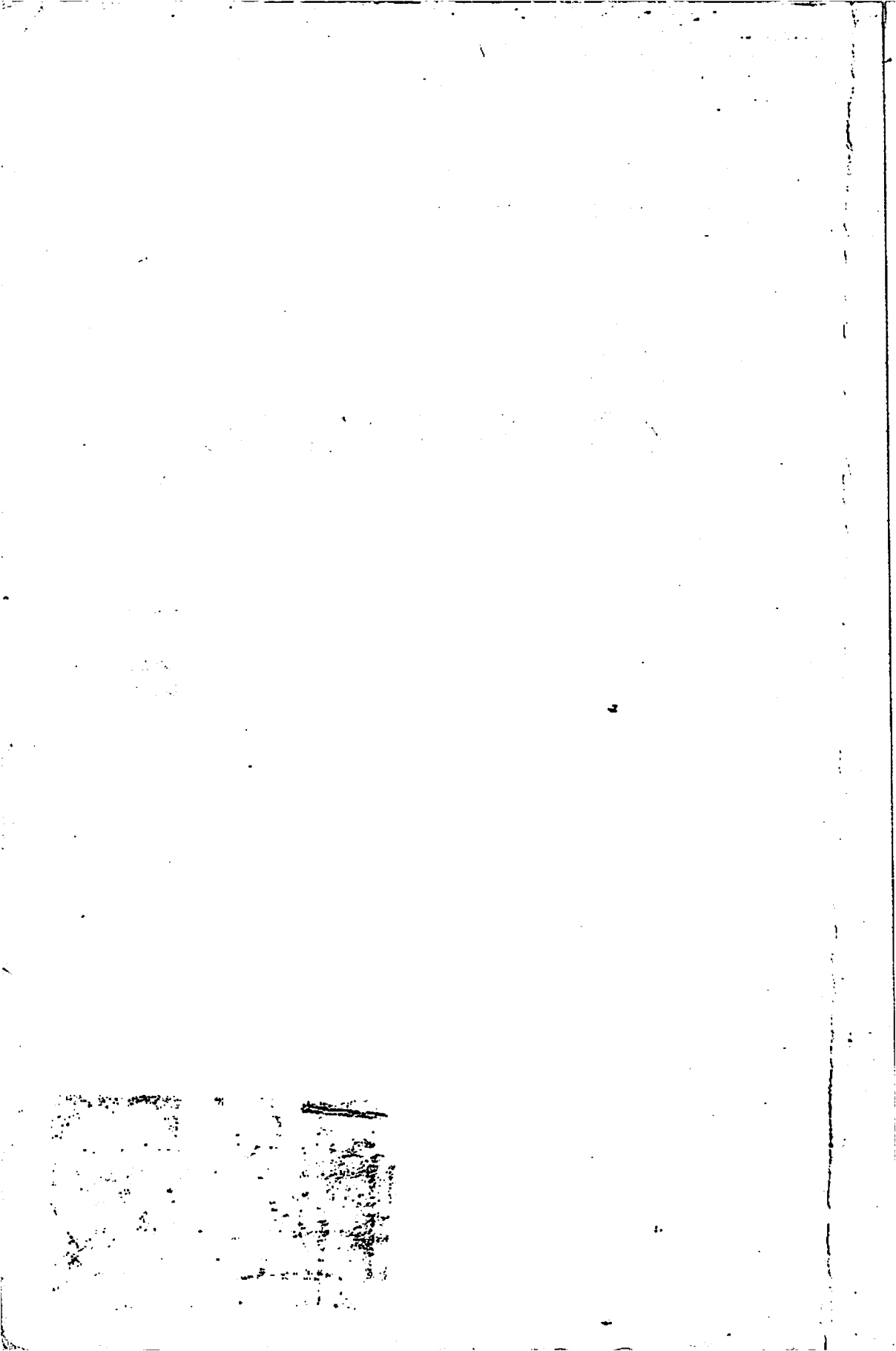


**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DAS
CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE
Saccharomyces cerevisiae PRESENTES EM
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE CANA-
DE -AÇÚCAR**

ALEXANDRE TOURINO MENDONÇA



ALEXANDRE TOURINO MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS
FISIOLÓGICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PRESENTES EM
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE CANA-DE -AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. ROSANE FREITAS SCHWAN

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Mendonça, Alexandre Tourino

Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentação espontânea de cana-de-açúcar / Alexandre Tourino Mendonça. – Lavras : UFLA, 1999.

75 p. : il.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Aguardente. 2. Levedura. 3. Identificação. 4. Fisiologia. 5. Etanol. 6. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.13

-663.53

ALEXANDRE TOURINO MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS
FISIOLÓGICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PRESENTES EM
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE CANA-DE -AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA EM: 22 de abril de 1999

Prof^o Eustáquio Souza Dias UFLA

Prof^a Eliana Pinheiro de Carvalho UFLA



**Prof. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará”

Salmos 23:1

A Deus

**A minha esposa Cristiane,
Aos meus pais José e Otilia, pelo
incentivo, amor, paciência e dedicação.**

**Aos meus irmãos Aloísio e Cynthia,
Aos meus 2^{os} pais Adolfo e Aída, pelo
apoio e carinho.**

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Rosane Freitas Schwan, pela orientação, amizade, incentivo e pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof^ª. Dr^ª. Eliana Pinheiro de Carvalho, pela confiança, estímulo, paciência e amizade.

Ao Prof. Alan Wheals, pela valiosa colaboração e dedicação.

Ao Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias, pelas sugestões e pela participação na banca.

À Capes, pela concessão da bolsa.

Aos colegas de laboratório (Sílvia, Charles, André, Cláudia, Cristina, Míriam, Valéria, Daniela, João, “Carolinas” e Márcio), pelo companheirismo.

Aos amigos Ivana, Beto, Joelma, Dulcinéia e Creuza, pelo apoio e amizade.

Aos amigos Newton e Cidinha, pela ajuda nas análises cromatográficas.

A Janaina, pelo assessoramento nas análises estatísticas.

Às secretárias Gicelda e Andreia, pela colaboração e pelo convívio.

Aos colegas do DCA pela agradável convivência e pelo aprendizado.

Aos Professores e funcionários do DCA, Biblioteca, DBI, PRPG e DRCA pela atenção.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
1.2.1 Introdução.....	2
1.2.2 Conceituação legal da aguardente de cana.....	3
1.2.3 Processo produtivo.....	6
1.2.4 Processo fermentativo.....	6
1.2.4.1 Substrato: matéria-prima.....	6
1.2.4.2 Inóculo.....	8
1.2.5 Sistemas de fermentação.....	9
1.2.5.1 Batelada simples.....	10
1.2.5.2 Batelada alimentada.....	10
1.2.5.3 Processo contínuo.....	10
1.2.6 Levedura.....	11
1.2.7 Identificação de leveduras.....	12
1.2.8 Produtos oriundos da fermentação.....	16
1.2.8.1 Etanol.....	16
1.2.8.2 Glicerol.....	20
1.2.8.3 Ácido Succinico.....	21
1.2.8.4 Ácido acético.....	21
1.2.8.5 Trealose.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
POR TÉCNICAS TRADICIONAIS E MOLECULARES.....	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
2.1 INTRODUÇÃO.....	33
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.2.1 Amostragem.....	34
2.2.2 Preparo da Amostra.....	35
2.2.3 Isolamento e purificação de leveduras.....	35
2.2.4 Preservação dos Isolados.....	35
2.2.5 Caracterização das leveduras.....	36
2.2.5.1 Testes fisiológicos e bioquímicos.....	36
2.2.6 Identificação de leveduras pela técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase)	39
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.3.1 Análise das amostras.....	41
2.3.2 Identificação do gênero <i>Saccharomyces</i> por técnica tradicional (testes bioquímicos e morfológicos) e por PCR.....	45
2.3.3 Identificação do gênero <i>Saccharomyces</i> por PCR.....	46
2.3.4 Comparação entre o método tradicional e a técnica de PCR para identificação de leveduras.....	50
2.4 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CAPÍTULO 3: ESTUDO FISIOLÓGICO DAS LEVEDURAS FERMENTATIVAS.....	54
RESUMO.....	54

ABSTRACT	55
3.1 INTRODUÇÃO	56
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
3.2.1 Microrganismo.....	58
3.2.2 “Screening” da capacidade fermentativa.....	58
3.2.3 Fermentação.....	59
3.2.3.1 Fermentação em Erlenmeyers.....	59
3.2.3.2 Fermentação em pequena escala (2 litros).....	59
3.2.4 Métodos Analíticos.....	60
3.2.4.1 Viabilidade.....	60
3.2.4.2 Análises cromatográficas.....	61
3.2.4.3 Peso seco.....	61
3.2.5 Trealose.....	61
3.2.6 Amostragens.....	61
3.2.7 Análise estatística.....	62
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.3.1 “Screening” de fermentação.....	63
3.3.2 Fermentação em Erlenmeyers.....	64
3.3.3 Fermentação em bateladas sucessivas.....	71
3.4 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

MENDONÇA, Alexandre Tourino. Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentação espontânea de cana-de-açúcar. Lavras: UFLA, 1999. 75p.(Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).

O mercado de aguardente no Brasil é em números absolutos, considerado um dos maiores mercados mundiais de bebidas alcoólicas, mostrando comportamento de produção e consumo invariavelmente ascendente nas três últimas décadas. A razão deste alto consumo reside principalmente no fato da aguardente ter preço relativamente baixo, o que justifica seu amplo consumo pela população de menor poder aquisitivo. A inexistência de padrões de identidade adequados e a falta de controle de qualidade da bebida têm sido as principais barreiras para um maior avanço das aguardentes no mercado externo. A fermentação é o ponto crítico da produção, sendo que as leveduras boas produtoras são as grandes responsáveis pelo gosto e “bouquet” da cachaça. Com o objetivo de obter leveduras com boas características, foi feito o isolamento de leveduras do mosto de fermentação de 10 alambiques da Região Sul do Estado de Minas Gerais. Estas leveduras foram identificadas por técnicas tradicionais utilizando testes bioquímicos e testes moleculares por amplificação do DNA (PCR- “Polimerase Chain Reaction”). Dos 387 isolados, 34% (132 leveduras) foram identificadas como pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, pela técnica tradicional. Utilizando a técnica molecular, foram identificadas 41% (158 leveduras) como pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estes isolados foram testados para selecionar as melhores leveduras produtoras de etanol. O primeiro teste foi efetuado através de fermentação de glicose, sacarose e maltose em tubos de ensaio, sendo selecionadas 50 linhagens de *S. cerevisiae* com menor tempo de fermentação. Posteriormente, empregou-se o teste de fermentação em frascos onde selecionou-se a levedura CA 116 como a melhor produtora de etanol. Esta levedura foi testada em fermentador de bancada com caldo de cana-de-açúcar para verificação de produção alcoólica, em que se confirmou o seu alto potencial de produção alcoólica, bem como a capacidade de flocular, o que facilita o manuseio do processo fermentativo em bateladas.

* Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Eustáquio Souza Dias – UFLA.

ABSTRACT

MENDONÇA, Alexandre Tourino. Identification and investigation of the physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* involved in spontaneous fermentation of sugar cane. Lavras: UFLA, 1999. 75p. (Dissertation –Master program in Food Science).*

The “aguardente” market in Brazil is in absolute figures, regarded as one of the largest world markets of alcoholic beverages, showing production behaviour and unchangingly increasing consumption over the three past decades. The reason for this high consumption lies chiefly in the fact of the brandy being relatively low priced, which accounts for its wide consumption by the low income population. The non-existence of suitable identity patterns and the lack of quality control of the beverage have been the chief barriers to a greater advance of brandies into foreign market. Fermentation is the bottleneck of production, good producing yeasts are the great responsible for both the taste and “bouquet” of cachaça (sugar cane brandy). Fermentative yeasts were isolated from 10 stills of Southern region of Minas Gerais state and identified by traditional techniques (morphological and biochemical tests) and by molecular (PCR-“polimerase chain reaction”). Out of the 387 isolates 34% (132 yeasts) were identified as belonging to the species *Saccharomyces cerevisiae* by the traditional techniques however, using the molecular techniques 41% of the isolates (158 yeasts) were identified as *Saccharomyces cerevisiae*. These identified ones were evaluated for ethanol production. The first screening test was done in tubes verifying the fermentative ability of glucose, sucrose and maltose. From the 158 *Saccharomyces cerevisiae*, 50 were selected as better ethanol producers. These 50 isolates were studied in flasks and the yeast CA 116 was selected as the best producer of ethanol. This yeast was tested in fermentative laboratory scale with sugar cane broth for confirmation and also the ability to flocculate which can facilitate the batch fermentative process was observed.

* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA and Eustáquio Souza Dias – UFLA.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de aguardente de cana-de-açúcar no Brasil é considerado, em números absolutos, um dos maiores do mundo em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, com comportamentos de produção e consumo ascendentes nas três últimas décadas. O Brasil produz 1,2 bilhões de litros de aguardente por ano em alambiques industriais e artesanais. Metade deste valor é produzido no estado de São Paulo, seguido por Minas Gerais com 120 milhões de litros e Pernambuco com 70 milhões (Martin, 1997). A produção de aguardente, além de movimentar cifras astronômicas emprega milhares de pessoas no país inteiro e com isto, desempenha também, um importante papel social na atualidade. No entanto, a inexistência de padrões de qualidade adequados à bebida tem sido hoje a principal barreira para a distribuição das aguardentes no mercado externo.

Um dos pontos críticos da produção da aguardente é a fermentação, pois a qualidade e o rendimento dependem, entre outros fatores, do microrganismo responsável pela produção de etanol (Silva, 1995). A aguardente de cana é obtida pela fermentação natural do caldo de cana-de-açúcar por microrganismos que contaminam o substrato, como leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que são responsáveis pelo gosto e buquê característico da bebida. Algumas leveduras excretam produtos específicos em maior ou menor quantidade, conferindo características peculiares à bebida.

Com o objetivo de contribuir para uma melhoria no padrão de qualidade de aguardentes, no presente trabalho foram isoladas e identificadas leveduras por métodos tradicionais e moleculares, selecionando as que apresentaram melhores características fermentativas.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Introdução

As bebidas alcoólicas existiam desde antes da era cristã, embora seja difícil situar a época, local e origem de cada uma das que atualmente são comercializadas. A produção de bebidas através da fermentação alcoólica é uma prática que remonta a milhares de anos, quando estes produtos originavam-se de processos espontâneos (Aquarone et al., 1986). Supõe-se que as primeiras tentativas de destilação de bebidas ocorreram por volta do século VIII. No entanto, parece que esta prática só se difundiu no século XII, aperfeiçoando-se no século XIII (Maia et al., 1993). As aguardentes comerciais começaram a ser produzidas nas regiões onde ocorriam fermentações de substratos amiláceos, praticamente ao mesmo tempo que nas áreas vinícolas (Aquarone et al., 1986).

A produção de aguardente de cana-de-açúcar no Brasil data do início da colonização (INDI, 1982). Entretanto, as indústrias de aguardente até 1945 eram rurais e rudimentares. O aumento da população e do consumo da bebida exigiu dos alambiques maiores investimentos em pesquisa e tecnologia, a fim de atender não só a demanda do mercado como também as exigências do consumidor.

A cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil. Estimativas indicam que acima de 70 milhões de doses sejam consumidas diariamente, o que resulta numa cifra de aproximadamente 6 litros/habitante/ano. Este consumo gera uma demanda real pelo produto e, conseqüentemente, a produção para suprir esta demanda é um importante segmento industrial e uma fonte geradora de empregos diretos (Fronza,1997). Em termos numéricos, o volume de aguardente de cana produzido em 1996 correspondeu a 90% de todo o volume da produção nacional de bebidas

alcoólicas, excluindo-se a cerveja, o volume de produção nacional é estimado em 5,4 milhões de litros naquele ano (ABRABE, 1996).

É interessante notar a capacidade dos produtores de aguardentes em resistir às crises. Enquanto o setor de bebidas, se ressentia de quedas nas vendas e na produção durante o momento difícil da economia em 1981, as aguardentes batiam recordes de comercialização (Novais, 1997).

Este segmento da economia agro-industrial mineira tem recebido apoio da Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, que aprovou, em junho de 1992, o Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardentes, com os objetivos de expandir a produção e melhorar a qualidade da aguardente de cana (Minas, 1992).

