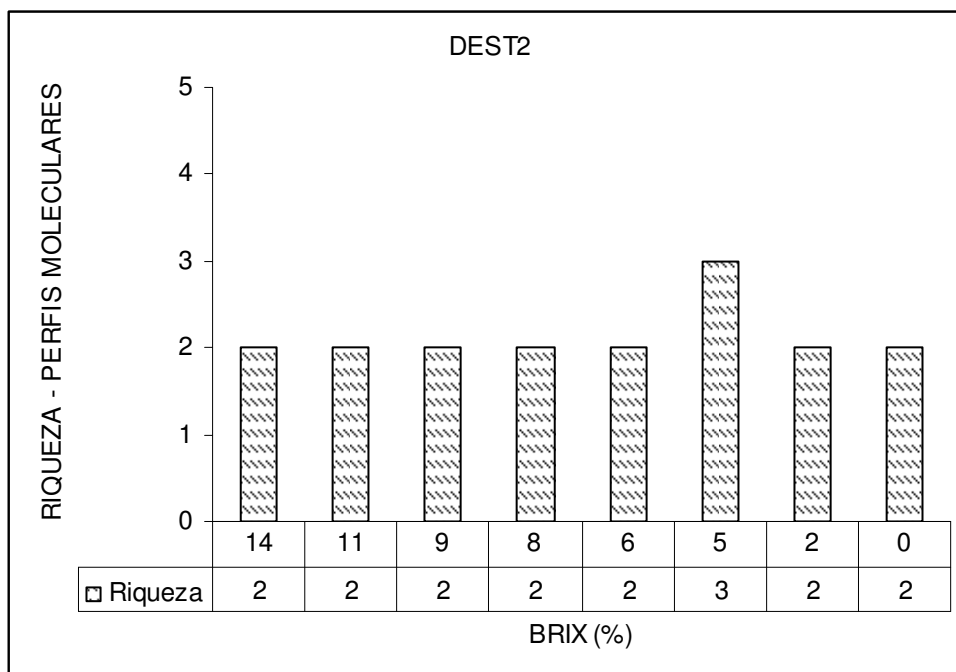


Figura 12. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST2, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

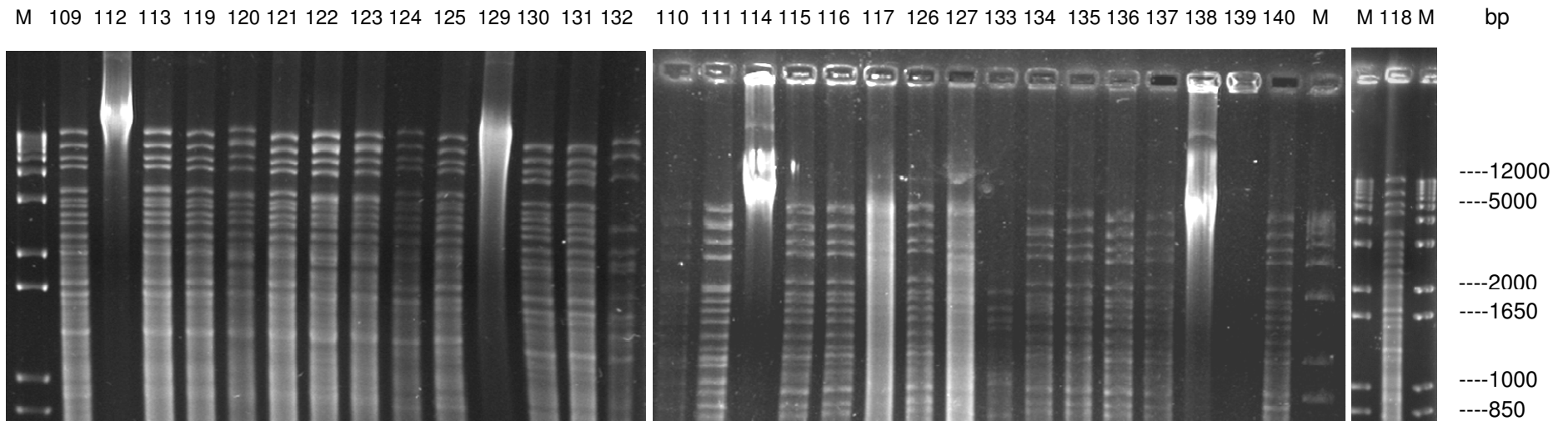


Figura 13. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST3, obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 109 a 119, 121 a 126, 128 a 131, 134 a 142, 144 a 146, 149 e 150, 152, 154 a 156: perfil Molecular "I", nas pistas 120 e 148: perfil molecular "J", na pista 132: perfil Molecular "L", na pista 127: perfil molecular "K", na pista 133: perfil molecular 133, na pista 143: perfil molecular "N", na pista 147: perfil molecular "O", na pista 151: perfil molecular "P".

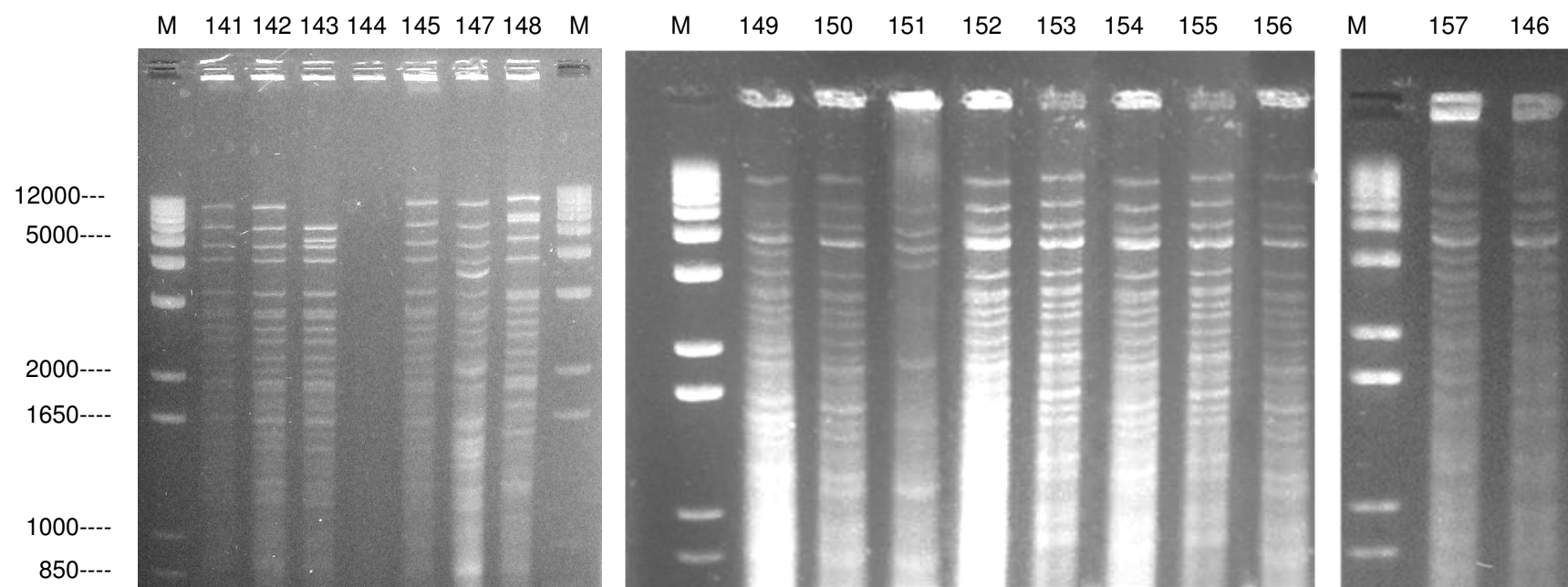


Figura 13. Continuação.

Tabela 5. Dados de coleta (número dos isolados, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST3 localizada no município de Ilhéus-BA.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
109	T0	24	13	I
110	T0	24	13	J
111	T0	24	13	J
112	T1	26	11	-
113	T1	26	11	I
114	T1	26	11	-
115	T1	26	11	I
116	T2	27	9	I
117	T2	27	9	-
118	T2	27	9	I
119	T3	29	7	I
120	T3	29	7	J
121	T3	29	7	I
122	T3	29	7	J
123	T4	31	5	J
124	T4	31	5	I
125	T4	31	5	I
126	T5	33	3	I
127	T5	33	3	K
128	T5	33	3	-
129	T6	33	1,6	-
130	T6	33	1,6	I
131	T6	33	1,6	I
132	T6	33	1,6	L
133	T7	34	0	M
134	T7	34	0	J
135	T7	34	0	I
136	T7	34	0	I
137	T8	27	0	I
138	T8	27	0	-
139	T8	27	0	-
140	T8	27	0	I
141*	T1	26	11	I
142*	T1	26	11	I
143*	T1	26	11	N
144*	T1	26	11	-
145*	T1	26	11	I
146*	T2	27	9	I
147*	T2	27	9	O
148*	T2	27	9	J



Tabela 5: Continuação.

Nº da amostra	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
149*	T2	27	9	O
150*	T2	27	9	I
151*	T4	31	5	P
152*	T5	33	3	I
153*	T5	33	3	I
154*	T5	33	3	I
155*	T5	33	3	I
156*	T7	27	0	I
157*	T7	27	0	I

"-" Não houve o aparecimento de bandas. Experimento repetido 2 vezes.

"\*\*" Colônia de *S. cerevisiae* com morfotipo dominante.

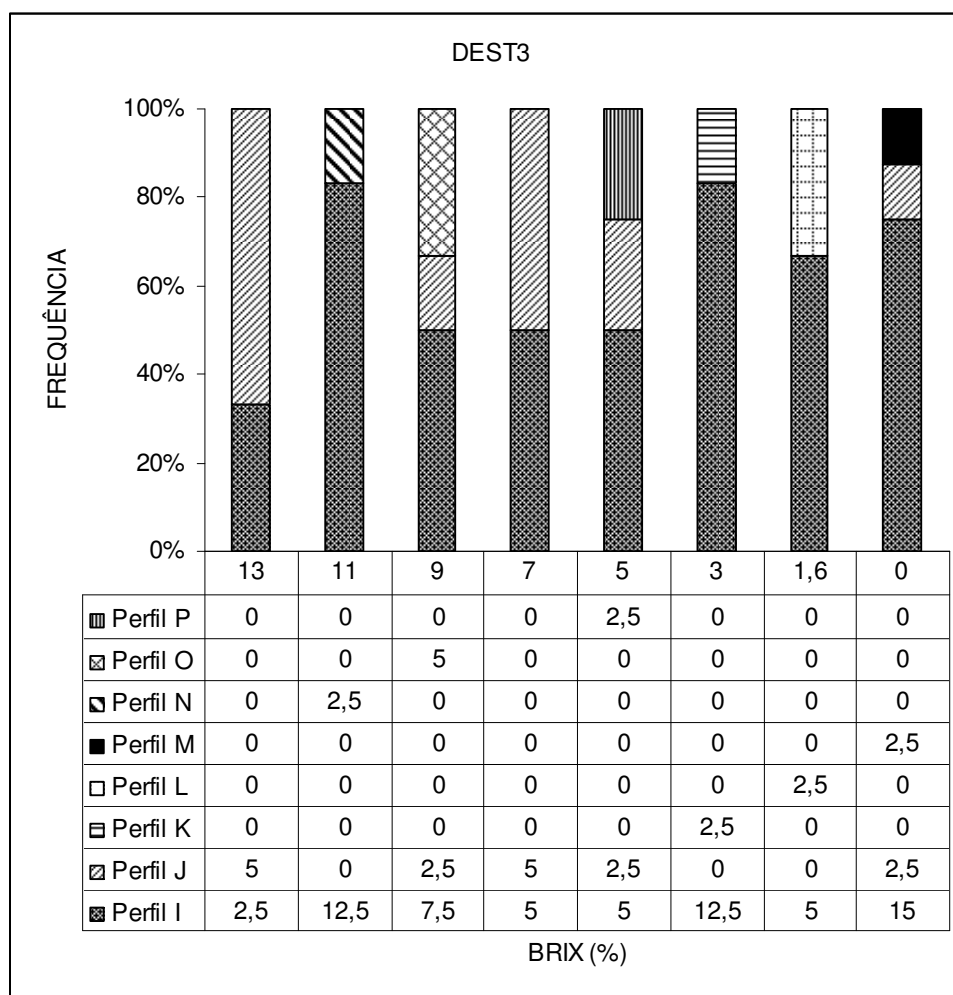


Figura 14. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae*, com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST3, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

