

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,  
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COM BIOTIPO *KILLER* ISOLADAS DE CACHAÇARIAS DA BAHIA**  
**Ana Carolina B. Gonçalves<sup>1</sup>; Aristóteles Góes Neto<sup>2</sup>; Alessandra Schnadelbach<sup>3</sup>, Ana Paula Trovatti Uetanabaro<sup>4</sup>**

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: [ana.carolinabio@hotmail.com](mailto:ana.carolinabio@hotmail.com)
2. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: [arigoesneto@yahoo.com.br](mailto:arigoesneto@yahoo.com.br)
3. Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e-mail: [alessandra.schnadelbach@gmail.com](mailto:alessandra.schnadelbach@gmail.com)
4. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), e-mail: [anapaula.uetanabaro@pq.cnpq.br](mailto:anapaula.uetanabaro@pq.cnpq.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** Cachaça artesanal, diferenciação infra-específica, biótipo killer..

## **INTRODUÇÃO**

No Brasil, o caldo-de-cana é utilizado para produzir uma bebida destilada popular, denominada cachaça. Obtida a partir do mosto fermentado de cana-de-açúcar, a sua composição é complexa, composta principalmente de água e álcool etílico em proporções variáveis. (LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSSON, 1983). Considerando que a maioria dos compostos responsáveis pelo sabor é formada durante a fermentação, as leveduras e as condições de fermentação são apontadas como os fatores que mais influenciam as características organolépticas da cachaça (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979)

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

Muitas pesquisas têm sido realizadas na cadeia produtiva da cachaça e a utilização de leveduras selecionadas ou culturas starter para a fermentação é uma delas. Leveduras selecionadas possuem o fenótipo *killer*; (MARQUINA et al., 2002) são capazes de produzir micotoxinas letais às células sensíveis de mesma espécie ou gênero e mais raramente de gêneros diferentes, sendo imunes a mesma (MAGLIANI et al., 1997). A manifestação deste fenótipo pode proporcionar vantagem competitiva às leveduras fermentadoras, através da inibição do crescimento de linhagens sensíveis indesejáveis minimizando a contaminação externa, além de assegurar a permanência da linhagem selecionada durante todo processo. Estas vantagens tendem a contribuir para a manutenção de padrões de qualidade bem definidos a cada produção (MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002).

As características fenotípicas, utilizadas na sistemática de leveduras, têm sido combinadas com o emprego de técnicas moleculares, que possibilitam o acompanhamento da dinâmica de populações dos micro-organismos durante o ciclo fermentativo. Desta forma, é possível verificar a influência de parâmetros como nutrientes, temperatura e aeração das dornas no surgimento ou desaparecimento de espécies e/ou linhagens e correlacionar estes fatores com a qualidade da cachaça produzida (GUERRA et al., 2001; PATARO et al., 2000)

## **METODOLOGIA**

A coleta, isolamento, identificação bioquímica e estudo da característica *killer* das leveduras utilizadas no presente estudo foram realizados durante os projetos de Mestrado de Alice Ferreira da Silva, Cleber Miranda Gonçalves e Bruno Motta Oliveira, e de Doutorado (em curso) de Carla Santos Ribeiro Pinheiro, alunos do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC – UEFS/FIOCRUZ), Feira de Santana/BA. Foram analisadas 41

amostras de quatro destilarias: DEST1 (Ibirataia/BA) 26 amostras, DEST2 (Ilhéus/BA) 5 amostras, DEST3 (Caculé/BA) 9 amostras e DEST4 (Condeúba/BA) 1 amostra.

Os DNAs totais das linhagens foram extraídos a partir de modificação do protocolo de Doyle e Doyle (1987). Os isolados cresceram em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%, cloranfenicol 0,01%) e após 48h, as células foram transferidas para criotubos (capacidade de 2 mL) contendo 1,5 mL de YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) e incubadas por 18h, a 27°C e 180 rpm. Centrifugou-se as células a 13.000 rpm por 10 min., descartou-se o sobrenadante, adicionou-se água ultra-pura estéril, procedeu-se a homogeneização da suspensão e uma nova centrifugação. Em seguida, adicionou-se 650 µL de CTAB e os criotubos foram colocados em banho-maria a 65°C por 1h. Adicionou-se 650 µL da solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), em seguida, os tubos foram colocados na placa agitadora por 10 min, e centrifugados a 13.000 rpm por 10 min. Aspirou-se o sobrenadante, transferindo-os para tubos estéreis de 1,5 mL. Adicionou-se isopropanol gelado em igual volume e os tubos foram estocados a -80°C por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min, e após descartado o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol 70% e procedeu-se a homogeneização, em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 13.000 rpm por 10 min, sendo esta etapa repetida por mais duas vezes, seguida pela lavagem com etanol 70%. Por fim, após a secagem do material, adicionou-se 55 µL de água ultrapura estéril. O DNA foi ressuscitado e, em seguida, armazenados a -20°C.