1.2.2 Conceituação legal da aguardente de cana

A aguardente de cana é definida na legislação brasileira (Decreto n.º 73.267 de 6/12/1973 Artigo 105 – ABIA, 1993) como “uma bebida com graduação alcoólica de 38 °GL a 54 °GL, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcar até 0,6 g por 100 mL”.

“Será denominada Aguardente de cana envelhecida ou caninha envelhecida, a que contiver um mínimo de 20% de destilado alcoólico simples envelhecida de cana, podendo ser adicionado de caramelo para correção da cor”.

“O produto que contiver açúcar em quantidade superior a 0,6 g por 100 mL terá a sua denominação acrescida da expressão “adoçada”.

A regulamentação posterior do decreto n.º 73.267 acrescentou os seguintes padrões e critérios (ABIA, 1993):

a) Padrões de identidade

“A destilação deverá ser efetuada de forma que o destilado tenha o aroma e o sabor dos elementos naturais voláteis contidos no mosto fermentado, derivados do processo fermentativo ou formados durante a destilação”.

b) Padrões de qualidade

b.1) Ingredientes básicos

Destilados naturais obtidos somente do mosto fermentado da matéria-prima mencionada na definição do produto.

b.2) Ingredientes opcionais

- **ÁGUA** – A água utilizada na elaboração da aguardente de cana deve ser obrigatoriamente água potável, enfatizando-se as características de sua composição (Tabela 1).

TABELA 1. Composição da água utilizada na elaboração da aguardente.

Componentes	Concentração (mg/L)
Teor máximo de ferro	0,3
Teor máximo de manganês	0,1
Dureza total, teor máximo de carbonato de cálcio	100,0
Oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica	2,0

Fonte: ABIA (1993).

- **AÇÚCARES** – A sacarose (açúcar refinado ou cristal) poderá ser substituída total ou parcialmente por açúcar invertido e glicose nas quantidades estabelecidas em lei.

c) Composição

Os componentes totais voláteis “não álcool” (soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores) não poderão ser inferiores a 0,200 g nem superiores a 0,650 g/100 mL de álcool anidro.

Especificamente os componentes voláteis “não álcool” deverão obedecer aos limites mostrados na Tabela 2.

TABELA 2. Limite de componentes totais voláteis “não álcool” (*) permitidos na aguardente.

Análise	Teor máximo (g/100 mL álcool anidro)
Acidez volátil em ácido acético	0,150
Aldeídos em aldeído acético	0,030
Álcoois superiores	0,300
Ésteres em acetato de etila	0,200
Furfural	0,005

Fonte: ABIA (1993).

(*) Referidos no texto da legislação como impurezas.

d) Aditivos incidentais

- “METANOL – O produto não poderá conter metanol em quantidade superior a 0,25 mL/100 mL de álcool anidro”.

- “COBRE – A aguardente não poderá conter cobre em quantidade superior a 5 mg/L”.

1.2.3 Processo produtivo

Entre os diversos objetivos da produção de aguardente está o fato de que ela deve ser rentável. Para o conhecimento da rentabilidade é necessário saber as perdas, a eficiência do processo e o fluxograma de produção (Figura 1).

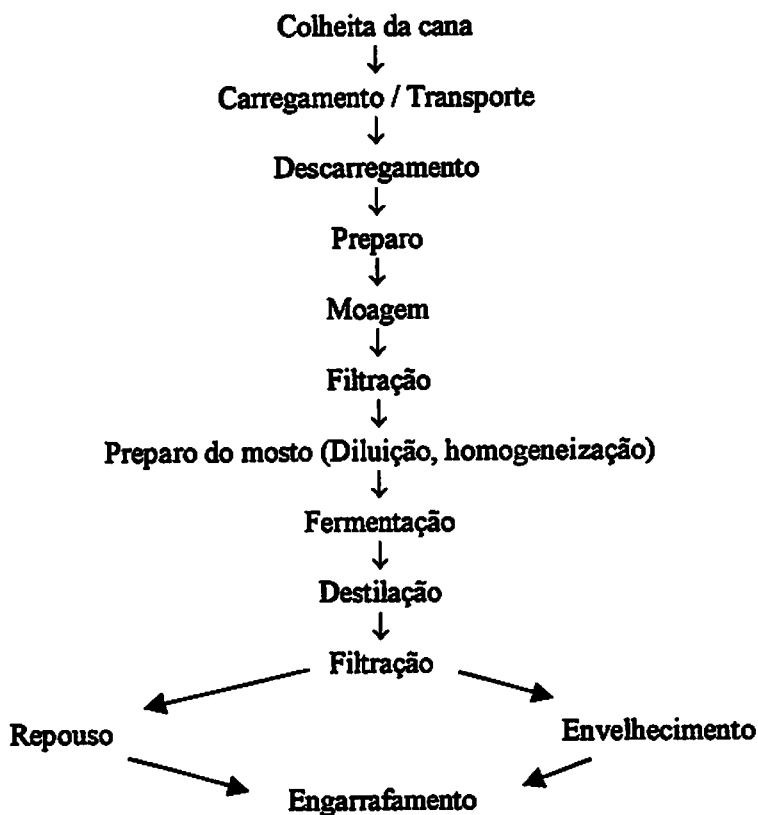


FIGURA 1. Fluxograma de produção de aguardente de cana. Fonte : Silva (1995).

1.2.4 Processo fermentativo

1.2.4.1 Substrato: matéria-prima

O caldo obtido pela moagem de cana-de-açúcar é constituído de água entre 78 e 86%, sacarose entre 10 e 20%, açúcares redutores entre 0,1 e 0,2%,

cinzas entre 0,3 e 0,5% e compostos nitrogenados entre 0,5 e 1,0%. O pH do caldo varia entre 5,2 e 6,8 (Lima, 1975).

Segundo Borges (1965) o caldo de cana contém em quantidades suficientes, substâncias nutritivas para manter satisfatoriamente a ação da microbiota fermentante, embora afirme que a deficiência nutricional em determinados caldos pode exigir adição de alguns sais minerais. A adição de sais minerais é também sugerida para garantir o aumento do rendimento.

Casey et al. (1983, 1984) observaram que o fator limitante para alta produção de etanol pelas leveduras fermentáveis é uma deficiência nutricional e não a toxicidade do etanol, como ocorre no caso da produção de cerveja. Se os requisitos nutricionais são atingidos, um aumento no rendimento da fermentação alcoólica e um acréscimo na concentração final de etanol poderiam ser esperados. Jin et al. (1981), Panchal e Stewart (1981) e Janssens et al. (1983) observaram aumentos na fermentação alcoólica e concentração final de etanol pela suplementação do mosto. Tais aditivos incluem lipídeos, proteínas e vitaminas.

A concentração de açúcares no caldo deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira etapa está relacionada à propagação do microrganismo, que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que nesta etapa o teor de açúcar não seja superior a 2% (p/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é indispensável para um crescimento eficiente. A segunda etapa está relacionada à fermentação propriamente dita, ou seja, a conversão do açúcar em etanol e CO₂. Nesta etapa, o teor máximo de açúcar tolerado pela levedura fermentante é em torno de 15% (p/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo. Concentrações de açúcares superiores a 15% podem inibir a atividade celular e favorecer o acúmulo de

glicogênio, acarretando uma diminuição no rendimento alcoólico (Maia et al., 1993).

Um efeito secundário importante que pode ocorrer durante a fermentação é a repressão catabólica da via oxidativa, conhecido como efeito “*Crabtree*”. Nessa situação, a repressão da atividade respiratória pela glicose livre chega a iniciar-se em concentrações de 10 a 20%. Estas leveduras fermentativas são denominadas “sensíveis à glicose” ou “fermentativas” e se caracterizam pelo comportamento duplo quando em cultura em batelada, onde o etanol produzido torna-se a fonte de carbono quando a glicose se esgota (Maia, 1992).

1.2.4.2 Inóculo

Na indústria de aguardente, a produção de inóculo é ainda realizada de forma empírica (fermento caipira) ou com a inoculação de fermentos prensados utilizados normalmente na panificação. O fermento caipira ou selvagem é composto pela microbiota natural presente na cana, ar, solo, água, etc. Esta microbiota contém microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica e pode também apresentar outros microrganismos que interferem de maneira negativa no processo fermentativo.

No preparo de pés-de-cuba caipira, utilizam-se vários ingredientes como, por exemplo, fubá, farelo de arroz, suco de limão ou laranja azeda (Neder, 1957). O milho e o farelo de arroz devem ser sadios, de boa qualidade, sem o ataque de insetos e fungos. O pH do pé-de-cuba deve estar na faixa de 3,5 a 4,0 (Silva, 1995).

As leveduras fermentativas apresentam características peculiares com relação à tolerância às condições ambientais durante todo o processo fermentativo, desde o pé-de-cuba até o final da fermentação alcoólica. Estes

microrganismos são capazes de tolerar altas concentrações de açúcares, baixos valores de pH e altas concentrações de etanol (Angelis, 1992; Pataro, 1998).

Novaes et al. (1974) afirmaram que os fermentos caipiras são preparados a partir de microrganismos que acompanham o mosto, provenientes da lavoura de cana-de-açúcar, do ar e da água de limpeza dos equipamentos. Esta constatação foi confirmada por Bovi e Marques (1983). Em alambiques de pequena escala, é prática comum o uso deste tipo de fermento (Novaes et al., 1974), o qual, segundo Valsechi (1960), em razão de sua rusticidade e de resistência em meios adversos, é adequado às condições dos referidos alambiques. Este último autor também comenta que a principal desvantagem deste fermento é a sua desuniformidade, uma vez que as leveduras obtidas são pura obra do acaso e, portanto, passíveis de executarem fermentações favoráveis ou não.

1.2.5 Sistemas de fermentação

Dentre os processos industriais para fabricação de aguardente, destacam-se o descontínuo (batelada simples), o semi-contínuo (batelada alimentada) ou contínuo. Estes processos são diferentes apenas na fase de produção de etanol, sendo que as etapas iniciais de formação do inóculo são as mesmas.

Há duas etapas principais nos processos fermentativos: na primeira é preparado o inóculo, também chamado de pé-de-cuba. Nesta etapa, basicamente os microrganismos são multiplicados em condições apropriadas, de modo a garantir o desenvolvimento adequado da segunda etapa que é a conversão de açúcar em álcool ou a fermentação propriamente dita. O volume do inóculo e a concentração de células dependem do processo de fermentação subsequente e do volume de mosto a ser fermentado (Aquarone et al., 1986).

O processo fermentativo em bateladas pode ser dividido em três grandes grupos de acordo com o modo como o fermento é manipulado (Aquarone et. al., 1986; Oliveira, 1993):

- i) Cada dorna recebe um inóculo recentemente preparado (processo de fermentos individuais);
- ii) O inóculo é reciclado ou reaproveitado ao final de cada batelada (processo de recuperação do fermento);
- iii) O inóculo é transferido para outras dornas após o processo fermentativo (processo de cortes ou processo semi-contínuo).

1.2.5.1 Batelada simples

É o processo mais utilizado por produtores de aguardentes artesanais. Consiste na inoculação de uma dorna com o pé-de-cuba e, quando a fermentação atinge um estágio apropriado, sem formação de bolhas, passa-se metade do conteúdo para uma dorna vazia (corte de dorna). Em seguida, completa-se o volume das duas dornas com caldo a ser fermentado.

1.2.5.2 Batelada alimentada

No sistema de batelada alimentada, o substrato é acrescentado à dorna de fermentação através de um fluxo intermitente ou contínuo, regulado de tal forma que o teor de açúcares não ultrapasse um valor pré-fixado. Este sistema permite aumentar a produtividade e o limite de tolerância das cepas ao etanol (Aquarone et al., 1986; Maia et al., 1995). É o sistema utilizado nas destilarias para a produção de álcool combustível.

1.2.5.3 Processo contínuo

Os processos contínuos de fermentação requerem uma retirada permanente de parte do mosto contido no tanque de fermentação. O efluente é

submetido a um sistema de separação da biomassa (centrifugação, filtração em membrana), que é reintroduzida no fermentador após um tratamento ácido para eliminação de bactérias. O mosto isento de biomassa é extraído continuamente como produto final (Silva, 1995).

A produtividade deste processo é maior do que no processo descontínuo devido à ausência de paradas para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação e também devido à maior adaptação das células ao meio fermentante. No entanto, a flexibilidade apresentada neste processo contínuo é menor, fazendo-se necessária a sua automatização para a obtenção de melhores resultados (Alves, 1994).

1.2.6 Levedura

As leveduras são, sem dúvida alguma, o grupo mais importante de microrganismos explorado pelo homem. Suas contribuições ao progresso estão relacionadas com a capacidade de converter açúcares em álcool (Stewart e Russel, 1983). Estes microrganismos são encontrados amplamente na natureza, podendo, na sua maioria, estar presentes em folhas, flores, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares (Kurtzman e Fell, 1998). Elas são definidas como fungos unicelulares, pertencentes às divisões *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Reproduzem-se por reprodução vegetativa e reprodução sexuada (Walker, 1998).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada em fermentações industriais: na panificação, produção de vinho (incluindo cepas floculantes para a produção de cidra), "sake", produção de álcool de amido ou cereal, produção de bebidas alcoólicas, além de servir como ferramenta para estudos de manipulação genética e fusão de protoplastos (Kurtzman e Fell, 1998).

A utilização de *S. cerevisiae* em processos de fermentação alcoólica é muito ampla, pois suporta níveis elevados de etanol (12 a 15%), hidroliza oligossacarídeos, tais como maltotriose e maltotetraose, em glicose para transformação em etanol, e também tolera alta concentração de açúcar (osmotolerante) (Belin, 1995).

1.2.7 Identificação de leveduras

O primeiro esquema de classificação completo e acessível para leveduras produtoras de esporos foi proposto por Stelling-Dekker, em 1932 citado por Phaff e Miller (1978). Diddem e Lodder em 1941 desenvolveram sistemas de classificação para leveduras esporulantes baseados em aspectos morfológicos e bioquímicos (Phaff e Miller, 1978; Kurtzman e Phaff, 1987). Nestes esquemas também foram discutidos alguns aspectos fisiológicos importantes da classificação, como a habilidade das leveduras em fermentar glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose e rafinose, e em crescer em determinados açúcares e alguns compostos nitrogenados. Em 1952, Lodder e Kreger-van Rij escreveram a mais extensa publicação sobre taxonomia de leveduras (Kurtzman e Phaff, 1987), revisada por Lodder (1970), Barnett et al. (1983) e Barnett et al. (1990).

Leveduras são tradicionalmente classificadas e identificadas em função de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras. Esses microrganismos apresentam uma grande variação na habilidade de fermentar açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose, como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Kockovaella*, são

estritamente não-fermentativos (Van der Walt e Yarrow, 1984; Kurtzman e Fell, 1998). Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies estudadas (Walker, 1998), enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, trioses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies (Phaff, 1990 ; Walker, 1998).

Normalmente, as leveduras são capazes de assimilar amônia, mas nem sempre de assimilar nitratos, nitritos, aminas ou alguns aminoácidos. Muitos gêneros, como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Dipodascus*, são caracterizados pela incapacidade de utilizar o nitrato, enquanto nos gêneros *Pseudozyma*, *Citeromyces* e *Wickerhamiella*, todas as espécies utilizam o nitrato. Entre as leveduras imperfeitas (reprodução sexuada não conhecida) podem ocorrer linhagens nitrato-positivo e nitrato-negativo, como nos gêneros *Candida* e *Trichosporon* (Van der Walt e Yarrow, 1984; Kurtzman e Fell, 1998).

Outros parâmetros também de grande importância para a identificação taxonômica de leveduras são o crescimento em temperaturas elevadas, em meios com altos teores de açúcares ou cloreto de sódio, o requerimento de vitaminas e a susceptibilidade à ciclohexamida. Estes parâmetros e a excreção de certos metabólitos são de grande importância, uma vez que auxiliam no agrupamento das linhagens de acordo com o habitat da levedura.

Apesar da taxonomia convencional ser bastante eficiente e de grande importância, os testes requerem muito tempo de trabalho (Pincus et al., 1988; Belin, 1995) e nem sempre a reprodutibilidade é mantida. Para diminuir o número de erros e agilizar a identificação, foram desenvolvidos métodos alternativos como os "kits" para análise (Api System, Any Analtab Products Inc., Nunclon Delta S1). Estes sistemas ainda possuem pouca abrangência e são válidos somente para grupos restritos de leveduras (Fleet e Mian, 1987; Augustyn et al., 1991). Deak e Beuchat (1993) utilizaram, para identificação de

nucleotídeos sejam complementares à seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Augustyn et al., 1991).