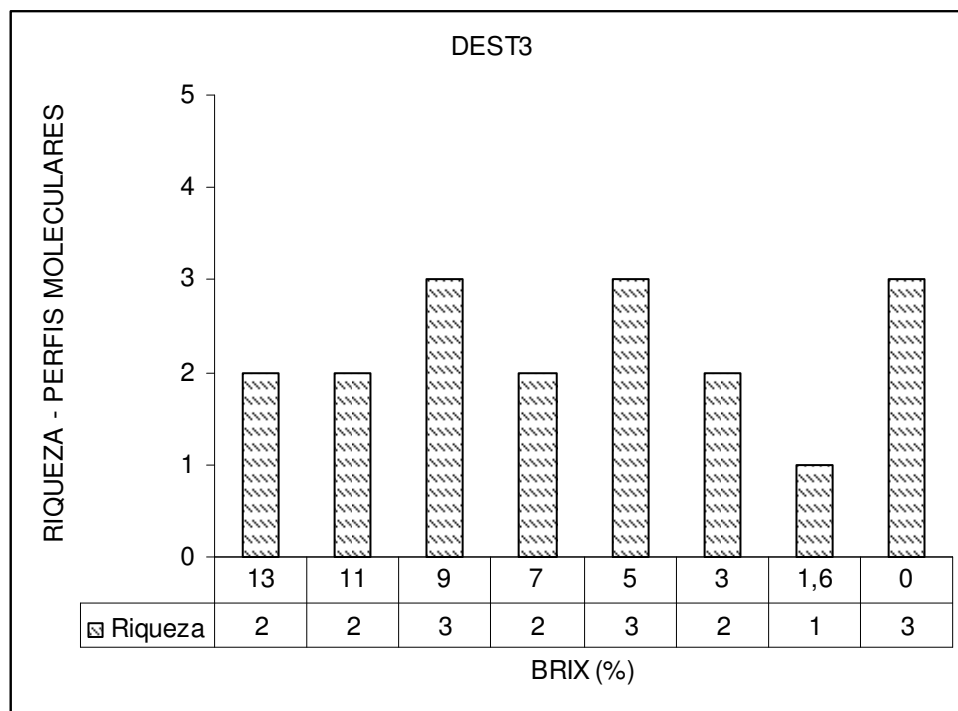


Figura 15. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST3, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

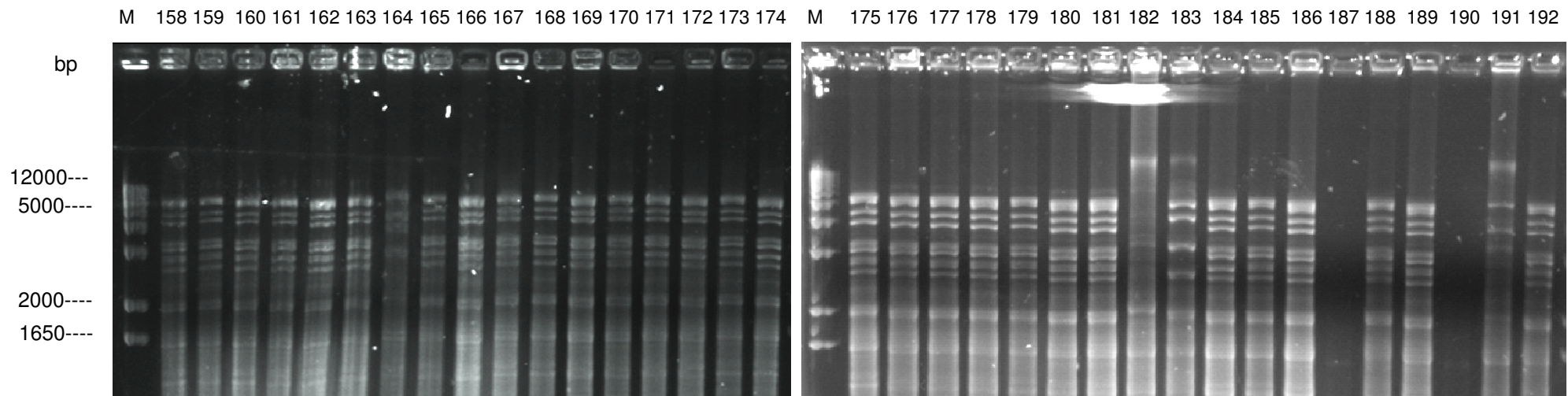


Figura 16. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST4, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 158, 159, 161 a 163, 165 a 181, 184 a 190 e 192 a 212: perfil molecular "Q", na pista 164: perfil molecular "R", na pista 182: perfil molecular "S", na pista 183: perfil molecular "T" e na pista 191: perfil molecular "U".

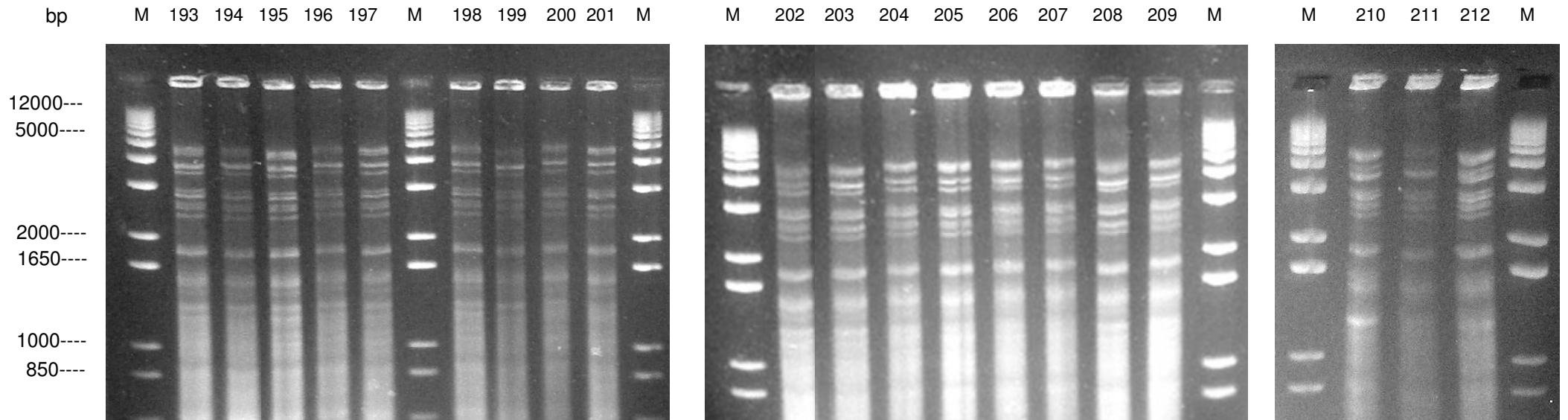


Figura 16. Continuação.

Tabela 6. Dados de coleta (número dos isolados, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST4 localizada no município de Condeúba-BA.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
158	T0	25	10	Q
159	T0	25	10	Q
160	T0	25	10	Q
161	T0	25	10	Q
162	T1	27	8	Q
163	T1	27	8	Q
164	T1	27	8	R
165	T1	27	8	Q
166	T1	27	8	Q
167	T1	27	8	Q
168	T2	28	6	Q
169	T2	28	6	Q
170	T2	28	6	Q
171	T2	28	6	Q
172	T2	28	6	Q
173	T2	28	6	Q
174	T3	29	4	Q
175	T3	29	4	Q
176	T3	29	4	Q
177	T3	29	4	Q
178	T3	29	4	Q
179	T3	29	4	Q
180	T4	29	2	Q
181	T4	29	2	Q
182	T4	29	2	S
183	T4	29	2	T
184	T4	29	2	Q
185	T5	28	0	Q
186	T5	28	0	Q
187	T5	28	0	-
188	T5	28	0	Q
189	T5	28	0	Q
190	T5	28	0	-
191	T6	28	0	U
192	T6	28	0	Q
193*	T0	25	10	Q
194*	T0	25	10	Q
195*	T0	25	10	Q
196*	T1	27	8	Q
197*	T1	27	8	Q

Tabela 6. Continuação.

Nº da amostra	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
198*	T2	28	6	Q
199*	T2	28	6	Q
200*	T2	28	6	Q
201*	T2	28	6	Q
202*	T3	29	4	Q
203*	T5	28	0	Q
204*	T5	28	0	Q
205*	T5	28	0	Q
206*	T5	28	0	Q
207*	T5	28	0	Q
208*	T6	28	0	Q
209*	T6	28	0	Q
210*	T6	28	0	Q
211*	T6	28	0	Q
212*	T6	28	0	Q

“-” Não houve o aparecimento de bandas. Experimento repetido 2 vezes.

“\*\*” Colônia de *S. cerevisiae* com morfotipo dominante.

