

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE CEPAS  
DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DA  
CACHAÇA DE ALAMBIQUE**

**AUTORA: MARISTELA DE ARAÚJO VICENTE**

**ORIENTADOR: PROF. Dr. ROGELIO LOPES BRANDÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

**OURO PRETO**

**2007**

**V633c**      **Vicente, Maristela de Araújo.**

Caracterização molecular e bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação de cachaça de alambique [manuscrito] / Maristela de Araújo Vicente. - 2007.  
xvi, 124 f.: il., color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia molecular.

1. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses. 2. Cachaça - Teses. 3. Bebidas fermentadas - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 663.51

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

Trabalho desenvolvido no laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob a orientação do Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, com auxílio financeiro da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

“O primeiro passo na busca da  
felicidade é o aprendizado”  
**Sua Santidade, o Dalai Lama**

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Vital e Maria, e meus irmãos Claudio, Vania,  
Silvana (In memorian), Patrícia e André, e  
sobrinhos, Claudio Junio, Carla Cristina,  
Marcelo e Vitor.*

*HOMENAGEM*

*Minas não é palavra montanhosa.  
É palavra abissal. Minas é dentro  
e fundo.*

*As montanhas escondem o que é Minas.  
No alto mais celeste, subterrânea,  
é galeria vertical varando o ferro  
para chegar ninguém sabe onde.*

*Ninguém sabe Minas. A pedra  
o buriti  
a carranca  
o nevoeiro  
o raio  
selam a verdade primeira, sepultada  
sem eras geológicas de sonho.*

*Só mineiros sabem. E não dizem  
nem a si mesmos o irrevelável segredo  
chamado Minas*

*“A Palavra Minas”  
Carlos Drummond de Andrade*

*À Ouro Preto por sua beleza e mistérios que nos convidam a aprender sobre nós  
mesmos. Ouro Preto é para poucos. Para olhares atentos, existe sempre algo de novo a  
descobrir em suas ladeiras e fascinantes casas mineiras.*

*Agradecimentos*

Agradeço a Deus pela presença constante em minha vida, pelo amor incondicional, e oportunidade de aprender a cada novo dia.

A Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP por minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Dr Rogelio Brandão, pelo exemplo de pesquisador, por seu rigor científico, persistência e por esta oportunidade.

Ao Dr Mauricio Coutrim, não somente pela dedicação e estímulo, mas pela amizade e apoio que muito contribuíram para minha formação; pelo exemplo de caráter e profissionalismo que tanto admiro e respeito.

Ao Dr Luciano Fietto por toda ajuda, apoio e incentivo.

Ao Dr Ieso de Castro pelo apoio e pelos ensinamentos diários.

Ao Dr Jacques R. Nicoli pelo apoio, incentivo e sábias palavras.

A Dra Juliana Fietto pelas longas harmoniosas e educativas horas de trabalho, pela palavra sempre sincera, equilibrada e indispensável em todos os momentos; e pela amizade e apoio.

Ao Dr Marcelo e Dra Lucinha Pedrosa pelo apoio e amizade, deliciosos momentos de aprendizagem, pelo exemplo de família, profissionalismo e caráter. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Aos amigos Geisa, Rogério, Claudia Dias, Cristina, Renata, Fernanda, Totola, Juliana Boechat, Gil, Kátia, Val, Jaila, Anamaria e Lisvane, pelo exemplo de garra, determinação, humildade, amizade sincera e valiosa, pelo apoio em todos os momentos desta caminhada.

A minha querida e estimada amiga Nilza e família, uma verdadeira companheira de longas jornadas, “nas alegrias e nas tristezas”, me ensinando a ser uma pessoa melhor. Obrigada por todos os maravilhosos encontros e despedidas que tivemos nos últimos tempos.

A minha querida amiga Cida pelo apoio incondicional, palavra amiga, sensibilidade de estar presente nos momentos mais importantes, amizade e sorriso que fizeram minha estadia no NUPEB uma alegria.

A todos os amigos do laboratório LBCM pela harmoniosa convivência, aprendizado diário, amizade, apoio e carinho; a todos minha admiração e respeito.