Em estudos realizados por Van Vuuren e Van der Meer (1987), utilizando a técnica de (PCR), foi possível identificar linhagens de *Saccharomyces* utilizadas na indústria vinícola. Através da taxonomia molecular também é possível comparar as relações filogenéticas entre linhagens de leveduras. Foi observada uma certa similaridade entre *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis* (renomeada de *Debaryomyces occidentalis*, Kurtzman e Fell, 1998) e *Saccharomyces cerevisiae* (Lanchance, 1992).

A facilidade, rapidez, versatilidade e a sensibilidade da técnica de PCR torna-a particularmente poderosa para os estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos. A técnica de PCR tem tido impacto no campo da biologia molecular, incluindo genética humana, ciência forense, biologia evolutiva, ecológica e de população (Augustyn et al. 1991).

1.2.8 Produtos oriundos da fermentação

1.2.8.1 Etanol

Dentre os metabólitos secretados pela levedura, o etanol é o produzido em maior quantidade. As principais bebidas produzidas por fermentação alcoólica (Tabela 3), em todo o mundo, são as fermentadas, cerveja, vinho e cidra e as destiladas, aguardente, rum, uísque, “sake” (Walker, 1998).

proteínas, resultará numa maior compreensão da evolução das leveduras e propiciará uma taxonomia geneticamente relacionada.

Algumas técnicas de taxonomia molecular de leveduras utilizadas atualmente são: conteúdo de guanina e citosina do DNA nuclear (% G + C) (Nakase e Komagata, 1970), homologia de DNA (Smith et al., 1990), análise do RNA ribossomal (Lachance, 1992; Yamada et al., 1990; Kurtzman, 1993), determinação da seqüência de aminoácidos de enzimas (Smith et al., 1990) e análise de ácidos graxos da parede celular (Cottrell e Kock, 1985; Kock e Van Der Walt, 1986; Brondz et al., 1989; Augustyn et al., 1991; Bendová et al., 1991; Botha e Kock, 1993).

Kurtzman e Phaff (1987), em uma revisão da composição de DNA de leveduras, mencionaram que leveduras ascomicéticas apresentam uma porcentagem de G + C abaixo de 50% (entre 27-50%), enquanto as basidiomicéticas apresentam uma porcentagem acima deste valor (entre 50 e 70%). A determinação da composição das bases do DNA é valiosa na descrição de novas espécies de leveduras. O conteúdo de G + C entre espécies de um mesmo gênero geralmente apresenta uma variação de 10%.

Outra alternativa de identificação molecular é o uso da técnica de PCR ("polymerase chain reaction"). Esta técnica consiste na amplificação "in vitro" de seqüências de DNA pela extensão simultânea de "primer" (iniciador) de fitas complementares de DNA (Thangavelu e Wheals*, 1999). A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos, pequenas moléculas de DNA de fita simples utilizadas como "primers" que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes "primers" são sintetizados "in vitro" de maneira que suas seqüências de

*comunicação pessoal.

nucleotídeos sejam complementares à seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Augustyn et al., 1991).

Em estudos realizados por Van Vuuren e Van der Meer (1987), utilizando a técnica de (PCR), foi possível identificar linhagens de *Saccharomyces* utilizadas na indústria vinícola. Através da taxonomia molecular também é possível comparar as relações filogenéticas entre linhagens de leveduras. Foi observada uma certa similaridade entre *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis* (renomeada de *Debaryomyces occidentalis*, Kurtzman e Fell, 1998) e *Saccharomyces cerevisiae* (Lanchance, 1992).

A facilidade, rapidez, versatilidade e a sensibilidade da técnica de PCR torna-a particularmente poderosa para os estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos. A técnica de PCR tem tido impacto no campo da biologia molecular, incluindo genética humana, ciência forense, biologia evolutiva, ecológica e de população (Augustyn et al. 1991).

1.2.8 Produtos oriundos da fermentação

1.2.8.1 Etanol

Dentre os metabólitos secretados pela levedura, o etanol é o produzido em maior quantidade. As principais bebidas produzidas por fermentação alcoólica (Tabela 3), em todo o mundo, são as fermentadas, cerveja, vinho e cidra e as destiladas, aguardente, rum, uísque, “sake” (Walker, 1998).

TABELA 3. Produção de bebidas alcoólicas.

Características	Bebidas			
	Cerveja	Vinho	Uísque	Outras destiladas
Matéria Prima	cevada + (arroz e milho)	Uva	Cevada (malte), trigo	Cevada, milho, melaço, uva, soro de leite, etc.
Pré-tratamento	Fermentação do malte	esmagamento maceração	fermentação	variável dependendo do substrato
Fermentação	<i>S. cerevisiae</i> .	<i>S. cerevisiae</i> flora natural	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> e <i>K.</i> <i>marxianus</i> (soro de leite)
Reciclagem de levedura	Sim	Não	Não	Não
Destilação	Não	Não	Sim	Sim
Maturação	Pouca	longa (anos)	longa (anos)	Sim
Alcool final % (v/v)	3 - 6	8 - 12	40 - 45	35 - 56

Adaptado de Walker (1998).

A fermentação alcoólica compreende uma série de reações bioquímicas de oxidação-redução de açúcares produzindo energia. Compostos orgânicos atuam como receptores finais de elétrons. A degradação de açúcares, como a glicose e frutose, pode ocorrer aeróbica ou anaerobicamente. O processo de degradação anaeróbio é realizado por células que convertem o açúcar em etanol e CO₂ (Oliveira, 1993).

As reações que se processam durante o catabolismo parcial do açúcar pela levedura *S. cerevisiae* são apresentados na Figura 2.

O processo segue a rota da via glicolítica, após a qual ocorrem sucessivamente, a descarboxilação do piruvato e a redução do acetaldeído a etanol. Esta última reação é de vital importância para que a célula recupere seu poder oxidante (NAD⁺) quando em ausência de oxigênio (Lehninger, 1990).

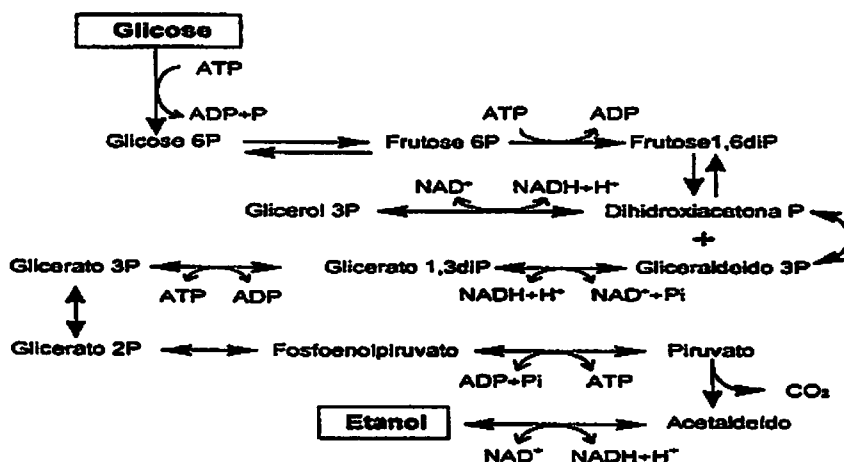
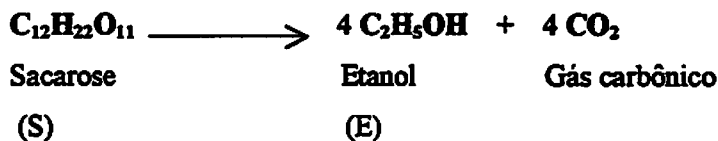


FIGURA 2. Via fermentativa da degradação da glicose em etanol (Embden, Meyerhorf, Parnas) (Lehninger, 1990).

O rendimento da fermentação alcoólica é definido como a relação entre o volume de etanol produzido, estabelecido com base em cálculos teóricos, e o volume que se obtém na prática (Maia et al., 1993). Os cálculos teóricos podem ser realizados de duas maneiras: na primeira, toma-se como base a relação estequiométrica de uma molécula de sacarose para quatro de etanol e, com este dado, calcula-se o chamado “rendimento *Gay-Lussac*”.



$$\text{Rendimento Gay Lussac} = \frac{(\text{E}) \times 342 \times 0.789}{(\text{S}) \times 4 \times 46} \times 100$$

sendo:

(E) teor de etanol no mosto fermentado (% v/v)

342 massa molecular da sacarose (g/mol)

0,789 densidade do etanol (g/mL)

(S) teor de sacarose no meio de fermentação (% p/v)

4 número de moléculas de etanol formadas a partir de um mol de sacarose

46 massa molecular do etanol (g/mol)

A segunda forma de se fazer os cálculos, e a mais empregada, considera a afirmação de *Pasteur* de que nem todo o açúcar é transformado em etanol, razão pela qual a proporção máxima estequiométrica é multiplicada pelo fator 0,947, obtendo-se assim o valor como “rendimento *Pasteur*”.

$$\text{Rendimento Pasteur} = \frac{(E) \times 342 \times 0.789 \times 100}{(S) \times 4 \times 46 \times 0.947}$$

Para a produção de aguardente, um rendimento *Pasteur* de 85% é considerado satisfatório (Maia et al., 1993). Rendimentos inferiores podem ser traduzidos em desperdício de açúcar, maior consumo de energia na destilação, vinhoto mais poluente e aguardente de pior qualidade, devido aos produtos gerados durante a destilação dos açúcares não fermentados (Maia et al., 1993).

Para a fabricação de bebidas e álcool combustível, são utilizados todos os substratos que podem ser fermentáveis, tais como frutas (uva, maçã, pera, jabuticaba), cereais (cevada, milho, trigo, centeio, arroz), cana-de-açúcar e seus derivados, batata, beterraba, palmeira e mel (Jouret, 1995).

Muitos substratos são utilizados por espécies do gênero *Saccharomyces* como fonte de energia. Os trissacarídeos podem ser utilizados por algumas leveduras para a produção de etanol, porém, várias espécies os incorporam

exclusivamente em massa celular (Reed e Pepler, 1973). Além dos carboidratos, outros compostos podem ser assimilados por *Saccharomyces* como fonte de carbono. Dentre eles, o mais importante é o etanol, produzido aerobicamente ou anaerobicamente, que pode ser utilizado posteriormente pela via metabólica do glioxilato (Reed e Pepler, 1973). O crescimento aeróbico em etanol é muito baixo quando comparado ao crescimento em meios contendo açúcares fermentáveis, e a conversão de etanol em biomassa é bastante elevada (39%) (Strathern et al., 1982).

1.2.8.2 Glicerol

O glicerol e o ácido succínico representam os produtos secundários de maior excreção durante a fermentação alcoólica realizada por *S. cerevisiae* (Jennings, 1984). Segundo Alves (1994), cerca de 4 a 5% do açúcar metabolizado pela levedura foi transformado em glicerol, dos quais 20 a 57% encontram-se acoplados à formação do ácido succínico.

O glicerol é um importante composto do “flavour” em muitas bebidas alcoólicas, particularmente nas bebidas japonesas (“shochu”) (Omori et al., 1995). A produção de glicerol pela célula de levedura pode ser influenciada pela adição de uréia ao substrato a ser fermentado, o que acarreta diminuição de seus teores (Oliveira, 1993). Outro componente que afeta negativamente a produção de glicerol é o ácido oxálico (Basso, 1996). Um intenso arejamento pode acarretar queda no rendimento fermentativo, provocado pelo aumento da formação do glicerol (Basso e Amorim, 1988).

Segundo Gomes (1988), a produção de glicerol poderá ser influenciada por teores de fósforo e potássio no início do ciclo fermentativo. Quando são adicionadas doses de 50 e 100 mM de água oxigenada como agente modificador do potencial de redução, ocorrem drásticas reduções no rendimento fermentativo e peso do fermento, e incremento na produção de glicerol. Por outro lado, uma

dose de 10 mM (370 ppm) não afeta tais parâmetros e promove redução na taxa de infecção do mosto, principalmente em mosto sulfilado (Basso, 1988).

Uma característica importante do glicerol é sua capacidade de agir como um metabólito osmoregulador no meio fermentativo, pois, em meio com baixa atividade de água, a sua produção sofre um aumento determinado pela presença de sais e açúcares. Essa propriedade aumenta a capacidade da levedura de resistir às taxas mais elevadas de solutos (Jovall et al., 1990; Tokuoka, 1993).


1.2.8.3 Ácido Succínico

O ácido succínico é sintetizado e secretado por leveduras quando o ciclo de Krebs sofre uma limitação enzimática (Hough et al., 1982). A produção desse ácido ocorre em maior velocidade na primeira hora de fermentação, quando 60% do total do ácido succínico é produzido (Basso, 1996). O ácido succínico é produzido predominantemente pela levedura, enquanto o ácido láctico é produzido por bactérias contaminantes (Alves, 1994).

A literatura não atribui a formação de ácido succínico a nenhuma necessidade fisiológica da levedura. Foi comprovado que, isolando-se o efeito pH, o ácido succínico exerce uma ação antibacteriana em efeito sinérgico com etanol, sugerindo a existência de uma razão ecológica para a formação de ácido succínico pelas leveduras. Neste aspecto, as leveduras tornam-se mais competitivas no ambiente fermentativo de uma destilaria pelo exercício de um controle das bactérias presentes (Basso, 1996).

1.2.8.4 Ácido acético

O ácido acético é o principal ácido volátil produzido durante a fermentação, originado, em alguns casos, devido a atividade bacteriana (Whiting, 1976).



O efeito do pH gerado pelo ácido acético sobre o crescimento e a atividade fermentativa de *Saccharomyces* tem sido analisado. Estudos realizados por Phowichinda et al. (1995) demonstraram que o pH gerado pelo ácido acético não afetou as atividades de crescimento e fermentação, mas, em contrapartida, o ácido acético teve um efeito inibidor de contaminações bacterianas, provavelmente causado por sua concentração na forma dissociada presente no meio de fermentação. O ácido acético é um ácido fraco e não se ioniza totalmente quando presente em solução. Estudos mostram, ainda, que aumentando o pH de 4,5 para 6,5, ou utilizando aeração eficiente, o ácido acético acumulado durante a fermentação pode causar intoxicação de leveduras (Meinander et al., 1994).

A formação de acetato durante a fermentação apresenta-se correlacionada com a de piruvato, sugerindo que este é convertido em acetato. O acetato é excretado no início da fermentação (Coote e Kirsop, 1974). Loureiro-Dias e Peinado (1989) constataram que o ácido acético não afeta o transporte de glicose, mas exerce ação inibitória sobre a enolase, modificando o controle glicolítico, sugerindo a participação da ATPase no controle do pH citoplasmático.

1.2.8.5 Trealose

A trealose é um dissacarídeo não redutor, formado por duas moléculas de glicose ligadas pelo carbono anomérico.

A função protetora da trealose é resultado da inter-relação entre sua localização e mobilização na célula. Sua presença no citoplasma onde é acumulada, exerce uma influência na atividade de água do citossol, contribuindo para desaceleração do metabolismo (latência), aumentando a resistência ao estresse hídrico. Em condições de baixa atividade de água, a trealose na

membrana (nos 2 lados da camada de fosfolipídio) substitui as moléculas de água, mantendo a integridade da membrana (Basso, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação). **Compêndio da legislação de alimentos. Consolidação das normas e padrões de alimentos.** São Paulo: ABIA, 1993. v. 2.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 128p. (Tese – Mestrado em Microbiologia.).
- ANGELIS, D.F.A. **Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam A fermentação etanólica.** In.: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. **Aguardentes de cana: Produção e qualidade** Jaboticabal: FUNEP, 1992. p.49-65.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, V.A. **Biotecnologia engenharia bioquímica.** São Paulo: Edgard Blucher, 1986. v. 3, 243p.
- ABRABE-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS. **Produção de bebidas “quentes” no Brasil em 1996.** [s.l], 1996.
- AUGUSTYN, O.P.H.; FERREIRA, D.; ROCK, J.L.F. **Differentiation between yeasts species and strains within a species by cellular fatty acid analysis.** *Systematic Applied Microbiology*, Stuttgart, v.14, p.329-334, Jan. 1991.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and identification.** Cambridge, Cambridge: University Press, 1983. 811p.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, P. **Yeasts: characteristics and identification.** Cambridge. Cambridge: University Press, 1990. 1002p.
- BASSO, L.C. **Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo.** In: AMORIM, H.V. **Processo de produção de álcool.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1996.p.50-80.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Efeito do arejamento sobre a fermentação. Relatório Fermentec Piracicaba: ESALQ/USP, out. 1988. p26-46.

g BELIN, J.M. Las leveduras. In: BOURGEOIS, C.M.; LARPENT, J.M. Microbiologia Alimentaria, Fermentações alimentaria. Zaragoza: Acriba, 1995. cap.2, p.19-30.