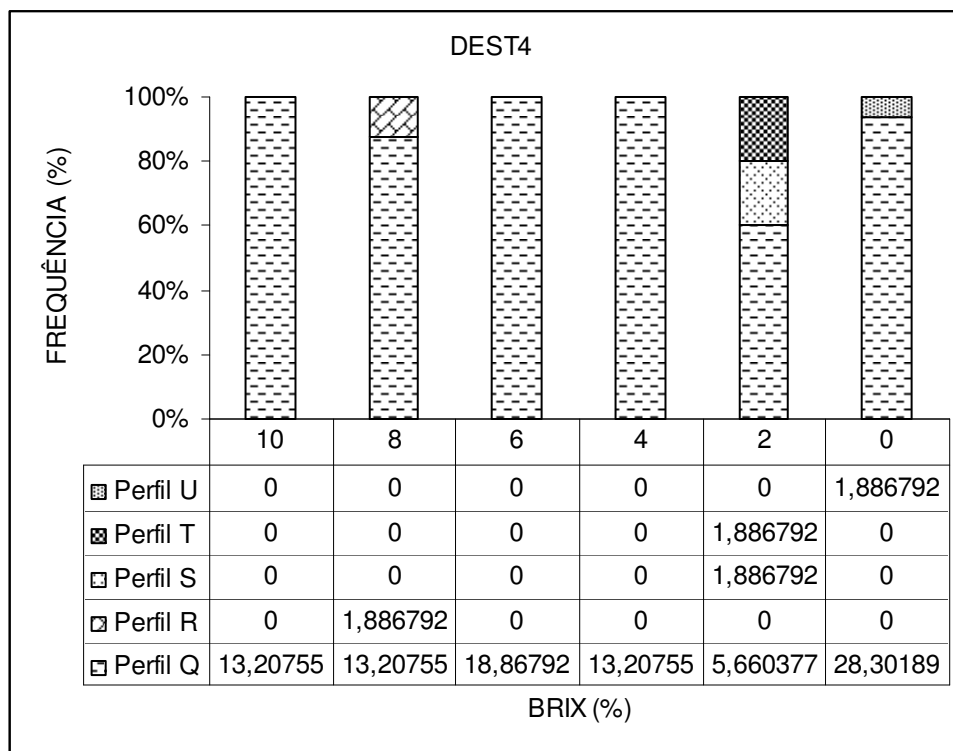


Figura 17. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST4, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

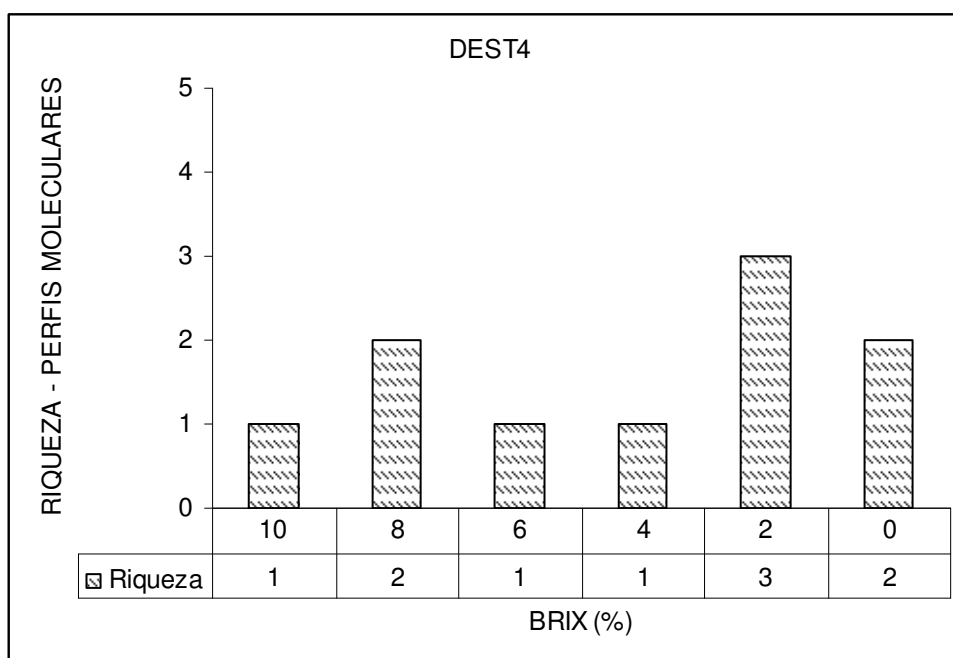


Figura 18. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST4, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).



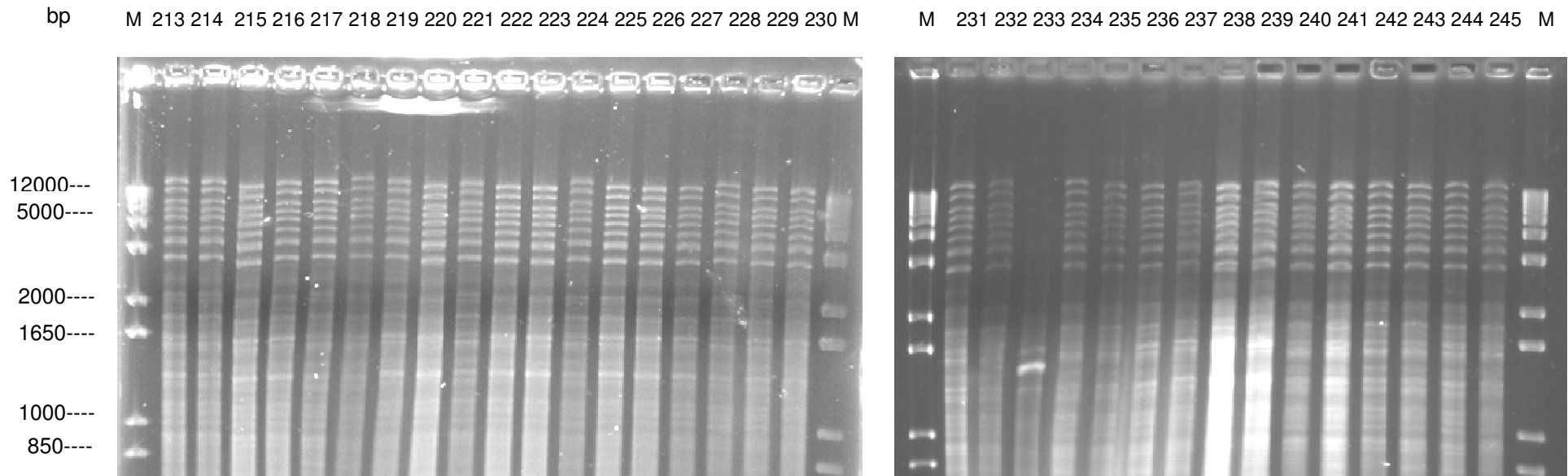


Figura 19. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST5, obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas 213 a 232 e 234 a 270: perfil molecular "V", na pista 233: perfil molecular "W".

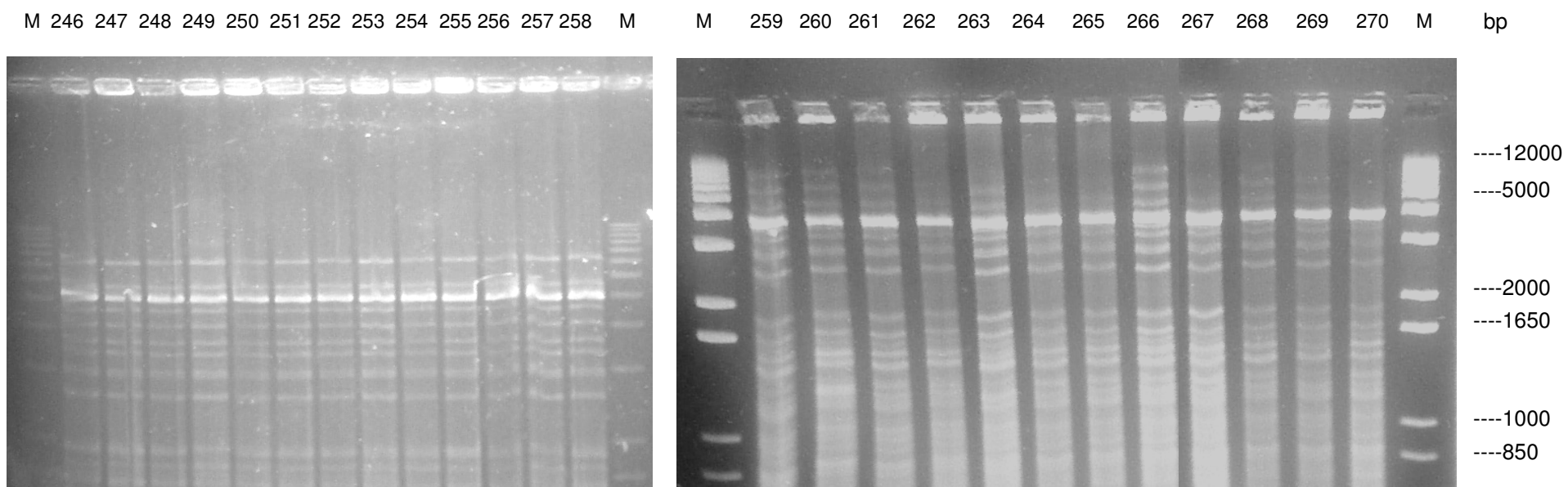


Figura 19. Continuação.

Tabela 7. Dados de coleta (número dos isolados, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST5 localizada no município de Caculé-BA.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
213	T0	24	16	V
214	T0	24	16	V
215	T0	24	16	V
216	T0	24	16	V
217	T1	31	13	V
218	T1	31	13	V
219	T1	31	13	V
220	T1	31	13	V
221	T2	33	11	V
222	T2	33	11	V
223	T2	33	11	V
224	T3	35	9	V
225	T3	35	9	V
226	T3	35	9	V
227	T3	35	9	V
228	T4	37	7	V
229	T4	37	7	V
230	T4	37	7	V
231	T5	38	5	V
232	T5	38	5	V
233	T5	38	5	W
234	T6	38,5	3	V
235	T6	38,5	3	V
236	T6	38,5	3	-
237	T7	39	0	V
238	T7	39	0	V
239	T7	39	0	V
240	T7	39	0	V
241	T8	38	0	V
242	T8	38	0	V
243	T8	38	0	V
244	T8	38	0	V
245	T9	38	0	V
246*	T0	24	16	V
247*	T0	24	16	V
248*	T0	24	16	V
249*	T1	24	16	V
250*	T1	31	13	V
251*	T2	31	13	V
252*	T2	31	13	V
253*	T3	31	13	V

Tabela 7. Continuação.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
254*	T3	33	11	V
255*	T3	33	11	V
256*	T4	33	11	V
257*	T4	35	9	V
258*	T4	35	9	V
259*	T5	35	9	V
260*	T5	35	9	V
261*	T6	37	7	V
262*	T6	37	7	V
263*	T6	37	7	V
264*	T7	38	5	V
265*	T7	38	5	V
266*	T8	38	5	V
267*	T9	38,5	3	V
268*	T9	38,5	3	V
269*	T9	38,5	3	V
270*	T9	39	0	V

“-” Não houve o aparecimento de bandas. Experimento repetido 2 vezes.

“\*\*” Colônia de *S. cerevisiae* com morfotipo dominante.