Aos professores do NUPEB, Luis Carlos, Milton, Renata Guerra, Marta, Teresinha, Elísio, Deo, Claudia, Babá, Simone, Alexandre e George, por todo apoio e atenção, carinho, amizade, exemplo, palavra amiga e sincera que muito contribuíram para minha formação.

Aos técnicos e funcionários da UFOP que muito contribuíram direta e indiretamente para este trabalho. Aos ouropretanos pela generosa acolhida.

A Universidade Federal do Espírito Santo – UFES pela oportunidade e apoio para a realização desse trabalho. Aos técnicos e funcionários da UFES que muito contribuíram direta e indiretamente para este trabalho.

Ao Dr Carlos Redins, Dr Eustáquio Vinicius R. Castro e Dra Edna Medeiros pelo apoio, exemplo, incentivo e oportunidade.

Ao Msc. Julio César Magalhães Dias pelo incentivo, oportunidade e importantíssimo apoio.

### **Agradecimento especial**

A Vania Vicente por todo carinho, apoio, gestos de solidariedade, exemplo, amizade e incentivo, fundamentais para que esta obra fosse realizada.

A Pedro Fortes por todo incentivo, indispensável apoio e amizade e por acreditar que esse sonho pudesse ser realizado.

A Sra. Edwiges, Fatinha, Zezé e família, pela acolhida sempre fraterna, pelas longas horas de apoio desde o início desta caminhada “nas alegrias e nas tristezas”; pelo incentivo, amizade e aprendizado. “Amigos não vão embora, se ausentam!”

## Resumo

Com o objetivo de caracterizar molecularmente a cepa *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 427, selecionada a partir de dornas de fermentação de cachaça, utilizaram-se várias metodologias de análise de polimorfismo de DNA para permitir a discriminação entre esta e as cepas presentes no local de origem. Os resultados demonstraram que RAPD-PCR, mtDNA, e PCR utilizando *primers* complementares a região do gene COXI não foram suficientes para uma boa diferenciação entre a cepa LBCM 427 e cepas isoladas na mesma dorna de fermentação. Por outro lado, o uso da cariotipagem para diferenciação com base no perfil cromossomal permitiu uma nítida distinção entre o grupo de cepas analisadas. Estes resultados demonstram que o uso de cepas iniciadoras requer um acompanhamento com o uso combinado de métodos bioquímicos e moleculares. A cepa parenteral LBCM 427, foi segregada e as tétrades analisadas quanto a estabilidade fisiológica e bioquímica em passagens sucessivas. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: floculação, não produção de H<sub>2</sub>S, resistência a 5,5',5''-trifluoro-DL-leucina (TFL) e cerulenina, crescimento em diferentes condições de pressão osmótica e de temperatura. Os resultados demonstraram que nenhuma cepa segregante reuniu todas as características da cepa parental. Diante disto, foi selecionada uma cepa segregante que atendia ao critério de resistência a TFL e cerulenina para analisar o comportamento em uma fermentação em caldo de cana e possíveis mutações no gene LEU4 que transcreve para a  $\alpha$ -isopropilmalato sintase. Esta segregante não foi afetada na presença de altas concentrações de L-leucina (20 mM) e, apresentou mutações no gene LEU4 ainda não descritas pela literatura. A cepa LBCM 427 e segregante foram avaliadas quanto à produção de cachaça em escala piloto. Os parâmetros analisados foram: o perfil químico da bebida produzida e a adaptação das cepas em condições similares às encontradas na fabricação artesanal da cachaça. Por cromatografia gasosa, quantificaram-se os compostos voláteis sendo estes o acetaldeído, acetato de etila, metanol, n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, e furfural. Verificou-se que as cepas LBCM 427 e segregante produzem elevados teores de álcool isoamílico e álcool isobutílico quando comparadas a uma cepa *Saccharomyces cerevisiae* comercial utilizada como controle. Outra cepa utilizada como controle do processo, a cepa nativa LBCM 422, sensível a ambos compostos, produziu quantidades semelhantes de álcool isoamílico quando comparada às cepas LBCM 427 e segregante, resistentes a TFL e cerulenina. Os resultados apresentados oferecem uma importante contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias de seleção de cepas selvagem com características específicas, levando a produção da cachaça com maior produção de compostos flavorizantes.