BOTHA, A.; KOCK, J.L.F. Application of Fatty Acid Profiles in the Identification of Yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 19, n. 1, p.39-51, June, 1993.

BRONDZ, I.; OLSEN, I.; SJOSTROM, M. Gas Chromatographic Assesment of Alcoholized Fatty Acids from Yeasts, a New Chemotoxonomic Method. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.27, n.12, p.2815-2819, Dez. 1989.

BENDOVÁ, O.; RICHTER, U.; JANDERONA, et al. Identification of industrial yeasts strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. *Applied Microbiology and Biotechnonology*, Berlim, v.35, n.6, p. 810-812, Sept. 1991.

g BORGES, J.M. Aguardente de cana. Viçosa, MG: UREMG, 1965 329p. (Série divulgada: boletim 3)

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. *Álcool & Açúcar*, Piracicaba, v. 3, n. 9, p.10-13, mar. 1983.

o CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: nutrient: enhanced production of high concentration of ethanol by brewing yeast. *Biotechnonology Letters*, , v. 5, n.6, p.429-434, Mar. 1983.

g CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, D.C., v. 48, n.3, p.639-646, Sept. 1984.

COOTE, N; E KIRSOP, B.H. The content of some organic acids in beer and other fermented media. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v 80 p.474-483, June, 1974.

- COTTRELL, M.; KOCK, J.L.F. The yeast family *Lipomycetacea*. A historical account of its delimitation, the taxonomic relevance of cellular long-chain. Fatty acid composition and other phenotypic character. *Systematic Applied Microbiology*. v. 12, n.5, p. 291-305. Jan. 1985.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L.R. Comparison of the SIM, API 20C and ID 32C system for identification of yeast isolated from fruit juice concentrates and beverages. *Journal of Food Protection, Iowa*, v.56, n.7, p.585-592, July. 1993.
- DIDDEM, H.A; LODDER, J. On some sporogenous yeasts and their imperfect stages. *Micropathologia*: [s.l], v2, n°1, p28-36, 1941. *apud* PHAFF, H.J.; MILLER, M.W. The life of yeasts. 2 ed. Massachusetts: Harward University Press, 1978. p. 1-15.
- FLEET, G.H.; MIAN, M.A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam Elsevier. v. 4, n.6, p. 145-155, Oct. 1987.
- FRONZA, D. Efeito do etanol, sacarose e pH sobre levedura etanológica isolada de mosto para a produção de aguardente. Viçosa: UFV, 1997, 53p. (Tese Mestrado-Microbiologia).
- GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura. *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba: ESALQ/USP, 1988, 206p. (Tese-Mestrado-Microbiologia).
- HOUGH, J.S.; BROGGS, D.; STEVEN, R.; YOUNG, T.W. Malting and brewing science. London: Chapman e Hall, 1982, v.2, .567p
- INDI -INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL DE MINAS GERAIS Aguardente em Minas Gerais: estudo setorial. Belo Horizonte, 1982. 90p.
- JANSSENS, J.H.; BIRRIS, N. WOODWARD, A; BAILEX; R.B. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, D.C., v. 45, n. 2, p.598-602, Fev. 1983.
- JENNINGS, P.H. Polyol metabolism in fungus. *Advances in Microbial Physiology*. London, n.25, p.149-93, Dez. 1984.

- JIN, C.K.; WANG, S.S. Continuous production of ethanol in a two stage fermentation of *Zymomonas mobilis* using soy flour as a protective agent. **Enzyme Microbiology Technology**, [s.l], 4, p. 256-264, June. 1981.
- JOURET, C. Las bebidas destiladas. In: **Microbiologia Alimentaria**, BOURGEOIS, C.M.; LARPENT, J.P. Zaragoza: Acriba, 1995. v. 2, Cap. 5, p. 125-134.
- JOVALL, P.; TUNBLAD-JOHANSSON, I.; ADLER, L. Analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, Berlin, n.154, p.209-214, Aug.. 1990.
- KOCK, J.L.F.; VAN DER WALT, J.P. Fatty acid composition of *Saccharomyces Lindner*. **Systematic Applied Microbiology**. [s.l], v. 8, p.163-165. Sept. 1986.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: A Taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier. 1984. 1082p.
- KURTZMAN, C.P; PHAFF, H.J. Molecular taxonomy In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeast**. v.1, p.64-94, 1987.
- KURTZMAN, C.P. Systematic of the Ascomycetus Yeasts Assessed by Ribosomal RNA Sequence Divergence. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht , v 63, n.2, p.165-174, Fev. 1993.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: A Taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055p.
- LANCHANCE, M.A. Restriction mapping of DNA and taxonomy of *Kluyveromyces* In: VAN der WALT. **Yeast**. v. 5, p. 379-383, 1992.
- LEHNINGER, A.C. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1990 725 p
- LIMA, V.A. Produção de etanol. In: LIMA, V.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgar Blucher, 1975. p. 48-69.
- LODDER, J. **The yeasts: A Taxonomic study**. London: North Holand 1970. 1385p.

- LOUREIRO-DIAS, M.C.; PEINADO, J.M. Effect of ethanol on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, kew, v. 4, n.3, p. 721-724. Mai. 1989.
- MAIA, A.B.R.A. Fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae*: desenvolvimento de um novo sistema e novas concepções sobre a formulação de meios. Belo Horizonte: UFMG, 1992. 210p. (Tese de Doutorado-Microbiologia).
- MAIA, A.B.R.A. (Coord.); PEREIRA, A. J. G.; SCHAWABE, W. Tecnologia para produção de aguardente de qualidade. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1993. 65p.
- MAIA, A.B.R.A.; RIBEIRO, J.C.G.M.; SILVEIRA, L.C.II. Curso Associação Mineira de produtos de Aguardente de Qualidade – Produção artesanal de aguardente de qualidade. Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 104p.
- ✶ MARTIN, P.S. ‘ Pinga em min” *Jornal SÁ*. Belo Horizonte, 30 março, 1997 p.24-27.
- MEINANDER, N.; HAHW HAGERDAL, B.; LINKO, M. et al. Fed batch xylitol production with recombinant XYL1 expressing *Saccharomyces cerevisiae* using ethanol as a co substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.42, n.2-3, p.334-339, Fev. 1994.
- MEYER, S.A. Systematics of *Hanseniospora ziks* and *Kloeckera*. *Antonie van Leeuwenhoek*, [s.l], v. 44, p. 79-96 Mar. 1991.
- MINAS. Lança Pró-Cachaça. *Jornal Brasil*, Rio de Janeiro, 28. Jun. 1992. Caderno de Negócios e Finanças p.4.
- NAKASE, T.; KOMAGATA. Significance of DNA base composition in the classification of the genus *Pichia*. *Journal of Applied Microbiology*. [s.l], v.16, p. 511-521. June. 1970.
- NEDER, R.N. Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana. Posição sistemática e valor industrial. Piracicaba: ESALQ/USP.1957. 79p. (Tese -Doutorado em Microbiologia).
- NOVAES, F.V. I Curso de extensão em tecnologia de aguardente de cana. Piracicaba: ESALQ, 1974. 104p.

NOVAIS, F.V. Em nome da qualidade da aguardente de cana. **Engarrafador Moderno**. Piracicaba, 4 jan. 1997, p.68-73.

OLIVEIRA, E.S. **Fermentação alcoólica: produção industrial de etanol**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia/UFMG, 1993. 24p. (Apostila do Departamento de Alimentos).

OMORI, T.; AGAWA, K.; SHIMADA, M. Breeding of high glycerol producing shachu yeast (*Sacchacomycetes cerevisiae*) with acquired salt-tolerance. **Journal of Fermentation**. London. v.79, p.560-565, Mar. 1995.

PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Ethanol production by a highly flocculent brewing yeast strain. **Journal of Microbiology**; [s.l] v. 22, . p.711-717, Mar. 1981.

PEREIRA, T.I. O sucesso das cachaças. **Gazeta Mercantil**, Brasília, 3 dez 1981, p27-31.

PATARO, C; SANTOS, A; CORREA, S.R; MORAIS, B.B; LINARDI, V.R; ROSA, A .C. Physiological characterization of yeast isolated from artisanal fermentation in na aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29 p104-108, June. 1998.

PHAFF, H.J. Isolation of yeasts from natural sources. In: LABEDA, D.P. **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 53-79.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W. **The life of yeasts**. 2 ed. Massachusetts: Harward University Press, 1978. p. 1-15.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soils. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeast: biology of the yeasts**. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p. 123-180.

PHOWICHINDA, O.; DELIADUPUY, M.L.; STREHAIANG, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, London, v.17, n.2, p.237-242, Mar. 1995.

PINCUS, D.H.; SALKIN, I.F.; HURD, N.J.; LEVY, I.L.; KAMMA, M.A. Modification of potassium nitrate assimilation test for identification of clinical important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.1,n.7, p.366-368, Mar. 1988.

PRAPHAILONG, W.; VAN GESTEL, M.; FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Evaluation of the Biolog system for the identification of food and the beverage yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 24, n. 6, p. 455-459, June. 1997.

REED, G.; PEPPLER, H.J. *Yeast technology*. Westport: AVI, 1973. 378 p.

SILVA, C.A.B. *Produção de aguardente*. Viçosa: FUNBRAE, 1995. v.4, 34p.

SMITH, M.Th.; YAMAZAKIM; POOT, G.A. *Dekkera, Brettanomyces and Eniella*: eletrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology. *Yeast*. [s.l], v. 6, n.8, p. 299-310, July. 1990.

STELLING-DEKKER, W.M. Die sporogenen Hefen. *Micropathologia*: [s.l], v2, nº28, p1-597, 1932. *apud* PHAFF, H.J.; MILLER, M.W. *The life of yeasts*. 2 ed. Massachusetts: Harward University Press, 1978. p. 1-15.

STEWART, G.G.; RUSSEL, I. *Yeast genetics: fundamental and applied aspects*. NewYork, Sept. 1983, 865p.

STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*. New York: Cold Spring Laboratory, 1982. 680p.

TOKUOKA, K. A review sugar and salt tolerant yasts. *Journal of Applied Bacteriology*, London, v.74,n.8, p101-110, Nov. 1993.

VALSECHI, O. *Aguardente de cana-de-açúcar*. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, 1960. 90p.

VAN VUUREN, H.J.J. e VAN DER MEER, L. Fingerprinting of yeasts by protein electrophoresis. *American Journal Enology and Viticulture*, [s.l], n.4, v. 38, p. 49-53, Mar. 1987.

VAN DER WALT, J.P; YARROW, D. *Methods for Isolation, Maintenance, Classification and Identification of Yeasts*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *The yeasts: A Taxonomic study*.3 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 45-104.

WHITING, G.C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages a review. *Journal of the Institute of Brewing London*, v.82, p.84-92, June, 1976.

g WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. England: Willy, 1998.
342p.

YAMADA, Y.; NAKAGAWA, Y.; BANNO, I. The molecular phylogeny of the Q-10 equipped species of the Heterobasidiomycetous yeast gennus Rhodorporidium Danno based on the partial sequences of 18s and 26s acids. **Journal of the General Applied Microbiology**. Washington, v. 36, n.12 p. 435-444, Out. 1990.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* POR TÉCNICAS TRADICIONAIS E MOLECULARES

RESUMO

MENDONÇA, Alexandre Tourino. Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por técnicas tradicionais e moleculares. Lavras: UFLA, 1999. 22p.(Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).*

A produção de aguardente não utiliza levedura selecionada, utilizando como inóculo para o processo fermentativo o fermento selvagem. A principal desvantagem deste fermento é a sua desuniformidade, uma vez que as leveduras obtidas são puramente obra do acaso. As amostras foram coletadas de mosto fermentante durante a safra de 1997, em 10 alambiques, na região sul do estado de Minas Gerais. O estudo teve como objetivo o levantamento da população de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Outro objetivo foi comparar dois métodos de identificação: um tradicional, que utiliza testes bioquímicos e morfológicos e outro molecular PCR, que utiliza primer específico para identificação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Das 387 leveduras isoladas do mosto de cana-de-açúcar foram obtidas 132 e 158 pertencentes à espécie de *Saccharomyces cerevisiae*, identificadas pelo método tradicional bioquímico e morfológico, e pela técnica de PCR “Polimerase Chain Reaction”, respectivamente. Isto pode ser explicado pela maior eficiência do método em questão. Espera-se, com estes resultados, obter melhor reconhecimento da população de *Saccharomyces cerevisiae* e, por conseguinte estabelecer sistemas de monitoramento mais eficazes nos processos de fermentação utilizados.

* Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Eustáquio Souza Dias – UFLA.

ABSTRACT

MENDONÇA, Alexandre Tourino. **Identification of *Saccharomyces cerevisiae* by traditional and molecular techniques.** Lavras: UFLA, 1999. 22p. (Dissertation –Master program in Food Science).*

“Aguardente” production does not utilize selected yeast, by utilizing as a inoculum for the fermentative process the wild yeast. The main disadvantage of this inoculum is its non-uniformity since the yeast obtained are purely at random. Samples were collected from fermenting must during the year 1997 in 10 stills in the southern region of the state of Minas Gerais. The study aimed a survey of the *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations. Other objective was to compare two identification methods, one traditional that uses biochemical and morphological test and another molecular PCR (*polimerase chain reaction*) utilizing primer specific to the identification of yeast of the *Saccharomyces cerevisiae* species. Out of the 387 yeast isolated from sugar cane must, 132 and 158 *Saccharomyces cerevisiae* identified by the morphological and biochemical method and by the methodologs using PCR were found. This difference between those methods can be explained by the efficiency of the method in question. It is expected with this results to obtain better identification of the *Saccharomyces cerevisiae* population and hence establish more effecient monitoring systems in the fermentation processes utilized.

* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA and Eustáquio Souza Dias – UFLA

2.1 INTRODUÇÃO

O processo de fermentação natural da cana-de-açúcar para a produção de aguardente é variável e dependente do inóculo utilizado, da variedade da cana-de-açúcar, da diluição do caldo e da temperatura da sala de fermentação. O preparo do fermento normalmente praticado pelos produtores é empírico e de baixa reprodutibilidade (Silva, 1995).

Estudos de caracterização taxonômica e fisiológica de microrganismos envolvidos no processo fermentativo e também dos contaminantes presentes na fermentação são de extrema importância para evitar problemas na produtividade e qualidade.

A diferenciação entre as leveduras fermentativas responsáveis pela produção de etanol (*Saccharomyces cerevisiae*) e outras leveduras também presentes é um dos problemas a serem solucionados para uma melhor compreensão da fermentação alcoólica (Martin, 1997). Existe uma série de técnicas utilizadas para a identificação de leveduras, tais como testes bioquímicos e morfológicos, Kits de identificação e técnicas moleculares. Os testes bioquímicos e fisiológicos baseiam-se na capacidade das leveduras de fermentar e assimilar diferentes açúcares e compostos nitrogenados, respectivamente (Kurtzman e Fell, 1998). As técnicas onde são empregados kits de identificação (Api System Any Analbtab Products Inc, Nunclon Delta S1) são mais limitadas com relação à diferenciação de espécies (Heard e Fleet, 1990; Augustyn et al, 1991). Técnicas moleculares como PCR, ("Polimerase Chain Reaction"), RAPD (DNA polimorfismo amplificado com primers aleatórios) e RFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) permitem uma análise filogenética das leveduras, porque têm como alvo o material genético do organismo, evitando, muitas vezes, erros de interpretação provenientes de variações fenotípicas em função de modificações do ambiente.

A diferenciação entre leveduras responsáveis pelo processo fermentativo e outras leveduras contaminantes pode ser conseguida com a utilização de meios de cultura seletivos, convencionais para certos grupos de leveduras. Estes procedimentos apresentam um grau de confiabilidade relativamente alto, no entanto, ainda podem ocasionar erros de identificação.