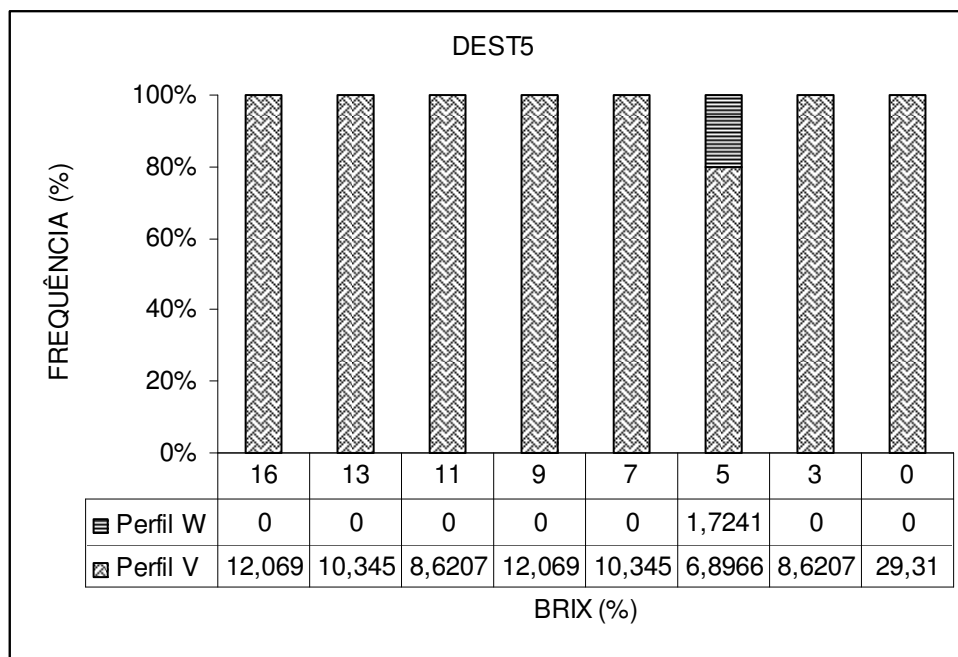


Figura 20. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST5, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

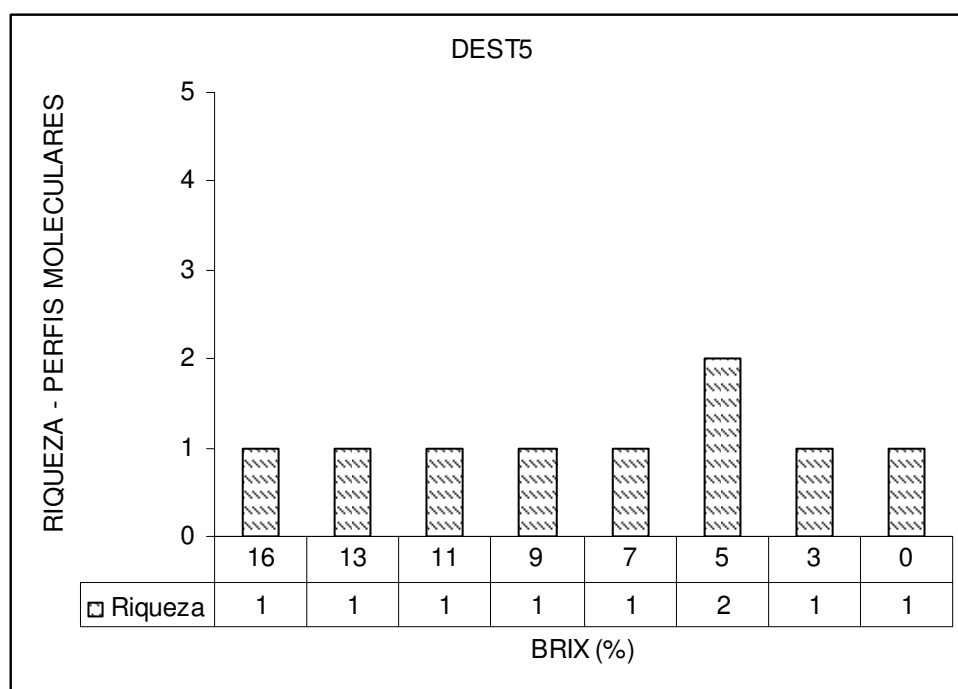


Figura 21. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST5, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

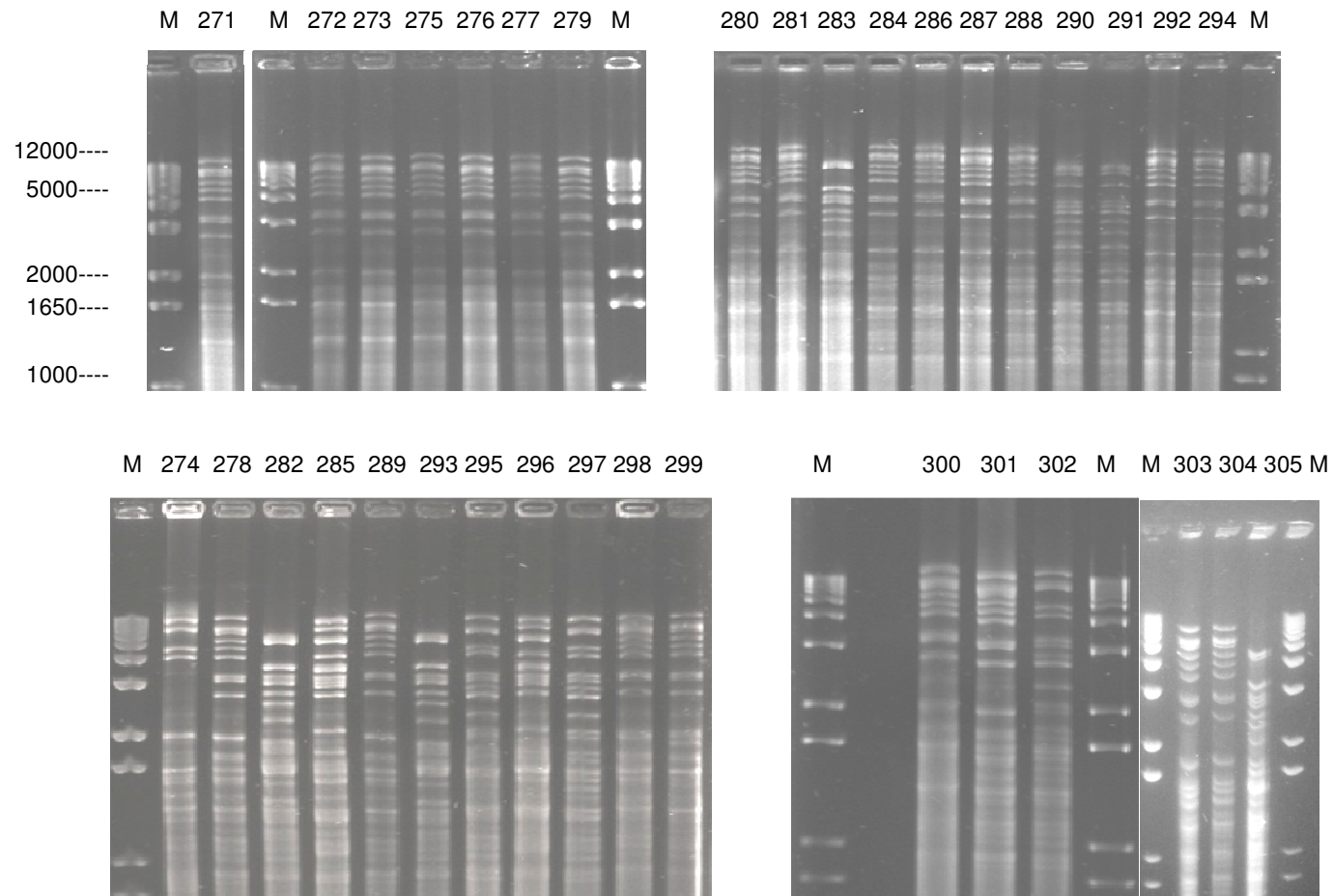


Figura 22. Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST6, obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na pista M: marcador de peso molecular 1 Kb, nas pistas de 271 A 273, 275 a 281, 284, 286 a 289, 292, 294, 298 a 301, 304 a 306, 312, 314 a 316, 322, 324 a 329: perfil molecular "X", na pista 274: perfil molecular "Y", nas pistas 282, 283, 293, 308 a 310, 317, 318, 320, 323 e 330: perfil molecular "Z", nas pistas 285, 296, 313 e 319: perfil molecular "AA", nas pistas 290, 291 e 303: perfil molecular "AB", nas pistas 295, 297, 302, 311 e 321: perfil molecular "AC" e na pista 307: perfil molecular "AD".

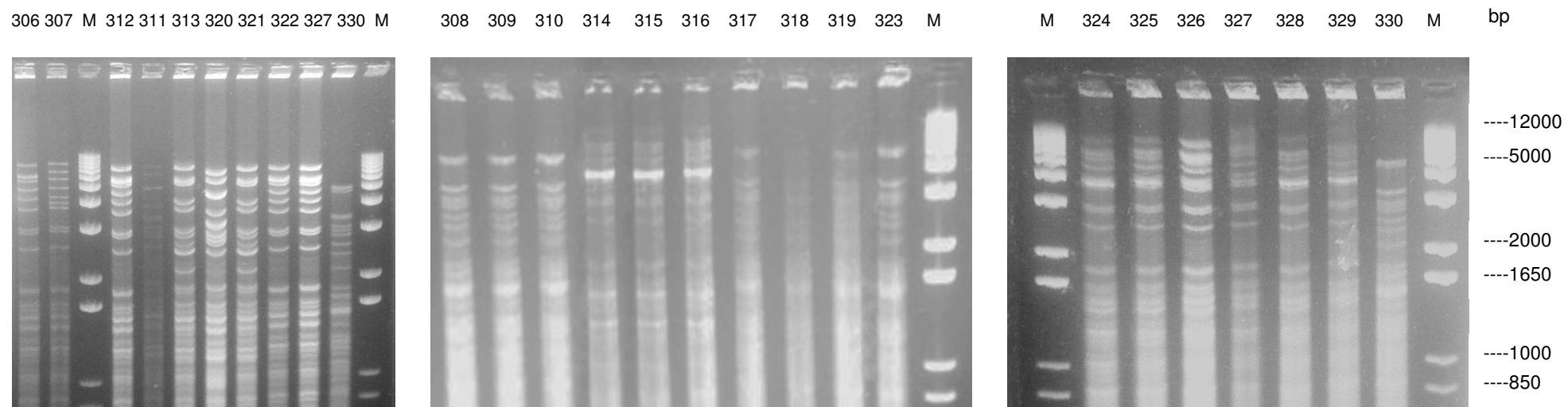


Figura 22. Continuação.

Tabela 8. Dados de coleta (número dos isolados, tempo, temperatura e Brix) e perfis moleculares das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da DEST6 localizada no município de Rio de Contas, BA.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
271	T0	24	23	X
272	T0	24	23	X
273	T0	24	23	X
274	T0	24	23	Y
275	T1	29	20	X
276	T1	29	20	X
277	T1	29	20	X
278	T1	29	20	X
279	T2	31	17	X
280	T2	31	17	X
281	T2	31	17	X
282	T2	31	17	Z
283	T3	32	14	Z
284	T3	32	14	X
285	T3	32	14	AA
286	T4	33	11	X
287	T4	33	11	X
288	T4	33	11	X
289	T4	33	11	X
290	T5	33	8	AB
291	T5	33	8	AB
292	T5	33	8	X
293	T5	33	8	Z
294	T6	33	5	X
295	T6	33	5	AC
296	T6	33	5	AA
297	T6	33	5	AC
298	T7	30	2	X
299	T7	30	2	X
300	T7	30	2	X
301	T7	30	2	X
302	T8	28	0	AC
303	T8	28	0	AB
304	T8	28	0	X
305	T8	28	0	X
306*	T0	24	23	X
307*	T0	24	23	AD
308*	T0	24	23	Z
309*	T1	29	20	Z
310*	T1	29	20	Z
311*	T2	31	17	AC



Tabela 8. Continuação.

Nº dos isolados	Tempo	Temperatura (°C)	Brix (%)	Perfil molecular
312*	T2	31	17	X
313*	T2	31	17	AA
314*	T3	32	14	X
315*	T3	32	14	X
316*	T4	33	11	X
317*	T4	33	11	Z
318*	T4	33	11	Z
319*	T5	33	8	AA
320*	T5	33	8	Z
321*	T6	33	5	AC
322*	T6	33	5	X
323*	T6	33	5	Z
324*	T7	30	2	X
325*	T7	30	2	X
326*	T8	28	0	X
327*	T8	28	0	X
328*	T8	28	0	X
329*	T8	28	0	X
330*	T8	28	0	Z

“\*” Colônia de *S. cerevisiae* com morfotipo dominante.