## Abstract

Aiming the molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 427 strain, selected from fermentations vats of a *cachaça* distillery, several analysis using polymorphism analysis of DNA for the characterization/discrimination of this and the selvagem strains present in the origin place was used. Results showed that RAPD-PCR, mtDNA, and PCR using complementary primers COXI gene region were not sufficient for distinguishing among them. On the other hand, the chromosomal pattern profile of karyotyping showed to be useful to discriminate the strains studied. These results showed that use of starting strains requires the combined use of biochemical and molecular methods for monitoring start strains. The parental strain LBCM 427, was sporulated and its tetrads were analyzed for physiologic and biochemical stability through successive generations. We selected the strains for: capacity flocculation, no H<sub>2</sub>S production, 5, 5',5''-trifluoro-DL-leucine (TFL) and cerulenin resistance and ability to adapt to stress conditions during fermentation of the sugarcane juice such as high osmotic concentration and temperature. No single segregant was found that kept entirely all the characteristics of the parental strain. In view of this result, a segregant keeping the characteristic of resistance to TFL and cerulenin compounds was selected for analysis of fermentation of sugar cane juice and probable mutation in the LEU4 gene that encodes for alpha isopropylmalate synthase (alpha-IPM). This segregant showed that alpha-IPM activity was not affected by the presence of increasing leucine concentrations (20 mM), and showed a new mutation in the LEU4 gene which has not been previously described in the literature. LBCM 427 and segregant strains were submitted to a small-scale distillation for *cachaça* production. The parameters analysed were the chemical profile of the product as well as strain ability to adapt to stress conditions during fermentation of the sugarcane juice in artisanal *cachaça*'s factory. Volatile compounds such as acetaldehyde, ethyl acetate, methanol, n-propanol, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol and furfural were quantified by gas chromatography assays. It was found that LBCM 427 and segregant strains produced higher level of isoamyl alcohol and isobutyl alcohol compared with control *S. cerevisiae* strains of the process. Another strain, LBCM 422 native *S. cerevisiae* strain, sensitive to both TFL and cerulenin, a control strain for the fermentation process, produced similar levels of isoamyl alcohol in relation to both LBCM 427 and TFL and cerulenin resistant segregant strain. The results offer an important contribution for the development of a strategy for strains selection from fermentation vats of *cachaça* distillery, showing higher production capacity of flavouring substances..

## ÍNDICE

	<b>RESUMO</b> .....	VIII
	<b>ABSTRACT</b> .....	IX
	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIV
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XV
	<b>LISTA DE ABREVIACOES</b> .....	XVII
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1	A CACHAÇA.....	19
1.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CACHAÇA.....	19
1.3	LEGISLAÇÃO VIGENTE.....	20
1.4	FABRICAÇÃO DA CACHAÇA ARTESANAL.....	21
1.5	PADRÕES DE IDENTIDADE.....	23
1.6	PONTOS CRÍTICOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CACHAÇA.....	26
1.7	A BUSCA POR QUALIDADE NAS BEBIDAS.....	27
1.8	IMPORTÂNCIA DA LEVEDURA NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO.....	29
1.8.1	<b>Constituição genética da <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	29
1.8.2	<b>Melhoramento genético de leveduras</b> .....	30
1.8.3	<b>Técnicas para análise genética de leveduras</b> .....	32
1.8.4	<b>Biossíntese de álcoois superiores e ésteres</b> .....	35
1.8.5	<b>Estratégias para aumentar a produção de ésteres</b> .....	40
1.8.6	<b>Metodologia para aumentar a produção de compostos aromatizantes da cachaça</b> .....	42
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	47
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
<b>3</b>	<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>48</b>
3.1	LINHAGENS UTILIZADAS.....	49
3.1.2	<b>Manutenção das leveduras</b> .....	49
3.2	MEIOS DE CULTURA.....	50