A técnica de PCR, além de ser mais precisa que a tradicional, possibilita um estudo mais rápido das populações leveduriformes responsáveis pela fermentação alcoólica.

Este trabalho teve como objetivo a identificação de leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*, isoladas a partir da fermentação alcoólica para a produção de aguardente, por técnicas tradicionais (testes bioquímicos e morfológicos) e pela técnica de PCR.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostragem

As amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas no decorrer da safra de 1997, de 10 alambiques do sul de Minas Gerais.

As amostras foram coletadas aleatoriamente nas domas de fermentação nos meses de maio (início da produção), agosto (meio da produção) e novembro (final da produção). As amostras foram coletadas manualmente com auxílio de frascos estéreis de 250 mL, aproximadamente 10 horas após o início da fermentação, acondicionadas em gelo, transportadas para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA e analisadas imediatamente.

2.2.2 Preparo da Amostra

As amostras coletadas foram submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em três diferentes meios de cultura: WL (Difco) e CCL (caldo de cana 7° Brix, extrato de levedura 1% e agar 1,5%) e YW (Extrato de levedura 3%, extrato de malte 3%, peptona 5%, glicose 10%, (Wickerhan, 1951)), pH 3,5. As placas em triplicata foram incubadas por 48 h a 30°C. Após este período, foi avaliada a população total viável de microrganismos e de leveduras.

2.2.3 Isolamento e purificação de leveduras

Após a contagem dos microrganismos, colônias de diferentes meios de cultura foram selecionadas de forma a compor uma amostragem representativa das amostras examinadas. As colônias morfológicamente distintas foram assepticamente transferidas para seus respectivos meios de isolamento, purificadas e codificadas. Após a incubação a 30°C por 48-72 horas, foram caracterizadas quanto à coloração, brilho, textura, superfície, forma, margem e elevação das colônias.

2.2.4 Preservação dos Isolados

A manutenção das culturas foi feita utilizando-se métodos de preservação e armazenamento a baixas temperaturas, com o objetivo de se minimizar perdas de viabilidade e propriedades industriais das linhagens. As culturas puras foram transferidas para tubos inclinados contendo meio YW e, após o crescimento das linhagens, foram estocadas a 4°C. Essas culturas foram reativadas periodicamente para identificação.

2.2.5 Caracterização das leveduras

O estudo taxonômico das leveduras foi efetuado utilizando testes fisiológicos, bioquímicos e morfológicos, os quais constituem a base para a classificação das leveduras (Kreger Van Rij, 1984; Kurtzman e Fell, 1998).

2.2.5.1 Testes fisiológicos e bioquímicos

- **Fermentação de Carboidratos (Kurtzman e Fell, 1998).**

As linhagens foram testadas quanto à capacidade de fermentação de diferentes carboidratos (glicose, sacarose e maltose) em tubo de ensaio contendo tubos de Durham, 2 mL de meio básico (0,45% de extrato de levedura e 0,75% de peptona) acrescidos de 1,0 mL do carboidrato de interesse.

Os carboidratos foram esterilizados em autoclave a 121°C/3 minutos, exceto a sacarose, que foi esterilizada por filtração (Whatman 0,45 µm) e estocada em solução a 6%.

A inoculação foi feita a partir de placas de Petri com crescimento de 24 horas em meio YW a 27° C. As leituras foram realizadas no período de 12, 18, 34, 48, e 72 horas e 7, 14 e 21 dias.

O potencial fermentativo foi registrado e considerado:

Positivo: tubo de Durham com 1/3 a 3/3 de gás em 1 a 3 dias de incubação.

Lento: tubo de Durham com 1/3 a 3/3 de gás em período superior a 3 dias.

Fraco: tubo de Durham com apenas bolhas de gás.

Negativo: ausência de produção de gás.

- **Teste empregando a técnica de "replica plate"**

A técnica de "replica plate" é utilizada para o teste de assimilação de composto de carbono, assimilação de compostos nitrogenados, testes de crescimento a 35 e 37°C, osmotolerância e resistência a cicloheximida (Hagler et al., 1990; Peçanha, 1993; Prada, 1994).

A técnica de "replica plate", utilizada neste trabalho, consistiu no emprego de um multi-inoculador que permite inocular 21 culturas diferentes em uma mesma placa de Petri.

Os inóculos foram preparados a partir de culturas crescidas em meio YW por 48 horas, transferidas para tubos "ependorffs" contendo 1 mL de água destilada estéril. Aliquotas de 0,3 mL dessa suspensão celular foram transferidas para os orifícios da placa matriz, a partir da qual foram inoculadas as placas testes, utilizando o multi-inoculador.

- **Assimilação de compostos de carbono**

Para a caracterização das linhagens isoladas, foram testadas várias fontes de carbono: glicose, galactose, maltose, rafinose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, glicerol, galactiol, D-manitol, D-glucitol, salicina, 2-K-D-galactiol, succinato, citrato e metanol.

As placas inoculadas foram incubadas por 21 dias a 25°C. Os resultados foram observados com 7, 14, e 21 dias de incubação.

Foram utilizadas, como controle positivo, uma placa com YNB agar (Difco) e glicose e, como controle negativo, somente placas com YNB agar (Difco).

- **Assimilação de compostos nitrogenados**

Foram testadas as seguintes fontes de nitrogênio: nitrato de potássio (0,78 g/100 mL); nitrato de sódio (0,26 g/100 mL), L-lisina (0,56 g/100 mL) e etilamina (0,64 g/100 mL).

- **Osmotolerância a 10%**

Para o teste de osmotolerância, foi utilizado o meio basal (glicose 7,0%, peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2,0%).

O teste de tolerância à alta concentração de sal (NaCl 10%) foi realizado pela técnica de "replica plate". As placas foram incubadas a 27°C e as leituras realizadas com 7, 14, e 21 dias de incubação.

- **Resistência à cicloheximida**

A tolerância das leveduras a altas concentrações de cicloheximida (actidiona) foi verificada utilizando-se a técnica de "replica plate". Foram testadas as concentrações de 100 e 1000 ppm.

- **Crescimento a 35 e 37°C**

A capacidade de crescimento das culturas a 35 e 37°C foi verificada utilizando-se o caldo YW. Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados em banho-maria, na temperatura desejada, com o nível de água pelo menos um centímetro acima do limite superior do meio existente nos tubos. A avaliação do crescimento das leveduras foi realizada através da turbidez do meio após 48 horas de incubação.

- **Microcultivo**

Algumas leveduras apresentam a característica de formar pseudomicélio em determinados meios de cultura.

Culturas de leveduras foram inoculadas em lâminas escavadas contendo meio ágar acetato e, posteriormente, cobertos com uma laminula para observação ao microscópio durante 7 dias, em intervalos de 12 horas. A formação de esporos sexuais pode ser observada também por esta técnica, o que pode ocorrer em algumas linhagens.

2.2.6 Identificação de leveduras pela técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase)

A técnica de PCR, que se baseia na amplificação de regiões específicas de DNA a partir de “primers” de sequência conhecida, foi utilizada para a identificação de linhagens de *Saccharomyces* (Tangavelu e Wheals*, 1999)

Os “primers” foram escolhidos a partir das informações do sequenciamento do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.genome.stanford.edu/Saccharomyces/>) e testados com linhagens *S. cerevisiae* de várias coleções. Os “primers” foram definidos por Tangavelu e Wheals (1999) após vários testes, certificando-se de que os mesmos amplificam somente fragmentos de DNA pertencentes a *Saccharomyces cerevisiae*. Colônias crescidas em YEPD (Extrato de levedura 3,0%, extrato de malte 3,0%, glicose 10,0%, agar 10,0%) por 24 horas a 28°C foram utilizadas para extração do DNA cromossômico. Foram coletados 7 mg de massa celular e transferidos para tubo “eppendorffs” contendo 50 µl de solução enzimática (0,48 g de sorbitol (Sigma), 5mg de liticase (sigma), 5µl de EDTA e 2,5 mL de água bidestilada estéril). A mistura foi incubada à 37°C por 30 a 60 minutos. Para a reação de PCR, foi utilizada a seguinte mistura de componentes:

* Comunicação pessoal.

Reagentes	Para 10 reações μ l
Taq polimerase 5U/ μ l (Pharmacia)	0,5
dNTP (2,5 mM)	1,0
MgCl ₂ (Pharmacia)	10,0
Primers (2p mol/ μ l)	5,0
H ₂ O	68,85
Volume final	85,0

Esta mistura de reagentes foi transferida para os tubos de reação (8,5 μ l/tubo) onde já se encontravam 1,5 μ l da amostra a ser testada, perfazendo um volume final de 10 μ l para cada tubo.

As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador (Amp PCR System 9700-Perkin Elmer) utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 5 minutos no primeiro ciclo de amplificação e 30 segundos nos demais ciclos; anelamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 5 minutos. Foram realizados 35 ciclos de amplificação nessas condições. Ao final do processo, a temperatura foi reduzida por 4°C, assim mantida até a retirada dos tubos, perfazendo um total de 2 horas e meia.

Aliquotas das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando-se 10 μ l de cada amostra no gel. A corrida foi conduzida a 150 volts constantes, por 50 minutos.

O gel foi corado com brometo de etídio (10 μ l de brometo, 500 mL de água destilada) por 15 minutos e observado em um transiluminador (Transilluminator 2000 Bio Rad) de luz ultravioleta. Após a análise, o gel foi fotografado com uso de câmera Polaroid (BioRad).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise das amostras

Dez alambiques situados na Região Sul de Minas Gerais foram analisados quanto às suas características microbiológicas e químicas. Estes estabelecimentos foram escolhidos por apresentarem diferentes tipos de dornas de fermentação e de métodos diferentes para o preparo de inóculo e para o tratamento de caldo de cana-de-açúcar. Amostras foram coletadas em três épocas diferentes durante a safra (início, meio e fim) e em condições normais de fermentação. As Tabelas 1 e 2 resumem os dados bioquímicos e microbiológicos obtidos. A maioria dos produtores consultados não tem como prática medir o grau Brix e também a maioria não dilui o caldo de cana antes da fermentação. Dois alambiques (nº3 e nº6) apresentaram a melhor produtividade considerando a quantidade de litros de mosto para produzir um litro de aguardente (Tabela 1). Estes dois produtores normalmente diluem o caldo antes da fermentação. Farinha de milho (fubá) é normalmente adicionada durante a fermentação como fonte de nutrientes, uma vez que o caldo de cana-de-açúcar por si só não é um substrato rico para o desenvolvimento das leveduras. A farinha de milho tem ação no controle do pH, mantendo-o a 4,2 no início e 3,2 no final. A farinha de milho é considerado por estes produtores como indispensável para a produção de aguardente de qualidade, como constatado por (Maia, 1993) em fermentações para a produção de aguardente. Além da manutenção do pH a valores adequados, a farinha de milho tem a importante função de adsorção de metabólitos secundários da própria fermentação, pelo amido, cuja presença poderá afetar a cinética microbiana (Maia, 1995). Dos quatro produtores que não adicionam fubá durante a fermentação, dois (nº7 e nº10) tiveram problemas com a fermentação, como contaminação bacteriana, baixa viabilidade do fermento e consequentemente pouco rendimento alcoólico.

TABELA 1. Métodos de fermentação usados em diferentes alambiques para a produção de cachaça.

Doma						
Alambiques	volume	material	Inóculo	Preparo do caldo	Adição de fubá Kg	Rendimento Caldo/L de aguardente
1	500 L	Alvenaria e fibra de vidro	'fermento-caipira'	sem diluição e sem aquecimento	20	5 a 7L /1L de aguardente 41° GL
2	500 L	Alvenaria e fibra de vidro	'fermento-caipira'	sem diluição e sem aquecimento	20	5 a 7L /1L de aguardente 43° GL
3	300 L	Chapa de aço carbono	'fermento-caipira'	diluído para 7°Brix de 30°C.	5	4 a 5L /1L de aguardente 40° GL
4	400 L	Alvenaria	'fermento-caipira' + 'fermento prensado'	sem diluição	15	6 a 5L /1L de aguardente 40° GL
5	200 L	Madeira	'fermento prensado'	sem diluição	20	6 a 7L /1L de aguardente 41° GL
6	120 L	Fibra de vidro	'fermento-caipira'	diluído para 14°Brix.		4 a 5L 1L de aguardente 40° GL
7	200 L	Alvenaria	'fermento-caipira'	sem diluição		-
8	300 L	Alvenaria	'fermento-caipira'	sem diluição	25	-
9	700 L	Madeira	Não quis informar	sem diluição		5L /1L de aguardente 48° GL
10	500 L	Madeira	'fermento prensado'	sem diluição		6 a 7L /1L de aguardente 40° GL

TABELA 2. Parâmetros físico-químicos do mosto de cana-de-açúcar em fermentação nos diferentes alambiques no Sul de Minas Gerais, no momento de coleta das amostras.

Alambique	Temperatura (°C)		pH	etanol (%)
	Ar	mosto		
1	24	28	3,50	6.2
2	25	30	3,70	6.5
3	25	29	3,80	7.0
4	27	30	3,00	4.0
5	27	25	3,90	5.0
6	25	32	3,20	4.8
7	22	30	4,10	3.5
8	25	31	3,20	6.0
9	27	32	3,18	7.0
10	25	30	4,00	6.1

Alguns produtores foram relutantes em explicar o modo como preparavam o fermento e conduziam a fermentação, apesar de terem sido informados que na divulgação dos resultados não seriam mencionados os nomes dos alambiques. Como conseqüência, dados como produtividade e freqüência de problemas não foram sempre disponíveis. Esta pequena limitação não interferiu na pesquisa, uma vez que os dados quantitativos foram consistentes com as evidências observadas.

O tamanho da dorna de fermentação dentre os alambiques visitados variou entre 120 a 700 L, observando-se uma diferença na performance do processo fermentativo em relação ao volume fermentado ou ao material de construção da dorna. As dornas de madeira podem ser fontes de contaminações como mencionado por Amorim (1996), onde cita que um dos pontos de contaminação é o tipo de material com que é feita a dorna (Tabela 1). Foi observada uma tendência de utilização do formato retangular, nas dornas mais antigas, enquanto as mais modernas são cilíndricas, o que facilita a limpeza.

[REDACTED]

O método de preparo do inóculo chamado “fermento caipira” foi o mais comum entre os produtores, embora alguns prefiram inóculos com adição de fermento de panificação prensado. Este método tradicional implica na seleção natural de leveduras selvagens com boas propriedades fermentativas e, na maioria das vezes, *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie predominante (Tabela 3). Entretanto, em dois dos alambiques, outras espécies de leveduras foram predominantes, o que comprometeu a qualidade da fermentação.

As amostragens realizadas no meio do período de fermentação mostraram que a temperatura do mosto fermentante pode atingir cerca de 5°C acima da temperatura ambiente (Tabela 2). O valor do pH já havia decrescido para valores abaixo de 4,0 e, nesta fase da fermentação, a concentração de etanol foi de aproximadamente 6%, embora uma variação de 3,5% para 7,0% tenha sido observada, sugerindo uma grande diferença na velocidade de fermentação.

A população de leveduras variou em proporções acima de 45 vezes entre os alambiques (Tabela 3). Esta constatação reflete o método que o produtor utilizou para preparar seu inóculo. Como esperado, *S. cerevisiae* foi a levedura predominante em quase todos os alambiques.

TABELA 3. População leveduriforme encontrada nas dornas de fermentação dos diferentes alambiques no Sul de Minas Gerais.

Alambique	População leveduras UFC/mL	Número de leveduras isoladas	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Outras Leveduras
1	2,2x10 ⁷	29	7
2	4,0x10 ⁸	27	9
3	4,0x10 ⁸	30	7
4	2,2x10 ⁷	20	11
5	4,0x10 ⁸	18	15
6	3,0x10 ⁸	8	21
7	1,0x10 ⁸	6	24
8	1,0x10 ⁹	22	8
9	9,0x10 ⁷	24	8
10	9,0x10 ⁷	17	11

2.3.2 Identificação do gênero *Saccharomyces* por técnica tradicional (testes bioquímicos e morfológicos) e por PCR.

Foram isoladas 387 linhagens de leveduras nos 10 alambiques estudados. A população de leveduras variou entre as amostras analisadas (Tabela 3). Das amostras identificadas, 32% foram classificadas como *Saccharomyces cerevisiae*. Os isolados de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram, em sua maioria, colônias pequenas ou puntiformes, de coloração branca, superfície lisa, margem ondulada e cilíndrica, forma circular e brilho perolado. Castro (1995), ao isolar e identificar a população leveduriforme da fermentação alcoólica para a produção de álcool, identificou 44,85% das leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

As linhagens estudadas apresentaram gemulação bipolar, produziram ascos persistentes com ascósporos esféricos não conjugados, em número de 2 a 4 por asco, em meio acetato ágar com 7 dias de incubação a 28°C. Nenhum biotipo produziu micélio verdadeiro. Em alguns biotipos, observou-se a formação de pseudomicélio. Castro (1995) encontrou resultados morfológicos semelhantes quando estudando isolados de fermentação alcoólica para a produção de álcool combustível.