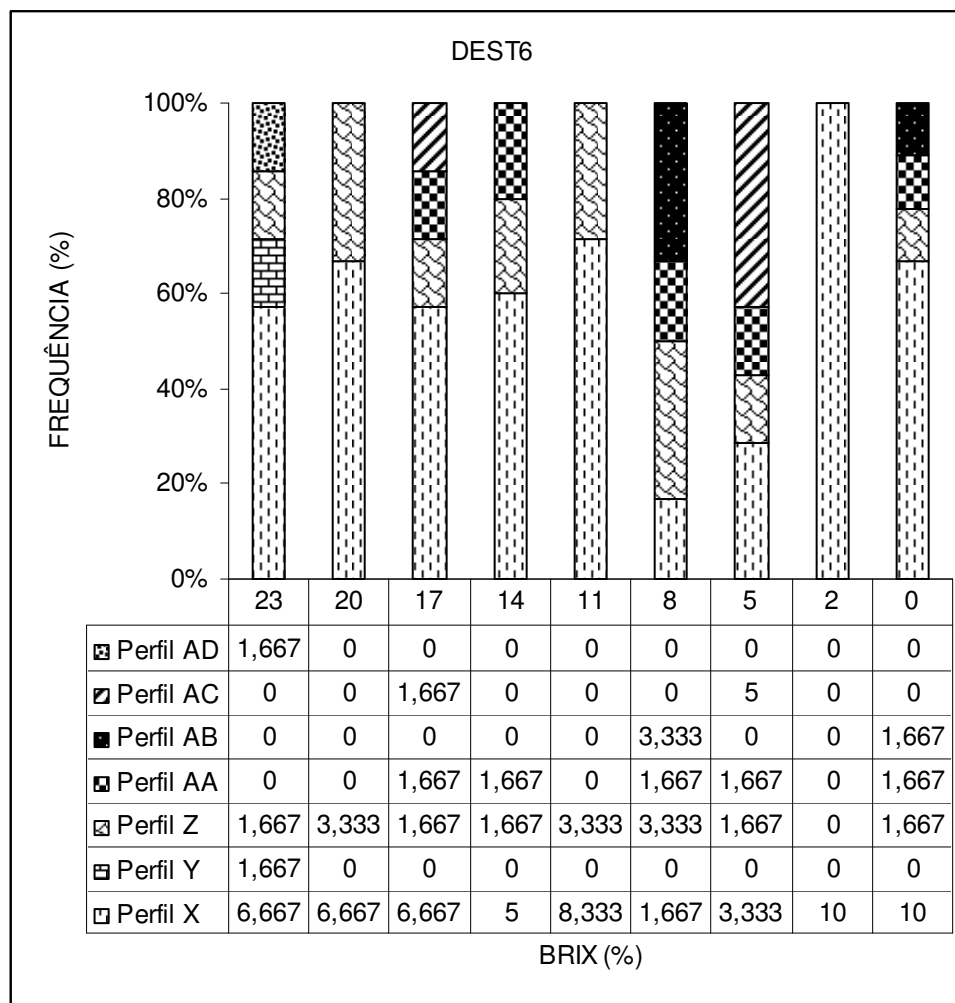


Figura 23. Distribuição da frequência da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST6, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da frequência de cada perfil encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

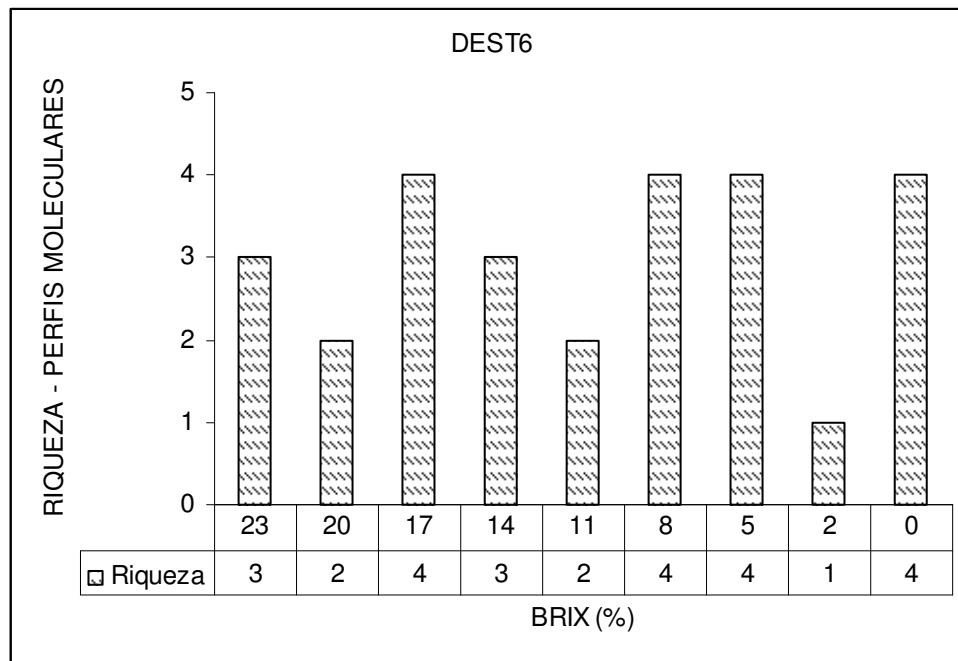


Figura 24. Distribuição da riqueza da população de *S. cerevisiae* com morfotipos diferentes e dominantes isoladas durante um ciclo fermentativo da DEST6, de acordo com os perfis obtidos por meio da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os valores da riqueza encontram-se expressos abaixo do eixo x, o qual se refere aos intervalos de Brix (%).

### 5.3 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *S. cerevisiae*

A partir da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I foram analisadas as estimativas de variabilidade das linhagens de *S. cerevisiae*, as quais apresentaram um total de 40 *loci*, sendo apenas três deles *loci* privados (NLE) pertencentes a DEST1. As populações de leveduras das DEST3 e DEST6 apresentaram superioridade em relação ao número de *loci* polimórficos (P=77,50%) e número de alelos por *locus* (34 e 33, respectivamente), seguidas da DEST1 com 62,50% de *loci* polimórficos e 28 *loci* e, portanto apresentam maior variabilidade genética em relação às demais populações estudadas (Tabela 9).

Tabela 9. Variabilidade genética dos 40 *loci* de seis populações de *S. cerevisiae* de destilarias de cachaça de alambique da Bahia.

Populações	N	NLE	P (%)
DEST1	28	3	62,50
DEST2	24	0	47,50
DEST3	33	0	77,50
DEST4	18	0	35,00
DEST5	19	0	35,00
DEST6	34	0	77,50

"N": nº de *loci*, "NLE": nº de *loci* privados e "P": *loci* polimórficos

Também foi analisada a divergência genética entre e dentro das populações através da Análise da Variância Molecular (AMOVA) e constatou-se que maior variação genética encontra-se entre as populações das diferentes destilarias (71%) do que dentro delas (29%) (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados da Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *S. cerevisiae*.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual de Variação*
Entre populações	5	1528,794	305,759	71%
Dentro das populações	312	725,838	2,326	29%
<b>Total</b>	317	2254,632	308,085	100%

(\*) P<0,001

Como a maior parte da variação genética encontrou-se entre as populações a partir da AMOVA foi confeccionada a matriz de dissimilaridade com base em Nei e Li (1979) pelo programa GENES (CRUZ, 2008), a qual pode ser observada na Tabela 11.

No método de agrupamento hierárquico UPGMA, as populações são agrupadas com base nas médias aritméticas das medidas de dissimilaridades. A representação gráfica de suas distâncias, indicada pelo comprimento de barras horizontais e as ramificações no dendrograma, permite a visualização da magnitude das distâncias e aproximação das populações. O dendrograma gerado a partir das dissimilaridades revelou que a DEST6 foi a população mais divergente em relação as demais, conforme a Figura 25. A maior similaridade genética expressada no dendrograma foi entre a DEST5 e DEST4 (Figura 25), mostrando um agrupamento das populações mais próximas geograficamente. Contudo, as populações com mais dissimilares (DEST4 e DEST6; Tabela 11) não são as mais distantes geograficamente. O teste de Mantel, entre a matriz de dissimilaridade (NEI; LI, 1979) e as distâncias geográficas entre as populações (Tabela 11), não apresentou correlação significativa ( $r = -0,11169$ ;  $p > 0,05$ ).

Tabela 11. Complemento do coeficiente de Nei e Li (1979), abaixo da diagonal, e distâncias geográficas (Km) acima da diagonal, para populações de *S. cerevisiae*.

Populações	DEST1	DEST2	DEST3	DEST4	DEST5	DEST6
DEST1	–	104,000	128,000	320,000	312,000	256,000
DEST2	0,56011	–	224,000	432,000	440,000	344,000
DEST3	0,59847	0,49946	–	336,000	360,000	352,000
DEST4	0,47087	0,47024	0,49321	–	64,000	176,000
DEST5	0,49422	0,58698	0,45643	0,43213	–	88,000
DEST6	0,56674	0,58963	0,52604	0,60801	0,48485	–

Resultados similares ao dendrograma gerado a partir das dissimilaridades (NEI; LI, 1979) foram encontrados por meio do programa STRUCTURE (Figura 26), onde as populações DEST4 e DEST5 apresentam os *pools* gênicos muito similares, enquanto a DEST6 e DEST4 praticamente não compartilharam alelos. Destaca-se ainda a DEST3 que apresentou em

maior proporção o compartilhamento dos 3 *pools* gênicos para todos os indivíduos, estimado a partir do cálculo do  $\Delta K$  (Tabela 12).

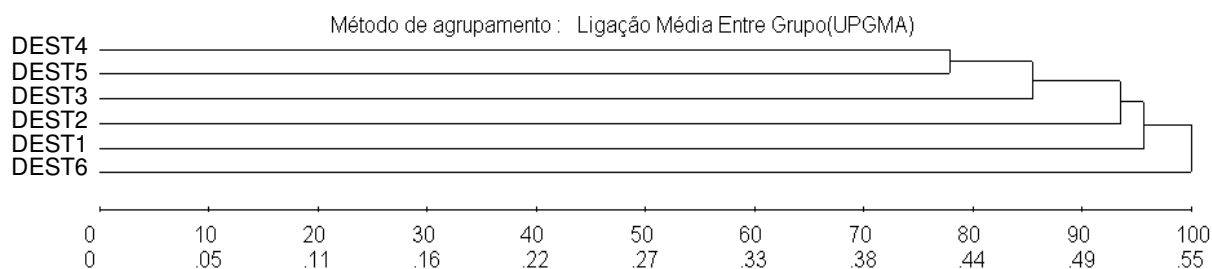


Figura 25. Dendrograma realizado para as seis populações de *S. cerevisiae* gerado a partir da dissimilaridade de Nei e Li (1979), obtido par a par no programa GENES. A escala representa a saída gráfica, em que a distância correspondente ao último passo do agrupamento é convertida para 100%.