3.2.1	<b>Meio YP</b> .....	50
3.2.2	<b>Meio YP caldo de cana 10% agar</b> .....	50
3.2.3	<b>Meio Mínimo</b> .....	50
3.2.4	<b>Meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories)</b> .....	50
3.2.5	<b>Meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories)</b> .....	50
3.2.6	<b>Meio YEPD-MB (Yeast Extract Peptone Dextrose – Methylene Blue)</b> .....	50
3.3	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS NA DESTILARIA.....	51
3.4	TESTE DE SELEÇÃO PARA AS CEPAS SEGREGANTES.....	51
3.4.1	<b>Testes de Floculação</b> .....	51
3.4.2	<b>Medida da produção de H<sub>2</sub>S</b> .....	52
3.4.3	<b>Medida da produção e resistência a micocinas</b> .....	52
3.4.4	<b>Tolerância ao estresse</b> .....	52
3.4.5	<b>Tolerância à temperatura</b> .....	53
3.4.6	<b>Teste de resistência a 5,5',5"-trifluoro-DL-leucina (TFL) e Cerulenina</b> .....	53
3.4.6.1	Teste de sensibilidade natural a TFL.....	53
3.4.6.2	Teste de sensibilidade natural a Cerulenina.....	53
3.5	ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	54
3.5.1	<b>Determinação da atividade enzimática da invertase</b> .....	54
3.5.1.1	Inoculação e crescimento das células.....	54
3.5.1.2	Preparo de extratos celulares para determinação da atividade enzimática da invertase.....	54
3.5.1.3	Dosagem da enzima invertase.....	55
3.5.2	<b>Dosagem da atividade enzimática da <math>\alpha</math>-Isopropilmalato Sintase</b> .....	55
3.5.2.1	Preparo do inóculo e crescimento celular.....	55
3.5.2.2	Preparo de extrato para determinação da atividade enzimática da $\alpha$ -isopropilmalato Sintase .....	55
3.5.2.3	Dosagem da $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase.....	56
3.5.3	<b>Dosagem de Proteínas</b> .....	57
3.6	FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS NESTE ESTUDO.....	57
3.6.1	<b>Preparo do Inoculo</b> .....	57

3.6.2	<b>Determinação do grau alcoólico.....</b>	57
3.6.3	<b>Determinação de sacarose.....</b>	59
3.6.4	<b>Coleta de amostras para o acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo.....</b>	59
3.6.5	<b>Destilação em alambique de cobre.....</b>	59
3.6.6	<b>Determinação dos compostos voláteis na cachaça .....</b>	60
3.6.6.1	Reagentes e Padrões para cromatografia.....	60
3.6.6.2	Identificação e quantificação dos compostos voláteis.....	60
3.6.7	<b>Análise sensorial da cachaça.....</b>	60
3.7	<b>REPRODUTIVIDADE DOS RESULTADOS.....</b>	61
3.8	<b>IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DO POLIMORFISMO MOLECULAR DAS CEPAS.....</b>	62
3.8.1	<b>Preparação do DNA Genômico de leveduras.....</b>	62
3.8.2	<b>Método de Identificação por RAPD – PCR.....</b>	63
3.8.3	<b>Método de Identificação por mtDNA-RFLP.....</b>	63
3.8.3.1	Preparação do DNA mitocondrial.....	63
3.8.3.2	Digestão com enzimas de restrição.....	64
3.8.4	<b>Método de Identificação por COX – PCR.....</b>	65
3.8.4.1	Condições do COX-PCR.....	65
3.8.5	<b>Método de Cariotipagem.....</b>	65
3.9	<b>ISOLAMENTO E ANÁLISE POR SEQUÊNCIAMENTO DO GENE DA <math>\alpha</math>-ISOPROPILMALATE SINTASE.....</b>	66
3.9.1	<b>Dosagem do DNA.....</b>	66
3.9.2	<b>Amplificação pela PCR.....</b>	66
3.9.3	<b>Purificação do produto de PCR.....</b>	66
3.9.4	<b>Ligação do fragmento amplificado ao vetor plasmidial TOPO TA Cloning.....</b>	67
3.9.5	<b>Preparação de bactérias competentes.....</b>	67
3.9.6	<b>Transformação de bactérias.....</b>	68
3.9.7	<b>Extração de DNA Plasmidial.....</b>	68
3.9.8	<b>Reação de digestão do DNA utilizando a enzima de restrição <i>Kpn I</i> e <i>EcoR I</i>.....</b>	69
3.9.9	<b>Sequenciamento automático de DNA.....</b>	69