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* fermentaram e assimilaram glicose vigorosamente. Algumas espécies fermentaram e assimilaram sacarose, havendo uma fraca assimilação e fermentação de maltose. Não houve assimilação de nitrato de potássio, eritritol, M-inositol e celobiose.

Não se observou crescimento em meio sem vitamina e na presença de cicloheximida (100 e 1000 ppm). Não houve produção de película quando a cultura foi crescida a 35 e 37°C e não houve resposta positiva ao teste de osmotolerância a 10% de NaCl. Em estudos realizados por Castro (1995) e Martini & Martini (1998), as leveduras isoladas e identificadas por esses autores,

como da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram as mesmas características.

2.3.3 Identificação do gênero *Saccharomyces cerevisiae* por PCR.

Para a identificação por PCR, foram utilizadas 387 leveduras isoladas de 10 alambiques do Sul de Minas Gerais identificadas por técnica tradicional (testes bioquímicos e morfológicos). Das 387 linhagens, 158 leveduras foram identificadas como sendo *S. cerevisiae*.

As Figuras 1 e 2 mostram onde houve a amplificação do DNA cromossômico pela presença de bandas no gel. A presença de uma banda no gel significa que naquela amostra houve o anelamento dos “primers” e consequente amplificação do DNA naquela região, o que só era esperado para leveduras *S. cerevisiae*.

Considerando que a técnica de identificação molecular é relativamente recente, há poucos estudos com identificação de leveduras. Vários métodos, tais como padrões eletroforéticos, cariotipagem por eletroforese em campo pulsado e polimorfismo de DNA, têm sido propostos para a identificação e caracterização de linhagens de leveduras (Echeverrigaray et al, 1994). Para a identificação de leveduras “Killer”, um procedimento relativamente simples, como a utilização de eletroforese em gel de agarose, permitiu a visualização das bandas de dsRNA responsáveis pela característica (Sato et al., 1993). Por outro lado, a técnica de “fingerprinting”, apesar de mais complexa, é uma das mais eficientes ferramentas para a identificação de indivíduos e análise da variabilidade genética. Com esta técnica, Echeverrigaray et al. (1994), utilizando sondas obtidas a partir de sequências de DNA repetitivas (mini-satélites), obtiveram perfis com alto grau de polimorfismo em linhagens de *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, permitindo identificar todas as linhagens, mesmo aquelas altamente relacionadas.

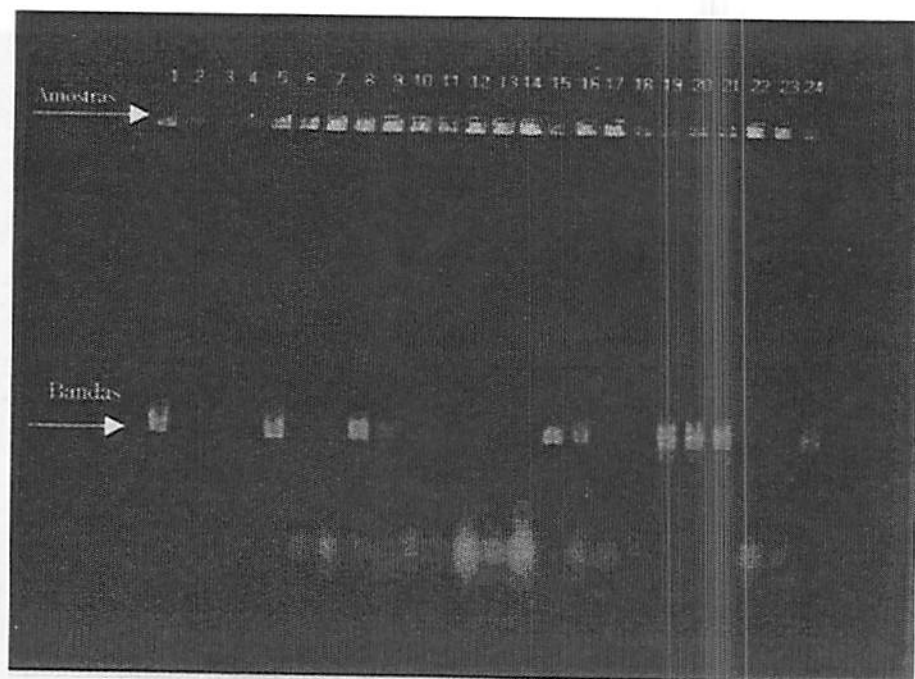


FIGURA 1. Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA em leveduras. Os números de 1 a 24 representam os isolados de leveduras testados.

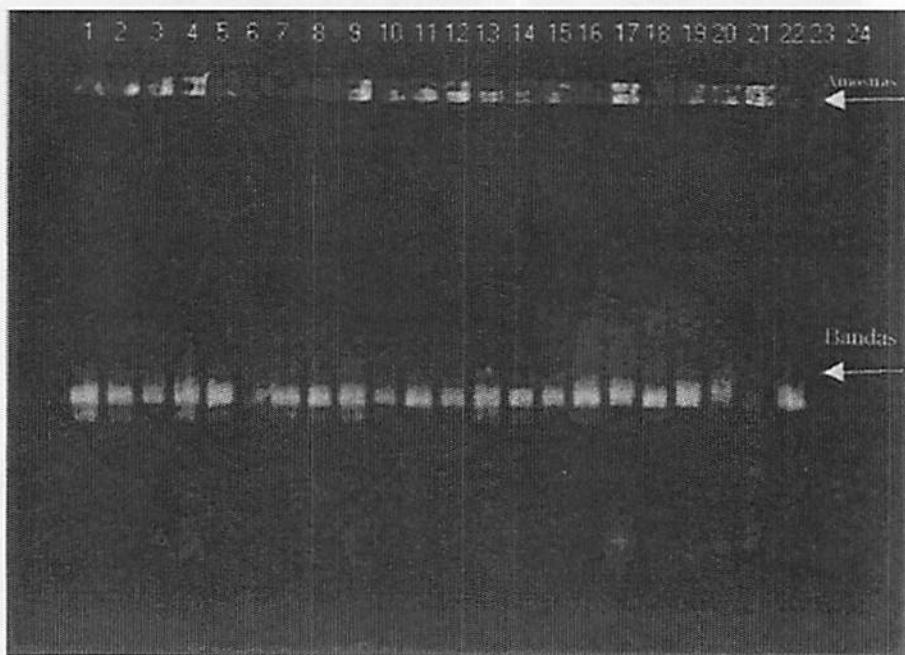


FIGURA 2. Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA em leveduras. Os números de 1 a 24 representam os isolados de leveduras testadas.

Giudice et al. (1998) utilizaram a técnica de cariotipagem por eletroforese em campo pulsado para comparar linhagens de *S. cerevisiae* com diferentes perfis de temperatura, distinguindo entre linhagens crio-tolerantes e não crio-tolerantes. No entanto, segundo os autores, foi difícil distinguir entre diferentes espécies do grupo apenas com base no cariótipo eletroforético, considerando que o polimorfismo é uma característica comum entre linhagens da mesma espécie. Linhagens com perfis eletroforéticos idênticos são consideradas como pertencentes à mesma espécie, mas linhagens mostrando ligeiras diferenças nos seus padrões eletroforéticos não necessariamente pertencem a grupos taxonômicos diferentes.

Sabete et al. (1998), em estudo sobre a sucessão ecológica num processo de fermentação espontânea, utilizaram um método de análise de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA) para avaliar a influência de fatores climáticos sobre a dinâmica populacional de linhagens nativas de *S. cerevisiae*. Para a distinção de diferentes linhagens, o mtDNA foi clivado com a enzima *Hinf* I, enquanto que, para a distinção entre diferentes espécies, utilizou-se a enzima *Rsa* I. Com isto, todos os isolados foram identificados como sendo *S. cerevisiae*, considerando que o padrão obtido com a enzima *Rsa* I revela fragmentos de restrição espécie-específicos. Portanto, a técnica de análise de restrição do mtDNA apresentou a vantagem de permitir uma distinção entre diferentes linhagens e também entre diferentes espécies.

A grande vantagem da utilização da técnica de PCR é que, além de um protocolo de execução muito simples, os resultados são diretos, com a presença ou ausência da banda de amplificação, eliminando qualquer erro de interpretação e permitindo uma análise mais rápida. Isto é de fundamental importância, principalmente quando se considera que nas técnicas de "fingerprinting" e análise de restrição de mt DNA é imprescindível a utilização de uma técnica de extração de DNA que permita uma digestão completa do DNA para a obtenção

- KREGER, VAN. RIJ, N.J.W. *The yeasts: A Taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. 1984. 1082p.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeasts: A Taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055p.
- MAIA, A.B.R.A.; PEREIRA, A. J. G.; SCHAWABE, W. *Tecnologia para produção de aguardente de qualidade*. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1993. 65p. (Curso de Extensão).
- MAIA, A.B.R.A.; RIBEIRO, J.C.G.M.; SILVEIRA, L.C.I.I. *Curso Associação Mineira de produtos de Aguardente de Qualidade – Produção artesanal de aguardente de qualidade*. Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 104p.
- MARTIN, P.S. “Pinga em mim”. *Jornal SÁ*. Belo Horizonte, 30 março, 1997 p.24-27.
- MARTINI, A.N.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Rees. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. 1998. p. 361-363.
- PEÇANHA, M.P. *Parâmetros microbiológicos da água de Ribeirão Claro, SP*. Instituto de Biociência. Universidade Estadual Paulista, 130p, 1993. (Tese Mestrado-Microbiologia).
- PRADA, G.M.M. *Leveduras associadas às frutas de espécies nativas da estação ecológica da Juréia Itaim (Peruibe – SP)*. Rio Claro: Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, 1994. 134p. (Tese – Mestrado em Microbiologia).
- SABETE, J.; QUEROL, A.; GUILHAMON, S.M. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*, [s.l] v. 26, n°4 p. 452-455. Sept. 1998.
- SATO, H.H; PASTORE, G.M; PARK, Y.K. Study of some characteristics of newly isolated Killer yeast. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.4, n°24 p.71-72., June. 1993
- SILVA, C.A.B. *Produção de aguardente*. Viçosa: FUNBRAE, 1995. v. 4, 34p.

iii) Considerando a sua rapidez e sensibilidade, a técnica de PCR pode ser utilizada para a identificação de leveduras contaminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar. Fermentec – ESALQ – USP. 1996, v. 3. 103p.
- AUGUSTYN, O.P.H.; FERREIRA, D.; ROCK, J.L.F. Differentiation between yeasts species and strains within a species by fatty acid analysis. *Systematic Applied Microbiology*, Stuttgart, v.14, n°2, p.329-334, Jan. 1991.
- BELIN, J.M. Las leveduras. In: BOURGEOIS, C.M.; LARPENT, J.M. *Microbiologia Alimentaria, Fermentações alimentarias*. Zaragoza: Acriba, 1995. Cap.2, p.19-30.
- CASTRO, M.M.S. Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabolismo. Campinas, 1995, 124p. (Tese – Mestrado em Ciências de Alimentos)
- ECHEVERRIGARAY,S; TAVARES; GAL,O; HILLEL,J. Minisatellite probes in yeast DNA Fingerpriting. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.25, n°4 p.207-209, Mar., 1994
- GIUDICI, C.; CAGGIA, C.; PULVIRENTI, A.; RAUNIERI, S. Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. *Journal of Applied Microbiology*. [s.l], v. 84, n°5 p. 811-819.Sept. 1998.
- GRIFFIN, H.G. Direct PCR Screening of lambda and cosmid libraries. In: GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. *PCR tecnologia current innovations*. Florida: CRC press p 53-57 ,1994
- HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A diazonium blue B test for yeasts grown three days on yeasts carbon-base urea agar. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.22, n. 1, p.71-74, Mai. 1990.
- HEARD, G.M.; FLEET, G.H. A convenient microtitre assay procedure for yeasts identification. *Journal of Applied Bacteriology*. England: Oxford, v.68, n°8, p.447-451, Sept. 1990.

- KREGER, VAN. RIJ, N.J.W. *The yeasts: A Taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. 1984. 1082p.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeasts: A Taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055p.
- MAIA, A.B.R.A.; PEREIRA, A. J. G.; SCHAWABE, W. *Tecnologia para produção de aguardente de qualidade*. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1993. 65p. (Curso de Extensão).
- MAIA, AB.R.A.; RIBEIRO, J.C.G.M.; SILVEIRA, L.C.LI. *Curso Associação Mineira de produtos de Aguardente de Qualidade – Produção artesanal de aguardente de qualidade*. Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 104p.
- MARTIN, P.S. “Pinga em mim”. *Jornal SÁ*. Belo Horizonte, 30 março, 1997 p.24-27.
- MARTINI, A.N.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Rees. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier. 1998. p. 361-363.
- PEÇANHA, M.P. *Parâmetros microbiológicos da água de Ribeirão Claro, SP*. Instituto de Biociência. Universidade Estadual Paulista, 130p, 1993. (Tese Mestrado-Microbiologia).
- PRADA, G.M.M. *Leveduras associadas às frutas de espécies nativas da estação ecológica da Jureia Itaim (Peruibe – SP)*. Rio Claro: Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, 1994. 134p. (Tese – Mestrado em Microbiologia).
- SABETE, J.; QUEROL, A.; GUILHAMON, S.M. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*,[s.l] v. 26, n°4 p. 452-455. Sept. 1998.
- SATO, HH; PASTORE, G.M; PARK, Y.K. Study of some characteristics of newly isolated Killer yeast. *Revista de Microbiologia* , São Paulo , v.4, n°24 p.71-72., June. 1993
- SILVA, C.A.B. *Produção de aguardente*. Viçosa: FUNBRAE, 1995. v. 4, 34p.

WALKER, G.M. Yeast physiology and biotechnology. England: Willy, 1998, 342p.

WICKERHAN, L.J. Taxonomy of yeasts. I-Technique of classification. Washington: D.C.U.S. Departament of Agriculture, 1951. (Technical Bulletin, 1029).

CAPÍTULO 3

ESTUDO FISIOLÓGICO DAS LEVEDURAS FERMENTATIVAS

RESUMO

MENDONÇA, Alexandre Tourino. **Estudo fisiológico das leveduras fermentativas**. Lavras: UFLA, 1999. 23p.(Dissertação – Mestrado em Ciências dos alimentos).*

O processo de fermentação de produtos animais e vegetais para obtenção de alimentos e bebidas tem sido empregado há vários séculos em muitos países. O consumo de bebidas obtidas da fermentação de substratos variados como: milho, cevada, melaço, arroz e cana-de-açúcar, aumenta a cada dia. No Brasil, a produção de aguardente de cana-de-açúcar está em torno de 1,2 bilhões de litros anuais, sendo 120 milhões de litros produzidos no Estado de Minas Gerais. A melhoria da qualidade e do rendimento desta bebida passa por um processo fermentativo onde as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* convertem açúcares do mosto a etanol. Dos 387 isolados de leveduras, 158 foram classificados como *Saccharomyces cerevisiae* pelo método tradicional de classificação bioquímica e fisiológica, e foram posteriormente confirmados pela técnica molecular de PCR- (*polimerase chain reaction*). Os isolados identificados como *Saccharomyces cerevisiae* foram testados quanto à produção de CO₂ em tubos de Durham. Deste teste, foram selecionadas 50 leveduras, que passaram por um “screening” para verificação e seleção da levedura melhor produtora de etanol. Um isolado de levedura sobressaiu dentre os demais em relação às características fermentativas desejadas (CA 116), e foi então testado em cinco bateladas sucessivas com meio de caldo de cana diluído para 10 e 14° Brix. Neste teste, a levedura, além de uma boa produção alcoólica apresentou a característica de floculação, que é importante para fermentação em bateladas.

* Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Eustáquio Souza Dias – UFLA.

ABSTRACT

MENDONÇA, Alexandre Tourino. **Physiological study of fermentative yeasts.** Lavras: UFLA, 1999. 23p. (Dissertation – Master Program in Ciência dos Alimentos).*

The fermentation process of animal and plant products for obtaining foods and beverages has been employed for several centuries in a great number of countries. Consumption of beverages obtained from the fermentation of different substrates such as: corn, barley molasses, rice, sugar cane increases each day. In Brazil, the production of sugar cane brandy ('aguardente') is around 1,2 billion liters yearly, 120 million liters being produced in Minas Gerais state. Improved quality and yield of this beverage undergo a fermentation process where *Saccharomyces cerevisiae* strains give the product improvement of quality. Out of 387 yeast isolated, 158 were identified as *Saccharomyces cerevisiae* by the traditional method of biochemical and physiological classification and were later confirmed with PCR-polymerase chain reaction. The isolates identified as *Saccharomyces cerevisiae* were tested for ethanol production in a shorter time period. From this test 50 yeasts were selected which went through a screening for both verifying and selecting the best ethanol producing yeast. A yeast isolate overcame the characteristics desired (CA 116) and was then tested in five successive batches with a broth medium diluted to 10 and 14 ° Brix , respectively. In this test the yeast in addition to a good alcoholic producer, it presented the flocculating characteristic, which is important to the beverage production per batch

* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA and Eustáquio Souza Dias – UFLA

3.1 INTRODUÇÃO

O etanol pode ser obtido por via fermentativa ou sintética. A via fermentativa é a mais importante para a produção de álcool etílico (Fronza, 1997). Vários grupos e gêneros de microrganismos produzem etanol. Algumas bactérias como, por exemplo, a *Zymomonas mobilis*, têm sido estudada, para aplicação na indústria alcooleira (Jin e Wang, 1981). Algumas leveduras como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* e *Pachysolen* também podem converter açúcar em etanol (Kurtzman e Fell, 1998). Entretanto, a *S. cerevisiae* é o principal agente microbiano de produção do etanol, devido a seu elevado potencial de conversão de mono, di e trissacarídeos em etanol (Walker, 1998). Uma característica que pode ser observada no metabolismo biossintético é que, ao invés de somente um carboidrato de reserva, como ocorre nos demais microrganismos, as leveduras possuem dois: o glicogênio e a trealose (Panek, 1991). Outra característica associada à *S. cerevisiae* é a capacidade de competição no meio fermentativo, uma vez que esta levedura produz a toxina "killer", capaz de eliminar naturalmente os microrganismos competidores por substrato (Kurtzman e Fell, 1998). Em estudos realizados por Jones et al. (1981), *Saccharomyces cerevisiae* é mais adaptada para a produção de etanol combustível do que a *Saccharomyces uvarum* (renomeada por Kurtzman e Fell, (1998) para *Saccharomyces bayanus*), por ser mais tolerante às condições adversas do ambiente industrial.

As bebidas alcoólicas possuem características próprias de aroma e sabor, conferidas pela presença de diversos constituintes do processo fermentativo (Silva, 1995). Além do etanol, muitos compostos orgânicos, como álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, entre outros, são formados durante a fermentação (Alves, 1994, Oliveira, 1993). Estes compostos estão presentes, embora de maneira diferenciada, em todos os processos que utilizam a

fermentação alcoólica. Do ponto de vista microbiológico, a diferenciação qualitativa e quantitativa destes produtos é devida principalmente à estirpe de levedura utilizada. A principal matéria prima utilizada no país para a produção de etanol é a cana-de-açúcar, por apresentar maior viabilidade econômica, ou seja, ser de fácil cultivo e apresentar os nutrientes exigidos pelas leveduras fermentativas (Silva,1995).

Vários fatores são responsáveis pela obtenção de altas concentrações de etanol em menor tempo de fermentação. Dentre eles, o potencial fermentativo do microrganismo é o mais importante, pois exerce influência sobre o rendimento e a produtividade de etanol (Maia et al 1993).

Em estudos realizados por Fronza (1997), foram testadas várias concentrações de etanol para uma mesma espécie de levedura e foi verificado que algumas leveduras da mesma espécie reagiram de maneira diferente a concentrações iguais de etanol, sugerindo que dentro de uma mesma espécie, podem haver linhagens mais ou menos resistentes ao acúmulo de etanol. Em outro estudo feito com leveduras isoladas da fermentação alcoólica para a produção de aguardente, Pataro (1998) comprovou que algumas leveduras da espécie *S. cerevisiae* são mais resistentes a concentrações de 10% de álcool.

O objetivo deste trabalho foi selecionar o isolado de levedura *S. cerevisiae* melhor adaptado para produção alcoólica, para ser aplicado nas fermentações alcoólicas para a produção de uma aguardente de qualidade.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo

Foram utilizados 158 isolados previamente identificados como *Saccharomyces cerevisiae*, por métodos tradicionais (bioquímicos e morfológicos) (Kurtzman e Fell, 1998) e molecular (PRC) (Thangavelu e Wheals* 1999).

3.2.2 “Screening” da capacidade fermentativa

A habilidade de fermentar das linhagens isoladas e identificadas de *Saccharomyces cerevisiae* foi verificada em tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos contendo meio basal (4,5% extrato de levedura 7,5% de peptona, e 0,5 mg de solução de azul de bromotimol). A este meio foi acrescentado o carboidrato em estudo (glicose, sacarose ou frutose), perfazendo a concentração final de 1%. A seleção foi realizada com relação à produção de gás nos tubos de Durham invertidos. A quantidade de gás produzida e a velocidade de produção indicaram o potencial fermentativo das linhagens.

O potencial fermentativo de cada linhagem foi registrado segundo técnica descrita por (Kurtzman e Fell, 1998), sendo os resultados avaliados da seguinte forma:

Positivo: tubo de Durham com 3/3 de gás em 12 horas de incubação.

Lento: tubo de Durham com 2/3 de gás em 24 horas de incubação.

Fraco: tubo de Durham 1/3 de gás em período superior a 24 horas de incubação.

Muito fraco: produção de pequenas bolhas de gás.

* comunicação pessoal

3.2.3 Fermentação

O teste de avaliação da capacidade de produção de etanol foi realizado em duas partes. A primeira fase realizou-se em frascos com meio MF (3,0% extrato de levedura, 3,0% extrato de malte, 5,0% peptona, 10,0% glicose), no qual a principal fonte de carbono foi a glicose (10 g/L), e a segunda foi realizada em fermentador de bancada de 2 litros, contendo caldo de cana diluído com aproximadamente 100 g/L de sacarose.

3.2.3.1 Fermentação em Erlenmeyers

Para este teste, foram selecionadas as 50 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentaram produção de gás carbônico em menor tempo (12 horas).

Foi utilizado o meio MF distribuído em Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio fermentativo. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121 °C e inoculados com culturas de 24 horas de crescimento.

A quantidade do inóculo foi padronizada para todos os isolados utilizando a medida de massa celular por espectrofotometria (ABS 600nm). As culturas foram incubadas a 28°C por 24 horas.

3.2.3.2 Fermentação em pequena escala (2 litros)

Para avaliação da levedura selecionada a partir do item 3.2.3.1, foi utilizado o sistema de bateladas sucessivas em fermentador da marca Inceltech LH. SGI, com capacidade de 2 litros. Para a fermentação em batelada, inicialmente o inóculo foi produzido a partir da incubação da levedura selecionada em meio MF (1400 ml) por 36 horas, ou seja, quando a levedura atingiu a fase estacionária. Esta avaliação foi realizada por meio de exame microscópio óptico (Ken A Vision, USA), avaliando a porcentagem de brotamentos em uma contagem de 300 a 500 células. Após este período, o meio

foi retirado assepticamente da cuba do fermentador por meio do sistema de esgotamento e a biomassa acrescida de caldo de cana diluído até a concentração de 10° Brix, iniciando-se a primeira batelada. Após 36 horas, o mosto foi retirado e a biomassa acrescida de caldo diluído até a concentração de 14° Brix. Este procedimento foi repetido nas demais bateladas, perfazendo um total de cinco bateladas.

3.2.4 Métodos Analíticos

Foram retiradas amostras em tempos pré-estabelecidos: 2, 8, 12, 24 e 36 horas após a incubação para a fermentação em erlenmeyers, e 12, 24 e 36 horas para a fermentação em pequena escala, onde foram avaliados viabilidade celular, etanol, glicose, peso seco e pH.

3.2.4.1 Viabilidade

A coloração com azul de metileno foi usada para se obter um rápido resultado da viabilidade da população de leveduras. Uma porção de 1,0ml da suspensão foi corada com um igual volume da solução de azul de metileno (0,01% azul de metileno, 2% citrato de sódio por volume) por cinco minutos. Preparações úmidas foram observadas em câmara hemacitométrica, e o número de células vivas e mortas foi microscopicamente estabelecido, em uma população de, no mínimo, 500 células (Schwan, 1999).*

* Comunicação pessoal.

3.2.4.2 Análises cromatográficas

Foram analisados glicose, frutose, trealose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizado um cromatógrafo (Shimadzu, Japão) equipado com detector ultravioleta e de índice de refração, coluna Shim-pak SCR-101H operada a 40°C. A fase móvel utilizada foi o ácido sulfúrico 0,25 N a um fluxo de 0,5ml/min. As concentrações foram determinadas por comparação com as curvas de calibrações para os compostos analisados

3.2.4.3 Peso seco

No final de 36 horas de fermentação, o mosto foi centrifugado a 3500 rpm por cinco minutos para a precipitação da biomassa, e secagem posterior em estufa a 64°C até peso constante (Amorim, 1996).

3.2.5 Trealose

A extração de trealose celular foi realizado de acordo com técnica descrita por Riévillion et al (1996). As amostras de mosto foram retiradas do fermentador com 36 horas de fermentação. As amostras foram centrifugadas em centrífuga Jouam MR 1812 a 17000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi coletado e suspenso em água destilada. A suspensão de células foi submetida a pulsos de 30 segundos em banho ultrassônico alternados com 10 segundos de repouso, perfazendo um tempo total de 30 minutos.

A determinação do teor de trealose foi realizada por análise cromatográfica, conforme descrito no item 3.2.4.2.

3.2.6 Amostragens

As amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas perfazendo um total de 36 horas. Nestas amostras, foram realizadas análises de pH, Brix e

viabilidade. Para as análises cromatográficas, foi retirado 1 ml do meio fermentante para determinação de glicose, frutose, sacarose, trealose e etanol.

3.2.7 Análise estatística

As variáveis produção de etanol e tempo de fermentação foram analisadas em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) no esquema de parcela subdividida no tempo por meio do software SISVAR^v 3.01* (Departamento de Ciências Exata –UFLA), utilizando-se o esquema de Análise de variância:

F.V	G.L
LEVEDURAS1	49
Erro 1	50
AVALIAÇÕES 2	2
LEVI*AVA 2 -	98
Erro 2	100
Total	299

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho, foi observado que os diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram produções diferenciadas de etanol no decorrer do experimento (Figura 1), embora se tenha usado o mesmo meio de cultivo para todas as leveduras e o inóculo tenha sido padronizado para todas. A diferença na produção de etanol foi devida à capacidade de transformação de açúcares em etanol, mais eficiente entre alguns isolados da mesma espécie. Basso et al (1996), trabalhando com diferentes isolados de *S. cerevisiae*, encontraram produções diferenciadas de etanol entre os isolados. Em outros estudos com termotolerância realizado por Peisino (1986), foi comprovado que leveduras da

* comunicação pessoal.

mesma espécie (*Saccharomyces cerevisiae*) apresentaram diferentes tolerâncias em vários graus de temperatura.

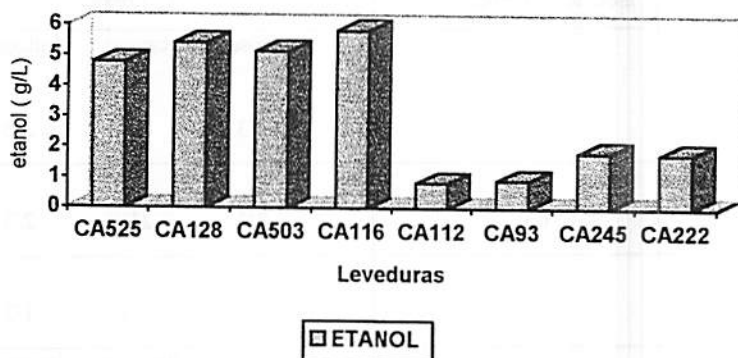


FIGURA 1. Produção máxima de etanol (g/L) por diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* após 12 horas de fermentação em meio contendo 10,0g de glicose.

3.3.1 “Screening” de fermentação

O teste fermentativo com três fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose) foi realizado para seleção prévia de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que produziram maior quantidade de CO_2 em menor tempo nos tubos de Duhram. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

Foram selecionados 50 isolados de *S. cerevisiae*, que produziram CO_2 e utilizaram os substratos (glicose, frutose e sacarose) em menor tempo de incubação (12 horas), de acordo com a técnica descrita por Kurtzman e Fell (1998) e Jouret (1995).

TABELA 1. Avaliação da capacidade fermentativa de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em três fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose) no meio basal.

Isolados de levedura	12 horas		
	glicose	sacarose	frutose
50	3/3	3/3	3/3
63	2/3	2/3	2/3
26	1/3	1/3	1/3
19	Pequenas bolhas de CO ₂	Pequenas bolhas de CO ₂	Pequenas bolhas de CO ₂

3.3.2 Fermentação em Erlenmeyers

A capacidade e velocidade das 50 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentar glicose foi investigada em meio líquido sintético contendo 10g/L do carboidrato. Na Figura 2, podem ser observados os dados obtidos para consumo de glicose e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

Foi observado um consumo de 6,48 g/L de glicose total presente no meio nas primeiras oito horas após o início do processo. Neste mesmo período, foi detectada uma produção baixa de etanol 1,66 g/L. Nestas primeiras oito horas, ocorreu uma intensa multiplicação celular devido à presença de oxigênio (condições aeróbicas de crescimento) e outros componentes do meio rico. Este aumento celular na primeira hora de fermentação foi devido às condições suficientes de aerobiose requeridas para o crescimento. Este resultado também foi encontrado por Basso e Amorim (1988a) em estudos com quantidades

diferentes de oxigênio no meio de cultivo, visando o aumento da biomassa fermentante. Com o decréscimo de oxigênio disponível no meio, as leveduras passaram a realizar o metabolismo anaeróbico, convertendo o açúcar presente em etanol e gás carbônico.

A viabilidade celular durante o período de fermentação (36 horas) não apresentou grandes variações nas linhagens testadas, ficando na faixa de 98% em média no início da fermentação (8 horas) e 90% em média no final. Resultados similares foram encontrados por Pataro (1998) na caracterização fisiológica de leveduras fermentantes de caldo de cana para a fabricação de aguardentes. Após 12 horas de fermentação, houve uma queda na concentração de glicose e mesmo assim a levedura manteve sua viabilidade. Segundo Fronza (1997) e Walker (1998), após o término da fonte de carbono (glicose), a levedura passa a utilizar o etanol para manter suas reservas de carboidratos.

A liberação de CO_2 da via glicolítica, durante o metabolismo respiratório das leveduras, proporcionou uma condição de indução própria à anaerobiose; indicando, portanto, que após esta primeira etapa de multiplicação celular, as *S. cerevisiae* entraram na fermentação propriamente dita, ou seja, conversão de glicose em etanol (Walker, 1998; Belin 1995). Como pode ser observado na Figura 2 a produção de etanol é inversamente proporcional ao consumo de glicose, conforme descrito por Kurtzman e Fell, (1998); Walker (1998); Basso et al (1996) e Belim (1995).

A produção máxima de etanol foi variada entre as linhagens testadas. O tempo máximo de produção foi observado com 12 horas após a inoculação (tabela 2). Foi também observado que em todas as 50 leveduras analisadas ocorreu um decréscimo de etanol após 24 horas de incubação (Figura 2). Esta perda de álcool pode ter sido devida, em parte, à evaporação ou à oxidação pelo metabolismo das leveduras no ciclo de Krebs. Lehninger (1990) e Reed et al (1973) relatam que após o término da fonte primária de carbono a levedura passa

a utilizar o etanol através da via do glioxilato para manutenção do seu metabolismo.