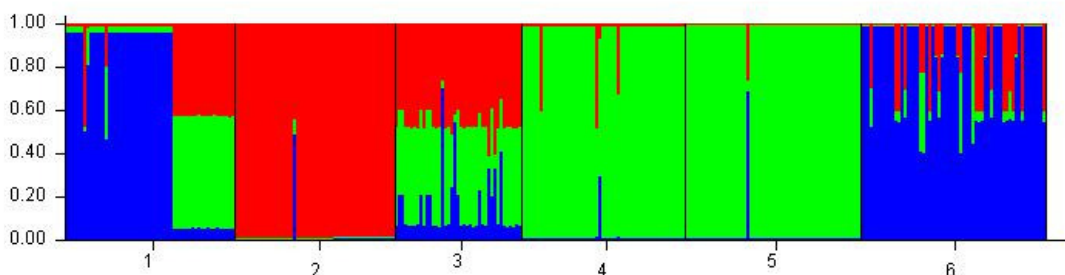


Figura 26. Composição alélica das seis populações de *S. cerevisiae* estimada no programa STRUCTURE versão 2.3.1. Cada indivíduo está representado por uma linha vertical, enquanto cada população está delimitada por linhas verticais de cor preta.

Tabela 12. Estimativa da probabilidade posterior para K e  $\Delta K$  da simulação realizada utilizando o modelo de mistura para a ancestralidade.

Nº de K estimado	K	$\Delta K$
2	1	-3,63E-05
3	~0,0	<b>0,0126</b>
4	~0,0	0,004367
5	~0,0	0,00025
6	~0,0	0,003233

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 CONTAGEM, PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

Os valores encontrados na contagem de leveduras demonstraram variações durante os estágios da fermentação dentro de uma mesma destilaria e entre as destilarias. Gomes et al. (2009b) também encontraram variações no número de populações de *S. cerevisiae* entre  $10^6$  e  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, o que foi explicado mediante as circunstâncias das coletas, com altos valores de contagem durante a fase tumultuosa da fermentação e baixos no fim do ciclo fermentativo da cachaça. Em geral, as variações de contagem entre destilarias podem ser explicadas por diferenças da reciclagem e da origem do inóculo utilizado na fermentação (SCHWAN et al., 2001).

A DEST4 apresentou baixa contagem de UFC.mL<sup>-1</sup>, talvez por contaminação por bactéria na fermentação, pois durou em média três dias para finalizar o processo. Segundo Badotti (2005), a competição por nutrientes pode favorecer a redução da concentração de leveduras ao longo do processo, medidas simples de higienização podem reduzir significativamente à contaminação do mosto, favorecendo o controle do processo.

As bactérias mais frequentemente associadas a tais contaminações são *Micrococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Clostridium* (SCHWAN et al., 2001). Carvalho-Neto; Rosa; Camargo (2008) encontraram espécies ainda não descritas na literatura em fermentos para a produção de cachaça, como *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum* e duas espécies de *Lactobacillus* (*L. acetotolerans* e *L. hilgardii*). Dentre os problemas causados por estes contaminantes, destacam-se a competição por açúcares, a inibição, floculação e a queda da viabilidade de leveduras devido a toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio que resultam na queda do rendimento e produtividade da fermentação (AMORIM; OLIVEIRA; CAMPOS, 1981; AMORIM; OLIVEIRA, 1982; ALTERTHUM et al., 1984; KHAN; HOQ, 1990).

A elevada contagem de leveduras observada para as demais destilarias (DEST1, DEST2, DEST3, DEST5 e DEST6) pode ser atribuída à utilização do meio SCY nas coletas, pois, de acordo com Pataro et al. (1998), este meio

(composto por caldo-de-cana, sendo a sacarose a principal fonte de açúcar) revela alta contagem de leveduras, provavelmente, por selecionar as linhagens de *S. cerevisiae*, as quais são responsáveis por alta atividade de invertase. Além disso, Pataro et al. (2000) observaram que este meio não fornece dados confiáveis sobre as contagens de espécies não-*Saccharomyces* na fermentação de cachaça, já que estas espécies de levedura estavam presentes em número muito menor do que as espécies dominantes do gênero *Saccharomyces* comparado com o meio WL que mostrou-se adequado para o isolamento de uma maior diversidade de espécies levedura, provavelmente por ser um meio menos seletivo, permitindo o crescimento de espécies não-*Saccharomyces*.

Guerra et al. (2001) acompanharam o número de espécies de leveduras durante um ciclo fermentativo para produção de cachaça e demonstraram que o número de colônias de *S. cerevisiae* aumentava de forma crescente até o meio da fermentação e em seguida ocorria decréscimo do número da população, como observado para os ciclos fermentativos estudados neste trabalho. Pataro et al. (2000) também observaram o decréscimo da população de *S. cerevisiae* no final da fermentação, este resultado foi similar ao encontrado neste trabalho.

As condições de estresse podem afetar as leveduras, como as altas temperaturas observadas na maioria das dornas aqui estudadas, que variaram entre 21 a 39°C e também outros parâmetros não observados neste estudo como a acidificação do mosto promovida pela atividade microbiana, aumento da concentração de etanol no fim do ciclo fermentativo (MORAIS et al, 1997), que atinge cerca de 7% (GUERRA et al., 2001) e pela presença de metabólitos secundários que também pode inibir o crescimento de *S. cerevisiae* e contribuir para o decréscimo da população (PATARO et al., 2000). Além disso, pode ainda estar havendo morte celular ou, provavelmente, a floculação e com isso a sedimentação das células de levedura (BADOTTI, 2005).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são mais tolerantes ao etanol e por isso conseguem predominar durante os estágios da fermentação (FLEET; HEARD, 1993), porém *S. cerevisiae* é a principal espécie responsável pela fermentação alcoólica (PRETORIUS, 2000).



## 6.2 POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL

Os panoramas biogeográficos e os estudos sobre diversidade genética de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas têm permitido documentar a dinâmica destas populações em fermentações espontâneas (SCHULLER, et al. 2005). No presente estudo investigou-se a diversidade de linhagens *S. cerevisiae* em municípios do estado da Bahia nunca caracterizada anteriormente e observou-se, por meio da técnica de mtDNA-RFLP, a presença de 30 perfis moleculares obtidos durante um ciclo fermentativo nas seis destilarias estudadas.

O mtDNA-RFLP tem sido utilizado por diferentes autores a fim de analisar o polimorfismo genético, monitorar a persistência ou prevalência de linhagens durante o processo fermentativo e a influência de fatores climáticos na dinâmica natural de linhagens de *S. cerevisiae* (QUEROL et al., 1992a, 1992b; SABATE et al., 1998; LOPEZ et al., 2001; ARAÚJO et al., 2007, GOMES et al., 2007; BERNARDI et al., 2008; BADOTTI, 2009).

No presente trabalho, colônias com morfotipos diferentes e dominantes apresentaram o mesmo perfil molecular na maioria das destilarias. Araujo et al. (2007) também observaram por meio do mtDNA-RFLP que colônias com morfotipos distintos apresentaram um mesmo perfil molecular. Isso demonstra que critérios baseados em caracterização morfológica são inadequados para distinção de linhagens de *S. cerevisiae*. No entanto, também foi observado nas destilarias DEST1, DEST2, DEST3 e DEST6 perfis moleculares distintos entre colônias com morfotipos diferentes e dominantes, mostrando que esse critério deve ser utilizado para estudar a diversidade de linhagens de *S. cerevisiae*.

Considerando o quociente entre o número de perfis moleculares e o número de cepas isoladas, obtém-se uma estimativa aproximada da diversidade de cepas de *S. cerevisiae* (SCHULLER, et al. 2005). Neste trabalho, o valor do quociente entre o número de perfis moleculares e o número de cepas isoladas, expressado em porcentagem (9,09%), foi inferior aos encontrados nos estudos de Comi et al. (2000) com 11,42% e Araujo et al. (2007) com 12,37% de diversidade, os quais também estudaram a diversidade de *S. cerevisiae* em fermentações espontâneas utilizando mtDNA-RFLP com a endonuclease *Hinf* I.

Os 30 perfis moleculares encontrados foram únicos para cada destilaria demonstrando a existência de uma diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* entre os municípios estudados. Resultado similar foi encontrado por Badotti (2009) que observou perfis únicos (mtDNA-RFLP) entre linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de fermentações de cachaça oriundas de destilarias pertencentes aos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Tocantins e Recife.

Estudos de populações de *S. cerevisiae* em fermentações de vinho também apresentaram estas características (VEZINHET et al., 1990; VERSAUD et al., 1995; GUILLAMÓN; BARRIO; QUEROL, 1996; NADAL; COLOMER; PIÑA, 1996). Estes trabalhos demonstraram que linhagens de leveduras são mais adaptadas a condições específicas de clima e substrato (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2000). A influência das diferentes condições ambientais parece ser significativa, considerando a localização geográfica das destilarias, no entanto essas características não foram registradas neste estudo.

De acordo com Bernardi et al. (2008), as linhagens isoladas de alambiques de certas regiões são geralmente mais adaptados às condições locais, sendo parcialmente responsáveis pelas características particulares que muitas vezes identificam cachaças como sendo de regiões específicas, o que facilita a sua inserção no mercado.

Entre os perfis moleculares foi encontrado, para cada destilaria, um ou dois perfis predominantes com elevada frequência, apontando que estas linhagens possuem habilidade para conduzir o processo fermentativo. Linhagens secundárias foram encontradas em números variáveis. Estes resultados concordam com outros estudos já descritos na literatura (VERSAUD et al., 1995; SCHULLER et al. 2005; SILVA-FILHO et al., 2005; BERNARDI et al., 2008; BADOTTI, 2009).

Segundo Silva-Filho (2005), as linhagens predominantes apresentaram alta frequência, enquanto as outras linhagens tiveram frequência menores que 10% e, portanto, pareceram não influenciar o processo fermentativo.

Badotti (2009) observou que as linhagens que apresentaram perfil dominante, durante o processo fermentativo da cachaça em destilarias de seis estados do Brasil, apresentaram, de maneira geral, maior resistência às

condições de estresse testadas nas seguintes condições: pH (2,8; 3,0; 3,2), glicose (200 g/L, 250 g/L e 300 g/L), sacarose (100 g/L, 150 g/L e 200 g/L), temperatura (10°C, 16°C, 30°C, 37°C, 42°C e 45°C) e etanol (8%, 10%, 12% e 15%). Enquanto que as linhagens detectadas uma ou poucas vezes na fermentação apresentaram menor resistência, exceto as linhagens que apresentaram perfil molecular semelhante ao da levedura de panificação exibiram habilidade de crescimento similar para as condições de estresse avaliadas.

Querol et al. (1992b) concluíram que nos primeiros estágios da fermentação do vinho havia uma grande diversidade de linhagens de *S. cerevisiae*, porém poucas eram presentes ao longo de todo o processo. Resultado similar foi observado somente para DEST1. Apesar das demais destilarias apresentaram maior riqueza no meio e no final da fermentação ou durante todo processo, as frequências dos perfis moleculares secundários foram nulas ou menores durante os estágios finais da fermentação, exceto para os perfis “M” e “U” que apareceram apenas em 0% Brix (DEST3 e DEST4, respectivamente) e para o perfil “AA” que apresentou frequência constante durante a fermentação (DEST6).