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
4.1	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS.....	71
4.1.1	<b>Análise do Polimorfismo molecular das cepas – RAPD – PCR.....</b>	71
4.1.2	<b>Método de Identificação por mtDNA-RFLP.....</b>	76
4.1.3	<b>Método de Identificação por COX – PCR.....</b>	78
4.1.4	<b>Método de Cariotipagem.....</b>	80
4.2	SEGREGANTES DA CEPA PARENTAL LBCM 427 .....	82
4.2.1	<b>Estudo das cepas segregantes.....</b>	82
4.2.2	<b>Atividade da enzima <math>\alpha</math>-Isopropilmalate Sintase.....</b>	89
4.2.3	<b>Análise da seqüência nucleotídica dos genes codificantes da <math>\alpha</math>-Isopropilmalato Sintase.....</b>	89
4.3	FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS.....	101
4.3.1	<b>Avaliação da fermentação em escala piloto das leveduras selecionadas.....</b>	101
4.3.2	<b>Determinação do consumo de sacarose.....</b>	101
4.3.3	<b>Determinação do etanol.....</b>	101
4.3.4	<b>Acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo....</b>	103
4.3.5	<b>Determinação dos componentes voláteis da cachaça.....</b>	105
4.3.6	<b>Avaliação sensorial de cachaças produzidas com cepas selecionadas como iniciadoras.....</b>	107
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>111</b>
5.1	ANÁLISE DO POLIMORFISMO MOLECULAR DAS CEPAS.....	112
5.2	ANÁLISE DAS SEGREGANTES DA CEPA PARENTAL LBCM 427.	116
5.3	CEPAS DE LEVEDURAS SELECIONADAS USADAS NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA.....	119
5.3.1	<b>Análise dos componentes voláteis.....</b>	120
5.3.2	<b>Avaliação sensorial de cachaças produzidas com cepas selecionadas como iniciadoras.....</b>	123
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>128</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Comparação dos teores de álcoois superiores e ésteres em diferentes bebidas.....	26
<b>Tabela 2</b>	Perfil de resistência a TFL e Cerulenina das cepas coletadas em 2001 e 2003.....	73
<b>Tabela 3</b>	Perfil de Resistência da TFL e Cerulenina das cepas selecionadas para análise do perfil molecular.....	74
<b>Tabela 4</b>	Resultado da segregação da cepa parental LBCM427.....	83
<b>Tabela 5</b>	Avaliação bioquímica e fisiológica das cepas segregantes.....	85
<b>Tabela 6</b>	Concentração de etanol (%v/v) e compostos voláteis (mg/100 ml de álcool anidro) em cachaças obtidas com diferentes cepas de leveduras.....	106
<b>Tabela 7</b>	Notas de avaliações sensoriais cachaças obtidas com diferentes cepas de leveduras e em fermentações sucessivas Notas de avaliação.....	108

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mecanismo de Ehrlich.....	36
<b>Figura 2</b>	Biossíntese de L-leucina e formação de álcool isoamílico e acetato de isoamila.....	37
<b>Figura 3</b>	Biossíntese de ácido graxo em leveduras.....	43
<b>Figura 4</b>	Estratégia para seleção de leveduras produtoras de maiores teores de compostos aromatizantes.....	45
<b>Figura 5</b>	Estratégia para fermentação e produção de cachaça, em escala piloto, das leveduras selecionadas.....	58
<b>Figura 6</b>	RAPD-PCR das cepas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isoladas de uma destilaria artesanal de cachaça em 2001(linhas 3 – 6) e leveduras isoladas em 2003 (linhas 7-10).....	75
<b>Figura 7</b>	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e visualizado sob luz UV, mostrando o perfil de mtDNA-RFLP ( <i>mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) de cepas LBCM 427, LBCM 422 e outras leveduras do gênero <i>Saccharomyces</i> .....	77
<b>Figura 8</b>	COX-PCR das cepas <i>S. cerevisiae</i> isoladas de uma destilaria artesanal de cachaça em 2001(linhas 3 – 6) e 2003 (linhas 7-10).....	79
<b>Figura 9</b>	Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídi e visualizado sob luz UV,utilizando sistema TAFE( <i>transverse alternating field electrophoresis</i> ), mostrando o perfil do cariótipo de diferentes espécies <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> e <i>S. kluyveri</i> .....	81
<b>Figura 10</b>	Análise de Componentes Principais (PCA) correspondendo a respostas das cepas segregantes quanto à estabilidade fisiológica....	88
<b>Figura 11</b>	Atividade da enzima $\alpha$ -IPM nas cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LBCM 427, LBCM 422, RB 8B e RB 23A .....	90