Os resultados de etanol produzido em função do tempo foram avaliados para todas as linhagens testadas pelo teste de médias Scott e Knnot (Ferreira, 1999). A Tabela 2 mostra os dados de etanol das 15 linhagens que apresentaram maiores concentrações de etanol, e mostra também que as diferenças entre elas não foram significativas a 5% de significância pelo teste de Scott e Knnot (Sisvar v 3.01). Os isolados de maior produção alcoólica são os seguintes: CA164, 506, 160, 271 e 116. Eles apresentaram uma produção média em torno de 5,32 g/L. A produção do isolado CA 116 foi melhor do que dos demais isolados, apresentando 0,45 g/L mais etanol do que os demais isolados.

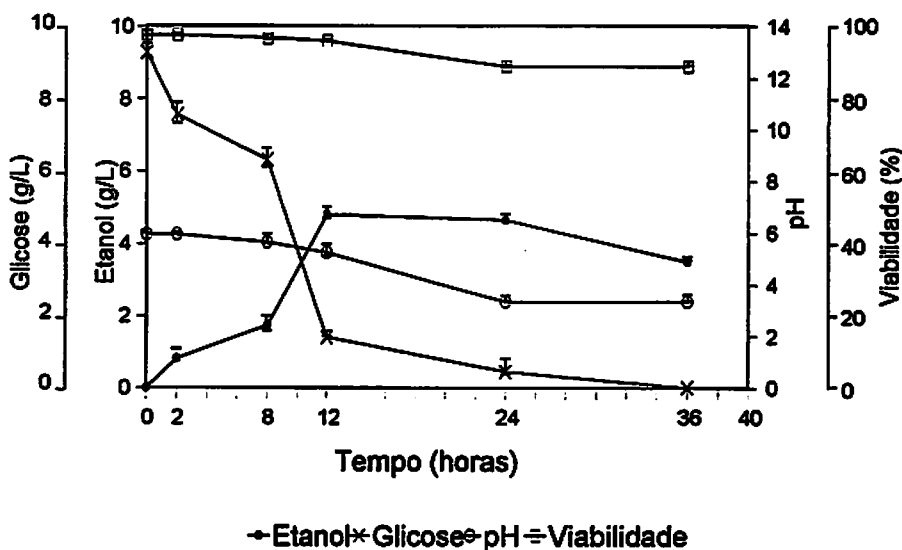


FIGURA 2. Consumo de glicose e produção de etanol durante a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. As barras indicam os desvios padrão.

O valor de pH do meio em fermentação decresceu de 6,0 até 3,0 com todos os isolados de *S. cerevisiae* testados. Este decréscimo foi provavelmente devido à produção de ácidos que é normalmente relatada em fermentações com meios naturais. Alves (1994), em estudos com fermentações com meio sintético, observou que a produção de ácidos orgânicos, como o acético e succínico, ocasionariam o abaixamento do pH do meio fermentante. Os valores baixos de pH entretanto não interferiram na fermentação. As leveduras são microrganismos acidófilos e valores de pH até 3,0 não afetam o metabolismo fermentativo das leveduras (Angelis, 1992).

TABELA 2. Concentração de etanol das melhores leveduras produtoras de etanol para o tempo de 12 e 24 horas de fermentação.

Levedura	Conc. de etanol após 12 horas g/L *	Conc. de etanol após 24 horas g/L *
76	4,8075	4,5936
108	5,7757	3,8233
116	5,8477	4,4029
123	4,0067	4,3830
128	4,9679	4,3483
143	4,6634	4,3560
160	5,1024	3,4151
164	5,3935	3,6340
208	4,93392	3,8500
271	5,1646	4,4003
486	4,7900	4,1829
503	5,0834	4,6946
506	5,1024	3,4151
509	4,9058	4,0168
525	4,8075	4,5478

*Os resultados não diferiram estatisticamente pelo teste de médias **Scout e Knnot (5% de significância).

**FERREIRA, D.F. Sistema de análise de variância .Software não publicado, 1999.

•Em negrito as melhores leveduras produtoras de etanol.

O rendimento obtido durante a fermentação foi calculado em relação à quantidade de etanol produzido por biomassa, açúcares redutores utilizados e tempo de fermentação (Tabela 3).

A alta produção de etanol pela CA 116 no período de 12 horas sugere que este isolado tem potencial considerável para ser utilizado em processo de fermentação alcoólica.

TABELA 3. Resultados de rendimento/produktividade de etanol após 12 horas de fermentação.

Levedura	Produtividade etanol/ biomassa	Produtividade de etanol /ART	Produtividade de etanol/tempo de fermentação
76	0.1077	0.4873	0.3980
108	0.0965	0.5059	0.4172
116	0.1862	0.5863	0.4873
123	0.1840	0.5009	0.4140
128	0.1155	0.5515	0.4544
143	0.1005	0.4696	0.3886
160	0.115	0.5125	0.4241
164	0.1244	0.5473	0.4495
208	0.1660	0.4647	0.4116
271	0.1727	0.5205	0.4304
486	0.1555	0.4827	0.3992
503	0.1700	0.5101	0.4236
506	0.1059	0.5116	0.4241
509	0.1301	0.4923	0.4088
525	0.1624	0.4807	0.4006

*ART= açúcares redutores totais

Na Tabela 4, pode ser observado, a produtividade alcoólica das leveduras selecionadas no período de 24 horas de fermentação. Pode ser notado que os índices de produtividade sofreram um decréscimo quando comparados aos resultados da Tabela 3. Este decréscimo da produção de etanol pode ser em

TABELA 4. Resultados de rendimento/produzividade de etanol após 24 horas de fermentação.

Levedura	Produzividade etanol/ biomassa	Produzividade de etanol /ART*	Produzividade de etanol/tempo de fermentação
76	0.1036	0.4687	0.1914
108	0.1473	0.3863	0.1593
116	0.1542	0.4856	0.2018
123	0.1623	0.4420	0.1826
128	0.0928	0.4431	0.1825
143	0.0939	0.4387	0.1815
160	0.0758	0.3486	0.1442
164	0.1003	0.4413	0.1812
208	0.1295	0.3857	0.1605
271	0.1472	0.4434	0.1833
486	0.1358	0.4215	0.1743
503	0.1570	0.4708	0.1956
506	0.0711	0.3433	0.1423
509	0.1064	0.4031	0.1674
525	0.1536	0.4578	0.1908

*ART= açúcares redutores totais

função da sua evaporação, da diminuição da viabilidade celular ou do consumo do etanol pela levedura, como descrito por Reed (1973).

Quando a concentração de glicose apresentou-se a 1,08 g/L, a levedura iniciou o uso de etanol como fonte de carboidrato, o que explica a queda na concentração deste metabólito. Fronza (1997) encontrou resultados similares ao comparar leveduras crescendo em diferentes concentrações de etanol. Quando a concentração de glicose era baixa a levedura consumia o etanol como fonte de carbono.

O teste efetuado para estudo da produção de etanol com quinze leveduras selecionadas mostra diferenças no rendimento do processo. Os resultados destes rendimentos são mostrados na Tabela 5.

TABELA 5. Rendimento em porcentagem de etanol produzido pelo etanol esperado.

LEVEDURA	RENDIMENTO (%)	
	12 HORAS	24HORAS
108	77.38	59.09
116	90.38	74.85
123	76.78	67.74
128	83.88	67.71
143	72.08	67.33
160	76.34	53.49
164	83.36	67.20
208	71.87	59.60
271	79.82	68.01
486	74.03	64.65
503	78.57	72.56
506	78.65	52.78
509	75.82	62.08
525	74.30	70.76
76	73.82	71.00

*Rendimento teórico: 1g de ART produz 0,511g de etanol.

Também nesta análise, o maior rendimento foi apresentado pela levedura CA 116, que se encaixa nos padrões de rendimento proposto para a agroindústria de aguardente, onde menciona-se que uma levedura que tenha melhor produção de álcool em menor tempo beneficiará os produtores, aumentando assim seus rendimentos (Silva, 1995; Cleto, 1997). Pode-se sugerir que esta levedura possui uma maior eficiência na utilização e conversão de glicose em etanol, como observado por Walker (1998) quando este cita que a maior eficiência em metabolizar glicose pode estar ligada a uma maior capacidade enzimática da via glicolítica. Esta alta eficiência pode beneficiar os produtores, pois uma levedura que possui uma produção etanólica maior pode aumentar o rendimento durante a safra, permitindo um maior lucro ao produtor. (Silva, 1995; Novais, 1997).

3.3.3 Fermentação em bateladas sucessivas

O processo de fermentação alcoólica em meio natural foi realizado em 5 bateladas sucessivas de 36 horas cada, utilizando caldo de cana diluído para 10° Brix (primeira batelada) e 14° Brix (as quatro bateladas seguintes).

O crescimento da biomassa foi obtido em meio MF durante 36 horas iniciais do processo, quando as células entraram então em fase estacionária de crescimento. Após estas 36 horas, o meio foi substituído por caldo de cana diluído para 10° Brix . Na tabela 6, podem ser observados os resultados de etanol, biomassa e trealose das cinco bateladas sucessivas após 36 horas de fermentação.

TABELA 6. Resultado de trealose, etanol e biomassa de cinco bateladas sucessivas após trinta e seis horas de fermentação.

Batelada	Etanol g/L	Trealose g/L	Biomassa g/100 mL
1	56,99	0,985	4,0
2	63,56	0,276	4,4
3	58,80	0,243	6,8
4	71,54	0,320	3,7
5	17,38	0,235	4,6

Na quinta batelada ocorreu um decréscimo na taxa de etanol. Possivelmente, há um abaixamento da viabilidade celular devido ao estresse causado pelo acúmulo de etanol. Basso et al (1988) obtiveram, índices similares quando utilizaram seis bateladas sucessivas com uma mesma levedura. Com esta diminuição, o rendimento da quinta batelada sofreu um decréscimo. Nobrega (1994) cita em seu trabalho, que uma queda no rendimento poderá levar o produtor a ter prejuízos. A Tabela 7 mostra a produtividade e rendimento da levedura CA116 em relação à produção de biomassa e ao consumo de ART e a

quantidade de etanol por hora de fermentação, em 5 bateladas sucessivas. Ocorreu uma diminuição considerável em relação à produção de etanol/ biomassa e etanol /ART na última batelada (Tabela 7).

TABELA 7. Produtividade e rendimento da levedura CA 116 em cinco bateladas após trinta e seis horas de fermentação.

	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3	Batelada 4	Batelada 5
Etanol/biomassa	14	14	8,6	19,33	3,78
Etanol/ART	2,85	3,18	2,94	3,58	0,86
Etanol/tempo	1,58	1,17	1,63	1,98	0,48
Rendimento%	79	83	85	90	49

*rendimento teórico = 1g de ART produz 0.51g de etanol.

*ART = açúcares redutores totais

Outra característica que pode ter influenciado a queda do rendimento na última batelada foi a diminuição do conteúdo de trealose celular já que este carboidrato de reserva serve como proteção ao estresse causado pelo acúmulo de álcool. Mansure et al (1997) e Basso e Amorin (1988b) obtiveram resultados semelhantes quando estudaram o estresse causado pelo etanol em leveduras de fermentação alcoólica.

Uma característica observada durante as bateladas foi a floculação da levedura em estudo. Esta característica é desejável em fermentações em batelada para evitar a perda da biomassa e eliminar a etapa de centrifugação. Quando a levedura apresenta tal característica, ela, no final do período fermentante, decanta-se no fundo da dorna, evitando assim a perda de biomassa durante a sangria da dorna de fermentação.

3.4 CONCLUSÕES

- i) A produção de etanol foi significativamente diferente para as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas. De um total de 158 isolados, cinquenta foram selecionadas pelo testes de Durham (teste fermentativo) apresentando índice fermentativo superior às demais.
- ii) Quinze dentre as cinquenta *S. cerevisiae* produziram maior quantidade de etanol, que foi significativamente igual a 5% de probabilidade. A produção média foi de 5,06 g/L em 12 horas de fermentação
- iii) A levedura CA 116 foi selecionada por ter apresentado a mais alta produtividade e rendimento alcoólico.
- iv) A CA116 apresentou a importante característica de floculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELIS, D.F.A. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam A fermentação etanólica. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. *Aguardentes de cana: Produção e qualidade*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 49-65.
- AMORIM, H.V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar. *Fermentec: ESALQ USP*, 1996, v. 3. 103p. Apostila.
- BASSO, L.C. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. *Processo de produção de álcool*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996, p.50-80.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Efeito do arejamento sobre a fermentação. *Relatório Fermentec*. Piracicaba: ESALQ/USP p.26-46, out. 1988a.
- BASSO, L.C; AMORIM, H.V. Mobilização e armazenamento de carboidratos de reserva durante a fermentação alcoólica. *Relatório Anual de Pesquisa de Fermentação Alcoólica*. Piracicaba, nº8, p. 44-47, jun 1988b.

- BELIN, J.M. Las leveduras. In: BOURGEOIS, C.M.; LARPENT, J.M. **Microbiologia Alimentaria, Fermentações alimentarias.** Zaragoza: ed. Acriba, cap.2, p.19-30, 1995.
- CLETO, F.V.G. **Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da Aguardente de cana.** Jaboticabal: UNESP, 1997. 109p. (Tese Mestrado-Microbiologia).
- FRONZA, D. **Efeito do etanol, sacarose e pH sobre levedura etanologênica isolada de mosto para a produção de aguardente.** Viçosa, 1997 53p. (Tese Mestrado-Microbiologia)
- JIN, C.K.; WANG, S.S. Continuous production of ethanol in a two stage fermentation of *Zymomonas mobilis* using soy flour as a protective agent. **Enzyme Microbiology Technology**, [s.l], n. 4, p. 256-264, June. 1981.
- JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. Specific and non specific inhibitory effects of ethanol on yeast growth. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l], v. 4, n. 6, p. 334-338, Mar. 1987.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation leg yeast: The effect of enviromental and other variable. **Process Biochemistry**, London, v. 16,n°8, p. 42-49. Mar. 1981.
- JOURET, C. Las bebidas destiladas. In: **Microbiologia Alimentaria**, BOURGEOIS, C.M.; LARPENT, J.P. Zaragoza: Acriba, 1995. v. 2. Cap. 5. p. 125-134.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, A taxonomic study.** Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055p.
- LEHNINGER, A.C. **Princípios de Bioquímica**, ed. Sarvier, São Paulo, 1990 725p
- MAIA, A.B.R.A.; PEREIRA, A. J. G.; SCHAWABE, W. **Tecnologia para produção de aguardente de qualidade.** Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1993. 65p.
- MANSURE, J.J.; SOUZA, R.C.; PANEK, A.D. Trealose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnonology Letters**, [s.l], n°12, v.19, p.1201-1205, Dec. 1997

- NOBREGA, I.C.C.** Características de qualidade de Aguardente de cana comerciais e comparação entre dois processos de fermentação. Viçosa, UFV, 1994. 67p. (Tese mestrado-Microbiologia).
- NOVAIS, F.V.** Em nome da qualidade da aguardente de cana. Engarrafador. Moderno. Piracicaba, 4 jan. 1997, p.68-73.
- OLIVEIRA, E.S.** Fermentação alcoólica: produção industrial de etanol. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia/UFMG, 1993. 24p. (Apostila do Departamento de Alimentos).
- PANEK, A.D** Storage carbohydrates. In: ROSE, A.H. e HARRISON, J.S. The yeasts. 2 ed. Academic Press, London, vol. 4, cap. 13, p. 655-78. 1991.
- PATARO, C; SANTOS, A; CORREA, S.R; MORAIS, B.B; LINARDI, V.R; ROSA, A.C.** Physiological characterization of yeast isolated from artisanal fermentation in na aguardente distillery. Revista de microbiologia, São Paulo, v.29 p104-108, June, 1998.
- PEISINO, G.** Avaliação de leveduras industriais em diferentes condições de fermentação alcoólica. Escola Superior de Agricultura "Luis Queiroz", Piracicaba, São Paulo, 1986. 75p (Dissertação- Microbiologia).
- RIÉVILLION, J.P.P.; PIBERNAT, C.C.; GIULIANI, F.J.; et. al.** Utilização de extratos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinhos espumantes. SBCTA: São Paulo, v16, nº3, p196-205, out. 1996.
- WALKER, G.M.** Yeast physiology and biotechnology. England: Willy 1998, 342p.