A riqueza de perfis moleculares encontrada na maioria das destilarias pode ser explicada pelas características da fermentação como ciclos de fermentação curtos com duração em média de 20 a 24 horas, às altas temperaturas ambientais nos meses mais quentes da safra e a concentrações elevadas de etanol no final do ciclo, em torno de 7 a 8% do volume total (ROSA et al., 2007). De acordo com Schuller et al. (2005), o mosto cria condições seletivas e muito estressantes para as leveduras totalmente distintas das influências ambientais (SCHULLER et al., 2005). Assim, os polimorfismos observados provavelmente surgem a partir de qualquer ponto de mutações pequenas deleções ou a partir de rearranjos do genoma mitocondrial (NADAL; COLOMER; PIÑA, 1996).

A diversidade na DEST6 também pode ser explicada pelo produtor utilizar a mistura de dois inóculos de duas outras destilarias, localizadas na mesma cidade, na dorna estudada, enquanto a baixa riqueza de perfis moleculares na DEST2 pode ser explicada pela reutilização do inóculo da safra

anterior, o qual foi acondicionado em geladeira (aproximadamente 4°C) até a safra estudada.

A presença de linhagens de *S. cerevisiae* “*petite*” também foi detectada no trabalho de Badotti (2009). De acordo com Ephrussi; Hottinguer e Chimenes (1949), *S. cerevisiae* produz constantemente mutantes que são estáveis durante a reprodução vegetativa e são caracterizadas por apresentarem colônias de tamanho reduzido em meio sólido, bem como deficiência na fermentação de fontes de carbono.

Outro trabalho mostrou que um genoma mitocondrial é importante para a avaliação da tolerância ao etanol, de modo que as linhagens “*petites*” são mais sensíveis aos efeitos de inibidores do crescimento causado pelo etanol (BROWN et al., 1984; HUTTER; OLIVER, 1998). Além disso, a exposição a altas concentrações de etanol (por exemplo, 18%, v/v) pode induzir a formação de “*petites*”, conseqüentemente as cepas tolerantes ao etanol são menos propensas à formação de “*petites*” (BOULTON; QUAIN, 2001).

De acordo com Chi e Arneborg (1999), as linhagens tolerantes ao etanol comparado com as sensíveis produzem elevados índices de fosfatidilcolina, ergosterol e ácidos graxos de cadeia longa insaturada, de forma que reduziria a fluidez da membrana que, por sua vez, protegeria a célula dos efeitos do etanol sobre as membranas.

Estudos indicam que as fermentações para produção de cerveja com linhagem “*petite*” são afetadas, na qualidade do produto e no desempenho do processo fermentativo, já que elevados níveis de “*petites*” resultam em levedura com crescimento reduzido, fermentação lenta e mudanças na floculação e produto final com elevados níveis de diacetil e alcoóis superiores, juntamente com reduzidas concentrações de acetato de etila (SILHANKOVA, SAVEL, MOSTEK, 1970; ERNANDES et al., 1993; BOULTON; QUAIN, 2001).

### 6.3 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *S. cerevisiae*

No presente estudo, os resultados indicaram que as populações DEST1, DEST3 e DEST6 apresentaram os maiores valores de *loci* polimórficos. A maior variabilidade genética destas populações pode ser explicada devido à

adaptação das linhagens a variações das condições abióticas do mosto como temperatura, concentração de açúcares no início da fermentação e principalmente pela concentração de etanol no final do processo fermentativo, a qual, segundo Boulton e Quain (2001), provoca efeito mutagênico ao DNA mitocondrial. A baixa variabilidade encontrada na DEST2 pode ser explicada pela reutilização do inóculo da safra anterior, que possivelmente apresenta um *pool* gênico menor (efeito fundador) quando comparado com o *pool* gênico de linhagens, oriundas do fermento caipira, que surgem a partir da microbiota presente no caldo-de-cana, dornas e equipamentos. Na DEST4 a baixa variabilidade pode estar relacionada à pressão seletiva ocasionada pela contaminação do mosto por bactérias. A contaminação por bactérias leva à redução da população de *S. cerevisiae* e conseqüentemente, da diversidade genética.

Os polimorfismos observados no DNA mitocondrial são provavelmente originados por mutações pontuais ou pequenas deleções, em vez de grandes rearranjos no genoma mitocondrial, de forma que as linhagens mantêm e acumulam variações genéticas durante o crescimento vegetativo, enquanto nos ciclos de esporulação/conjugação ocorre uma recombinação entre os dois genomas mitocondriais parentais resultando no crescimento da heterogeneidade no DNA mitocondrial. Portanto, os perfis de DNA molecular refletem a ascendência genética do clone já que os zigotos herdam proporções significativas do genoma mitocondrial de ambas as linhagens parentais (NADAL; COLOMER; PIÑA, 1996).

A análise AMOVA revelou maior variação entre do que dentro das populações. Entretanto, não foi detectada correlação significativa entre divergência genética e a distância geográfica das populações pelo teste de Mantel.

A maior variação genética entre as populações e a baixa variação intrapopulacional era esperada pelo fluxo gênico entre as populações, via vetores, ser restrito de acordo com a distância geográfica (Tabela 11) dos municípios estudados (cerca de 64Km a menor distância encontrada entre DEST4 e DEST5 e cerca de 440Km a maior distância geográfica encontrada entre DEST2 e DEST5). Além disso, a presença de alelos exclusivos na DEST1 como verificado em 3 *loci* é um indicativo de fluxo gênico restrito, que

pode levar a um aumento na divergência genética entre populações (SEOANE; KAGEYAMA; SEBBENN, 2000).

As dissimilaridades entre as populações de *S. cerevisiae* foram estimadas através da equação de Nei e Li (1979) representado por meio do dendrograma (Figura 29), onde se observa que a menor dissimilaridade genética ocorre entre as populações mais próximas geograficamente (DEST4 e DEST5), e, por conseguinte as demais destilarias se agrupam uma a uma, sendo a DEST6 a população com maior divergência genética.

No estudo de Guillamón, Barrio e Querol (1996) realizado com *S. cerevisiae*, utilizando marcadores mtDNA-RFLP. Os autores calcularam a divergência genética com base em Nei e Li (1979) para populações de *S. cerevisiae* em diferentes regiões produtoras de vinho e observaram que essa espécie exibe ao menos algum grau de estruturação populacional geográfica. Talvez por refletir uma adaptação destas espécies a condições microambientais (NADAL; COLOMER; PIÑA, 1996).

De acordo com Querol e Ramón (1996) a variação genética entre populações é determinada pela ação de forças evolutivas como fluxo gênico, seleção natural, divergência mutacional, mudanças no tamanho da população e subdivisão da população. Análises de variabilidade genética em populações resultam frequentemente na determinação de fatores biológicos que influenciam a estrutura da população, por outro lado, existe a necessidade de caracterizar variações das populações dentro e entre as regiões produtoras de vinho para determinar os fatores que influenciam a distribuição da variação em populações naturais de *S. cerevisiae* (QUEROL; RAMÓN, 1996).

O dendrograma gerado a partir do cálculo de dissimilaridade de Nei e Li (1979) concordou com os resultados encontrados por meio do programa STRUCTURE (Figura 30), o qual permitiu calcular a probabilidade que um determinado genótipo é originado em cada população por meio da estimativa das frequências alélicas de cada *locus* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). A DEST2 apresentou quase que totalmente um *pool* gênico característico sendo considerada a população mais estruturada e, portanto a mais geneticamente distinta. Resultado similar também foi encontrado para DEST4 e DEST5 (Figura 30). Dessa forma, a diferenciação

dessas populações naturais de *S. cerevisiae* por *pool* gênico pode refletir uma adaptação específica a microambientes.

A semelhança observada entre a estrutura genética da DEST4 e DEST5, bem como a menor estruturação da DEST1 e DEST3, causada por apresentarem os alelos compartilhados pelas demais populações (Figura 30) sugere a existência de um centro de origem para esses *pools* gênicos, talvez por meio de indivíduos fundadores, especialmente para DEST4 e DEST5, as populações de menor distância geográfica. De acordo com Templeton, Routman e Phillips (1995), o padrão geográfico da variação genética é influenciado pela estrutura da população, pela história da população (que podem envolver ações antrópicas) e também pela combinação entre essa estrutura e fatores históricos.

## 7 CONCLUSÕES

Deste trabalho conclui-se que:

- Os valores encontrados na contagem de leveduras mostraram variações durante os estágios da fermentação dentro de uma mesma destilarias e entre elas;
- A técnica mtDNA-RFLP detectou, dentre os 330 isolados de *S. cerevisiae* estudados, o total de 30 perfis moleculares mostrando a existência de uma elevada diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* entre as destilarias estudadas, sendo os perfis únicos para cada destilaria;
- As seis destilarias estudadas apresentaram a presença de pelo menos um perfil dominante durante todo o ciclo fermentativo apontando que estas linhagens possuem habilidade para conduzir o processo fermentativo;
- A maior riqueza de perfis moleculares foi encontrada na DEST3 (8) e na DEST6 (7). A riqueza de perfis moleculares encontrada nessas destilarias pode ser explicada pelas características do processo fermentativo da cachaça, tais como ciclo fermentativo curto, altas temperatura e alta concentração de álcool;
- As destilarias DEST1, DEST3 e DEST6 apresentaram maior variabilidade genética;
- A Análise da Variância Molecular (AMOVA) constatou que a maior variação genética encontra-se entre as populações das destilarias. Entretanto, não foi detectada correlação significativa entre divergência genética e a distância geográfica das populações pelo teste de Mantel;



- A análise de agrupamento a partir do cálculo de dissimilaridade de Nei e Li (1979) concordou com os resultados encontrados por meio do programa STRUCTURE;
- O programa STRUCTURE identificou que as 6 destilarias compartilham 3 *pools* gênicos, sendo a DEST2 a mais geneticamente distinta, enquanto a DEST1 e DEST3 apresentaram os alelos compartilhados pelas demais populações. A distinção dessas populações naturais de *S. cerevisiae* por *pool* gênico pode refletir uma adaptação específica a microambientes;
- Este estudo da caracterização genética de linhagens de *S. cerevisiae* de destilarias do estado da Bahia representa uma contribuição importante para compreensão e seleção de linhagens, o que torna este estudo indispensável para o desenvolvimento de estratégias cujo objetivo seja a seleção de linhagens de *S. cerevisiae* mais adaptadas à fermentação do caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça no estado da Bahia. Além disso, as fermentações das destilarias estudadas podem representar um importante reservatório de novos biótipos de levedura com potencial para aplicações industriais.

## REFERÊNCIAS

AIGLE M.; ERBS, D.; MOLL, M. Some molecular structures in the genome of larger brewing yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. v. 42, p. 1-7, 1984.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M; VAIRO, M. L. R; GAMBASSI, D. M. Efeito dos microrganismos contaminantes de fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, p. 158-168, 1981.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação como evitá-la. *Álcool e Açúcar*, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.

ANDRADE, L. A. B. Cultura de cana-de-açúcar. In: Cardoso, M.G. (Org). *Produção de água ardente*. 2 ed., Lavras: Editora UFLA, p. 25-32, 2006.

ARAUJO, R. A. C. et al. Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* populations by mtDNA restriction analysis and other molecular typing methods during spontaneous fermentation for production of the artisanal cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 217-223, 2007.

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S.R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 202 p., 2001.

BADOTTI, F. *Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de Saccharomyces cerevisiae*. 2005, 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BADOTTI, F. *Diversidade genética e resistência a estresses em linhagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas de fermentações para a produção de cachaça em diferentes estados do Brasil*. 2009, 135 p. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BALEIRAS COUTO, M. M., et al. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.41-46, 1996.

BARROS LOPES, M., et al. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.48, p. 279-286, 1998.