<b>Figura 12</b>	Análise comparativa, feita através do programa BLAST, da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 23A, com a seqüência do gene LEU4 descrita no <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database.....	92
<b>Figura 13</b>	Tradução da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 23A, feita através do programa BLAST e comparada com a seqüência do gene LEU4 descrita no <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database.....	95
<b>Figura 14</b>	Análise comparativa, feita através do programa BLAST, da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 8B, com a seqüência do gene LEU4 descrita no <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database.....	97
<b>Figura 15</b>	Tradução da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 8B, feita através do programa BLAST e comparada com a seqüência do gene LEU4 descrita no <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database.....	100
<b>Figura 16</b>	Determinação do consumo de sacarose e formação de etanol.....	102
<b>Figura 17</b>	Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando o perfil do mtDNA-RFLP ( <i>mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) de cepas LBCM 427, LBCM 422 e RB 23A.....	104
<b>Figura 18</b>	Análise de Componentes Principais correspondendo a respostas das cepas LBCM 422, LBCM 427, RB 23A e comercial, quanto aos compostos voláteis e análise sensorial da cachaça.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -IPM	$\alpha$ -isopropilmalato sintase
$\beta$ -IPM desidrogenase	$\beta$ -isopropilmalato desidrogenase
$\alpha$ -IPM isomerase	$\alpha$ -isopropilmalato isomerase
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
BAT1	Gene que codifica para aminoácido transferases citosólicas
BAT2	Gene que codifica para aminoácido transferases mitocondriais
DO <sub>600nm</sub>	Densidade ótica
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FAS2	Gene responsável pela resistência a cerulenina
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
LEU1	Gene que codifica para $\alpha$ -IPM isomerase
LEU2	Gene que codifica para $\beta$ -IPM desidrogenase
LEU4	Gene que codifica para $\alpha$ -IPM
mt-DNA-RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SEM	Etilmetanosulfonato
TFL	5,5', 5''-trifluoro-DL-leucina



## **1. – A Cachaça**

A cachaça é uma bebida destilada tipicamente brasileira e que tem a seguinte definição legal: “Cachaça é a denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % v/v a 48% v/v a 20° C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L, expressos em sacarose” (Brasil, 2005).

### **1.2 – Importância econômica da cachaça**

Dados do Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Minas Gerais (SEBRAE-MG) de 2002 mostraram que a produção da cachaça no Estado de Minas Gerais é da ordem de 230 milhões de litros/safra, representando cerca de 18% da produção nacional de aguardentes. Neste estudo, o Estado contabilizava cerca de 8.466 estabelecimentos produtores, que associando a produção da cachaça às atividades agropecuárias, empregavam direta e indiretamente, aproximadamente 240.000 pessoas, gerando uma renda anual estimada de R\$ 1,5 bilhão. Os estudos do SEBRAE-MG indicaram ainda que apenas 15% dos estabelecimentos produtores estão regularmente registrados e 85% operam de forma clandestina, sendo que 43% da cachaça produzida provém de estabelecimentos registrados e 57% dos clandestinos. (SEBRAE, 2002)

As exportações brasileiras de cachaça ganharam forte impulso nos últimos anos. Em 2003 e 2004, somados, foram negociados 17,251 milhões de litros com o exterior gerando uma renda de aproximadamente U\$ 20 milhões. Apenas nos 8 primeiros meses de 2005 o volume de negócios chegou a 6,953 milhões de litros. O Brasil exporta este produto para 45 países, mas essas vendas não atingem 1% da produção nacional que varia de 1,3 bilhão a 2 bilhões de litros. Apesar desses números, o Brasil exporta pouco e de forma inadequada, pois estima-se que um terço do produto é vendido a granel, o que torna difícil o controle de origem e a agregação de valor ao produto. Os principais clientes da cachaça no mercado internacional são: Alemanha, Paraguai, Uruguai, Portugal, Angola, Estados Unidos, Argentina, Itália, Bélgica, Espanha, Chile, França e Holanda. A Alemanha é nosso principal importador de destilado com 2,292 milhões de litros em 2004 (Rosa e cols., 2005).