A amplificação das regiões internas de seqüências simples repetidas (ISSR) seguiu modificação do protocolo de SILVA-FLHO (2003), foi realizada em uma mistura de 11 µL de água destilada, 2,0 µL de tampão PCR, 0,3 µL de BSA (soro albumina bovina), 3,2 µL de mistura de dNTP, 0,6 µL do iniciador GTG5 - (5'- GTG GTGGTGGTGGTG-3'), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µL de *Taq* polimerase e 1 µL de DNA. A amplificação foi realizada a partir de um ciclo de desnaturação de quatro minutos a 94°C seguido de 37 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 47°C por 120 segundos, extensão a 72°C por 120 segundos e extensão final a 72°C por sete minutos. Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%; tampão SB 1X, brometo de etídeo, visualizados em transluminador UV e fotografados.

O DNA mitocondrial foi purificado conforme modificação do protocolo de Querol e colaboradores (1992). As células foram crescidas em 5mL de meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1% glicose) por 18 horas e 150 rpm a 25°C. Após isto o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o meio de cultivo e lavou-se o material com 5mL de água ultrapura estéril, colocando-os no agitador de tubos, seguido de centrifugação a 3000 rpm por 15 min. e descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 500 µL de uma solução de enzima lítica de *Rhizoctoniasolani* (25 mg/mL em 1M sorbitol, 0,1 M EDTA, pH 7,5). As amostras foram colocadas em banho-maria a 45°C por 2 horas. O material foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante na sequencia. Resuspendeu-se o sedimento em 500 µL de Tris-HCl 1M e EDTA 0,5 mM, pH 7,4; e foram adicionados 13 µL de SDS 10%, incubados a 65°C por 5 minutos e em seguida os criotubos foram mantidos em gelo. Adicionou-se 200 µL de acetato de potássio 5M homogeneizando as amostras e mantendo-as no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um tubo previamente identificado já contendo 700 µL de isopropanol, e mantendo-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi realizada a 12000 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante, o DNA foi novamente lavado com 500 µL de etanol 70%, e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, e descartou-se o sobrenadante. O DNA foi secado a

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFES, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

37 °C e o pellet ressuspendido em 20 µL de água ultrapura estéril. Procedeu-se a digestão do DNA mitocondrial com um mix para cada amostra contendo 1 µL de enzima de restrição *Hinf* I, 2 µL de tampão da mesma enzima, 1 µL de RNase, 6 µL de água ultrapura estéril e 10 µL do DNA à mistura. A incubação foi realizada por 6 horas a 37 °C. Os fragmentos de restrição foram visualizados em gel de agarose (1,5%), tampão TBE 0,5X, brometo de etídeo e visualização no transluminador UV.

Foi criada uma matriz de dados para cada marcador (ISSR e RFLP) onde se atribuiu os números cardinais 1, para a presença, e 0 para ausência de bandas (*loci*). *Loci* duvidosos ou de fraca intensidade foram desconsiderados da análise. A matriz foi então submetida à análise para mensuração dos números de *loci* (N), número de *loci* exclusivos (NLE) e proporção de *loci* polimórficos (P) utilizando o método de Lynch e Milligan (1994), para dados que assumissem o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o programa GenAlex versão 6.1 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). As análises de distância e identidade genética de Nei, calculadas através da distância não enviesada (Nei, 1978) e a Análise Molecular de Variância – AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992), também foram realizadas no programa GenAlex versão 6.1. Nestas análises, a destilaria4 foi excluída devido ao seu baixo número amostral. A análise de agrupamento das quatro destilarias foi realizada a partir do índice de similaridade de Jaccard e algoritmo UPGMA através do programa Past versão 1.37 (HAMMER et al., 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 41 amostras analisadas pela técnica de ISSR (*Inter Sample Sequence Repeat*), foram agrupadas em 11 distintos perfis moleculares. Dentre as 26 amostras da DEST1, foram observados 3 distintos perfis (“a” – “c”). Na DEST2, as 5 amostras apresentaram 4 distintos padrões moleculares (“d” – “g”). As 9 amostras da DEST3 foram agrupadas em 3 perfis moleculares (“h”-“j”). A DEST4 foi considerada apenas nas análises de riqueza e para tanto observou-se o perfil “k”.

Na metodologia de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), as 24 amostras mantidas foram separadas em 7 diferentes perfis moleculares (A – G). Entre as 13 amostras da DEST1, foram observados 2 distintos perfis (“A” e “B”). A DEST2, com 5 amostras, acusou 1 único padrão de bandas; o “C”. As 5 amostras da DEST3 foram agrupadas nos perfis “D”, “E” e “F”. Para a DEST4, com uma amostra, o perfil observado foi chamado de “G”.