BAUER, F.F.; PRETORIUS, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v.21, p.27-51, 2000.

BERNARDI, T.L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and

molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 43, p. 2705-2712, 2008.

BOULTON, C.; QUAIN, D. *Brewing Yeast and Fermentation*. 1ed., Blackwell Science Ltd., 643p., 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução normativa n° 13 de 29 de junho de 2005. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 de junho de 2005. [www.agricultura.org.br](http://www.agricultura.org.br). Acessado em 31 de agosto de 2006.

BROWN, S.W.; SUGDEN, D.A.; OLIVER, S.G. Ethanol production and tolerance in grande and petite yeasts. *Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology*, v. 34B, p. 116-20, 1984.

CAETANO-ANOLLES, G. et al. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 9, p. 292-305, 1991.

CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B. J. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 42, p. 189-200, 1993.

CARDELLO, H.M.A.B.; ISIQUE, W.D.; FARIA, J.B. Teores de enxofre e aceitabilidade de aguardentes de cana brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, p.1-9, 1998.

CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardente. In: CARDOSO, M. G. *Produção artesanal de aguardente*. Lavras: UFLA, p. 61-73, 2001.

CARVALHO-NETTO, O. V.; ROSA, D. D.; CAMARGO, L. E. A. identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16S rDNA gene sequencing. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.), v.65, n.5, p.508-515, 2008.

CASAREGOLA, S. et al. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 1607–1618, 2001.

CHI, Z.; ARNEBORG, N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 1047-52, 1999.

COMI, G. et al. Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, v. 58, p. 117–121, 2000.

CRUZ, C. D. *Programa GENES: diversidade genética*. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 585p., 2003.

DATO M. C. F. ; PIZAURO JÚNIOR, J. M.; MUTTON, M. J. R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast

strains during the production of “cachaça”. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 36, p. 70-74, 2005.

DEÁK, T. Methods for the detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 287-292, 1995.

DELLAGLIO F. et al. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines. *Annals of Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 411-425, 2003.

EPHRUSSI, B.; HOTTINGUER, H; CHIMENES. A. M. Action de lacriflavine sur les levures. La mutation “petite colonie”. *Annales del Institut Pasteur*, v. 76, p. 351-367, 1949.

ERNANDES, J.R. et al. Respiratory deficiency in brewing yeasts - effects on fermentation, flocculation and beer flavour components. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 51, p. 16-20, 1993.

ESTEVE-ZARZOSO, B. et al., Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from ‘El Penedès’ area (Spain). *Food microbiology*, v. 17, p. 553-562, 2000.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number os clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular

variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure: extensions to linked *loci* and correlated allele frequencies. *Genetics*, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FERREIRA, M. E. Técnicas e Estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*, GARAY, I.; DIAS, B. (eds.), p. 233-267, Petrópolis: Editora Vozes, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220 p., 1995.

FLEET, G. H. Yeast interactions and winw flavour. *International Journal of Food Microbiology*, v. 86, p. 11-22, 2003.

FLEET, H.; HEARD, G. M. Yeasts: growth during fermentation. In: FLEET, .H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, p.27-55, 1993.

GARGOURI, A. A rapid and simple method for the extraction of yeast mitochondrial DNA. *Current Genetics*, v. 15, p. 235-237., 1989.

GILLILAND, R.B. Yeast classification. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 11, p. 276-284, 1971.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, v. 18, n. 9, p. 1524 – 1528, 1997.

GOMES, F. C. O. et al. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2438–2447, 2007.

GOMES, F. C. O. et al. Produção de cachaça de alambique utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Informe Agropecuário*, v. 30, n. 248, p. 7-00, jan./fev., 2009a.

GOMES, F. C. O. et al. Comparison between Two Selected *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Fermentation Starters in the Production of Traditional Cachaça. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, n.1, pp. 449-455, 2009b.

GONÇALVES et al. Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de cachaçaria do estado da Bahia. In: II Congresso Brasileiro de Cachaça, Salvador, 2009.

GONZÁLES, D. Macadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología*, v. 14, p. 1-12, 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. *Genética moderna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 589 p., 2001.



GUEROLA, P. M. *Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos*. 2006, 190 p. Tesis Doctoral (Doctor em Ciencias Biológicas). Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Departamento de Biotecnología, Universitat de Valencia, Valencia.

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

GUILLAMÓN, J. M. et al. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 708-714, 1994.

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. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 19, p. 122-132, 1996.

HAMMOND, J. Microbiological techniques to confirm CIP effectiveness. *The Brewer*, p. 332-338, 1996.

HENNEQUIN, C. et al. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 551-559, v. 39, 2001.

HIERRO, N. et al. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 102-111, 2006.

HUTTER, A.; OLIVER, S.G. Ethanol production using nuclear petite yeast mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, p. 511-16, 1998.

KHAN, A. R.; HOQ, M. M. Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. *Bangladesh Journal of Microbiology*, Dacca, v. 7, n. 2, p. 119-121, 1990.

KIRSOP, B.E.; C.P. KURTZMAN, eds. Living Resources for Biotechnology: Yeasts. Cambridge University Press, 234 p., 1988.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4 ed., p. 111–121, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, B. V., 1997.

LATOUCHE, G. N. et al. Comparison of Use of Phenotypic and Genotypic Characteristics for Identification of Species of the Anamorph Genus *Candida* and Related Teleomorph Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 12, p. 3171–3180, 1997.

LEHTONEN, M.; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. *Flavour of distilled beverages: Origin and Development*. Florida: Verlag Chemie Internacional Inc., p.64-78, 1983.

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A. BORZANI, W. (Org). Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: E. Blücher, p. 145-182, 2001.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, v. 1, p. 205-208, 2001.

LOPEZ, V. et al. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeast. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p. 75-81, 2001.

LUCENA, B. T. L. Análise de polimorfismo cromossômicos em linhagens de fermentação alcoólica. Mestrado (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

MAIA, A. B. et al. Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade. Belo Horizonte: UFMG; Fundação Cristiano Otoni, 1994.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARINI, M. M. et al. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 235-242, 2009.

MELO, I. S. et al. Biomarcadores e biossensores microbianos. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (orgs.) *Recursos*

*genéticos e melhoramento: microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 149-176, 2002.

MENDES, L.M.; MORI, F.A.; TRUGILHO, P.F. Potencial da madeira de agregar valor à cachaça de alambique. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 52-58, 2002.

MERCADO, L. et al. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, v. 24, p. 403–412, 2007.

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

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

NADAL, D.; COLOMER, B.; PIÑA, B. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 6, p. 1944–1950, 1996.

NARITA, M. et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria.

*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 95, p. 14681–14686, 1998.

NASCIMENTO, R. F., et al. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. *Quím. Nova*, v.21, p.735-739, 1998.

NEI, M., LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academic Science USA*, Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

NEWTON, S.M.C.; GRAHAM, *A Polymerase chain reation*. 2 ed., 1997.

NOVAES, F. V. Processos fermentativos. In: Mutton, M.J.R.; Mutton, M.A. (Org). *Aguardente de cana - produção e qualidade*. Jaboticabal, FUNEP, 171 p., 1992.

OLIVEIRA, E.S. et al. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 707-715, 2005.

OLIVEIRA, E.S. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 19-24, 2004.

OLIVEIRA, V. A. et al. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice

Fermentations and Their Impact in Cachaça Production. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 693–701, 2008.

PASSARGE, E. *Genética: texto e atlas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 456 p., 2004.

PATARO, C. et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Revista de Microbiologia*, v.29, p.104-108, 1998.

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

PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 23, n.217, p. 19-24, 2002a.

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

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 288-295, 2006.

PINHEIRO, P.C.; LEAL, M.C.; ARAÚJO, A.D. Origem, produção e composição química da cachaça. *Química Nova Na Escola*, n. 18, p. 3-8, 2003.

PRETORIUS L.S. Tailoring wine yeast for the new Millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, v. 16, p. 675-729, 2000.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, p. 945-959, 2000.

QUEROL, A.; BARRIO, E. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*. v. 18, p. 1657, 1990.

QUEROL, A. et al. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 2948-2593, 1992a.

QUEROL, A.; BARRIO, E; RAMON, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, v.15, p. 439-446, 1992b.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 21, p. 315-323, 1994.

QUEROL, A.; RAMÓN, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food and Technology*, v. 7, p. 73-78, 1996.

RIBERAU-GAYON, P. et al. *The Handbook of Enology: Microbiology of Wine*. JOHN WILEY and SONS, LTD ED., v. 1, 2° ed., 497 p., 2006.

ROSA, C.A.; SOARES, A.M.; FARIA, J.B. Cachaça production. In: INGLEDEW,

W.M. (Org.). The alcohol textbook. Nottingham: Nottingham University Press, 5<sup>o</sup> ED., p. 481-490, 2009.

ROSA, C. A. et al. Cachaça: os segredos da fermentação. *Ciência Hoje*, novembro, v. 41, p. 67-68, 2007.

SABATE, J., et al. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, p.452-455, 1998.

SCHULLER, D. et al. Panorama ecológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en un viñedo de la región Vinho Verde em Portugal. *Revista Internet de Viticultura y Enología*, n. 10, p. 1-16, 2005.

SCHWAN R.F., et al. Fermentação. In: Cardoso, M.G. (Org). *Produção de água ardent*. 2 ed., Lavras: Editora UFLA, 445 p., 2006.

SCHWAN, R.F., et al. Microbiology and physiology of cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.79, p.89-96, 2001.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais. 259p, 2001.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Forest fragmentation effects in population genetic structure of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scientia Forestalis*, n. 57, p. 123-139, 2000.

SICM - Secretaria da Indústria, Comércio e Mineração, Governo da Bahia. Governo apóia fortalecimento do agronegócio da cana-de-açúcar. Disponível



em [http://www.sicm.ba.gov.br/tela\\_noticia.asp?cod\\_noticia=167](http://www.sicm.ba.gov.br/tela_noticia.asp?cod_noticia=167) Acesso em 31 de agosto de 2006.

SILHANKOVA, L.; SAVEL, J.; MOSTEK, J. Respiratory deficient mutants of bottom brewer's yeast. I. Frequencies and types of mutant in various strains. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 76, p. 280-88, 1970.

SILVA et al. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. *International Journal of Food Microbiology*, 2009.

SILVA FILHO, E. A. *Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação*. 2003, 107 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA-FILHO, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 88, p. 13–23, 2005.

SOUZA, G. A. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.43, n.7, p.843-849, 2008.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical

distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*, *Genetics*, v. 140, p. 767-782, 1995.

VALERO, E. et al. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, v. 7, p. 317–329, 2007.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: KURTZMAN, P.; FELL, J. W. *The yeast: a taxonomic study*. 4 ed., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B. V., p. 358-371, 1997.

VERSAVAUD, A., et al. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p.3521-3529, 1995.

VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J.N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 568-571, 1990.

VIANNA, C.R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 93, p. 205-217, 2008.

VILANOVA, M. et al. Ecology of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous fermentations at a Rías Baixas Appellation Controlé Winery. *Journal Institute of Brewing*, v. 104, n. 4, p. 305-308, 2003.

VINUESA, P. et al. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 2096-2104, 1998.

WEISING, K.; ATKINSON, R. G.; GARDNER, R. C. Genomic fingerprinting by microsatellite primer PCR: a critical evaluation. *PCR Methods and applications*, v. 4, p. 249-255, 1995.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.