Os agrupamentos em perfis moleculares, para ambas as metodologias usadas no estudo mostraram que há diversidade, exclusividade dos padrões em cada um dos alambiques e sucessão das linhagens de leveduras com biótipo “*killer*” ao longo da fermentação artesanal de três destilarias do estado da Bahia. Segundo Guerra et al. (2001) é possível que a diversidade molecular encontrada em linhagens de *S. cerevisiae* se deva a características seletivas únicas do processo fermentativo da cachaça como ciclo fermentativo curto (em torno de 24-36h), elevadas temperaturas ambientais, elevada concentração alcoólica ao final do processo e ciclos fermentativos diários que duram de quatro a seis meses.

Entre os perfis moleculares identificados, em ambas as técnicas, para três das quatro destilarias (DEST1, DEST2 e DEST3), um perfil predominante com elevada frequência foi observado, indicando que estas linhagens possam estar mais aptas às condições encontradas no sistema fermentativo. Sendo as altas concentrações de açúcar e álcool as características usualmente encontradas nas destilarias (GUERRA, 2001), estas cepas, submetidas à tais pressões seletivas, podem ser as mais osmotolerantes, possíveis boas iniciadoras do processo e as mais resistentes ao efeito deletério do álcool. Estes resultados concordam com outros já descritos na literatura (SILVA-FILHO, 2005; SILVA, 2009).

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFES, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Nas análises de variabilidade, o número de *loci* exclusivos encontrados para as técnicas de RFLP e ISSR foram maiores nas DEST3 (7 *loci*) e DEST2 (6 *loci*), respectivamente. Isto pode ser explicado devido a variações das condições abióticas do mosto como temperatura, concentração de açúcares na fase inicial e principalmente pela concentração de etanol ao final do processo a qual, provoca efeito mutagênico no DNA (BOULTO; QUAIN, 2001). Além disso, a presença de alelos exclusivos nestas destilarias é um indicativo de fluxo gênico restrito, que pode levar a um aumento na divergência genética entre populações (SILVA, 2009).

A análise de AMOVA revelou maior variação entre as populações do que dentro delas nos dois procedimentos, com valores em porcentagem de 93% (para o RFLP) e 82% (para o ISSR), o que demonstra uma elevada estruturação genética dentro das destilarias.

Comparando as duas metodologias quanto às similaridades entre os indivíduos dentro das populações, o RFLP teve a DEST1 como sendo a mais divergente, formando um grupo à parte com alta similaridade genética. A técnica de ISSR, por sua vez, teve a DEST2 com maior divergência. Sobre a DEST4, porém, não podemos fazer muitas inferências visto o seu número amostral constar de apenas um indivíduo, no entanto, tanto no RFLP quanto no ISSR, tendeu a agrupar-se próximo à DEST1 e DEST3. Apesar destas diferenças, o método hierárquico de agrupamento, para ambos os marcadores, mostraram que as quatro destilarias, mesmo a que apresenta um único indivíduo, são geneticamente distintas entre si. Querol e Ramón (1996) explicam que a variação genética entre populações é determinada pela ação de forças evolutivas como fluxo gênico, seleção natural, divergência mutacional, mudanças no tamanho das populações e subdivisão da população.

A utilização de culturas puras de *S. cerevisiae* isoladas de suas próprias regiões de crescimento é hoje uma prática generalizada no mundo (VAUDANO & GARCIA-MORUNO, 2008). Como acontece para vinhos, conforme citado por Vaudano e Garcia-Moruno (2008), acreditamos que levantamentos na biodiversidade de leveduras e sua relação com fatores ecológicos bem como práticas na produção de cachaça artesanal podem contribuir para a seleção de linhagens de *S. cerevisiae* melhor adaptadas às características particulares das diferentes regiões do Brasil.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas técnicas utilizadas para a diferenciação infra-específica das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com biótipo *killer* isoladas de 4 destilarias do semi-árido baiano foram capazes de detectar o alto grau de polimorfismo encontrado no mosto durante o ciclo fermentativo.

## REFERÊNCIAS

- BOULTON, C.; QUAIN, D. 2001. *Brewing Yeast and Fermentation*. IedBlackwell Science.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, V. 131, p. 479-491.
- GUERRA, J.B., R.A.C ARAÚJO., C. PATARO., G.R. FRANCO., E.S.A MOREIRA. L.C. MENDONÇA-HAGLER & C.A. ROSA. 2001. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*. 33, 106-111
- LOPES, C.A.; LAVALLE, T.L.; QUEROL, A.; CABALLERO, A.C. 2006. Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.89, p.147-156.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,  
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.;BERTOLOTTI, D. POLONELLI, L. 1997.  
Yeast killer system. *Clinical Microbiology Review.*, v.10, p.369–400.