### **1.3 – Legislação Vigente**

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em junho de 2005 a Instrução Normativa nº13 que reitera a definição de cachaça e de aguardente e estabelece novas classificações para o produto envelhecido. A Premium deve conter 100% de cachaça, ou aguardente, envelhecida por um período não inferior a um ano. Já a Extrapremium também deve conter 100% de cachaça, ou aguardente, mas com envelhecimento mínimo de três anos. A terceira categoria é a Envelhecida, que contém pelo menos 50% de cachaça reservada por um período não inferior a um ano. As normas exigem controle sobre contaminantes como carbamato de etila, acroleína, álcool *séc-butílico*, álcool *n-butílico*, chumbo, arsênio, cobre e metanol (Brasil, 2005).

No dia 21 de dezembro de 2001, o então Presidente da República Fernando Henrique Cardoso, assinou um decreto 4.062 reconhecendo a exclusividade de uso da indicação geográfica “cachaça” por parte do Brasil. Essa medida impõe patente sobre a expressão “cachaça”, preservando o produto nacional. Outra medida tomada pelo governo federal foi proteger a identidade da bebida no país regulamentando uma definição legal para a “cachaça” estabelecida no Decreto Federal nº 4.072 de janeiro de 2002. Agora o Brasil aguarda a definição da Organização Mundial das Aduanas (OMA) para solicitação de um código de enquadramento da cachaça ou da aguardente, sendo este diferente do rum.

Na última década algumas leis foram regulamentadas para padronizar as condições técnicas e higiênicas de trabalho para a produção da bebida, bem como dar caráter empresarial ao setor. A Lei Federal nº 8.918, de 14.07.94, dispõe sobre padronização, registro, inspeção, produção e fiscalização de todas as bebidas alcoólicas, inclusive a cachaça, além de sucos produzidos no Brasil. Esta lei, regulamentada pelo Decreto Federal nº 2.314, de 04.09.1997, traz indicações de características técnicas e responsabilidades de fiscalização de bebidas em geral. O licenciamento do produto para comércio está a cargo do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, por intermédio da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – (SDA). A Instrução Normativa Nº13/2005 dispõe sobre os padrões de identidade e qualidade da cachaça, mencionando especificamente os seguintes itens: grau alcoólico e teores de açúcares totais, acidez volátil em ácido acético, álcoois superiores (expressos pela soma do álcool *n-propílico*,

álcool isobutílico e álcoois isoamílicos), furfural somado a hidroximetilfurfural, aldeídos em acetaldeído e ésteres totais em acetato de etila.

Em Minas Gerais a cachaça também foi regulamentada com a edição da Lei da Cachaça de Minas, Lei Estadual nº 11.949, de 11/07/2001 que estabelece o padrão de identidade e as características do processo de elaboração da “*Cachaça de Minas*”. Com esta lei, o produtor pode vislumbrar a profissionalização e a remodelagem dos estabelecimentos tradicionais, maiores facilidades de comercialização do produto e legitimação dos padrões de identidade e qualidade da cachaça mineira (SEBRAE, 2002).

Uma outra iniciativa adotada pelo governo mineiro foi a criação do Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardentes de Qualidade (Pró-Cachaça), Lei nº 10.853/92, regulamentada pelo Decreto Estadual nº 34.645/93, que estimulou a organização e mobilização dos produtores de cachaça em entidades ou cooperativas. Esta medida proporcionou aos pequenos produtores algumas facilidades de comercialização do produto e de difusão de conhecimentos para melhorar e/ou aprimorar a qualidade do destilado produzido.

#### **1.4 – Fabricação da cachaça artesanal**

A fabricação da cachaça artesanal inicia-se na colheita de cana-de-açúcar que é cortada manualmente, despilhada e transportada para uma instalação onde passará pelo processo de moagem. Utilizando-se moendas elétricas, a cana-de-açúcar é moída inteira ou previamente picada, e o caldo extraído é recolhido em reservatório onde permanece com objetivo de deixar decantar as impurezas do líquido (pequenos fragmentos da cana-de-açúcar – bagacilho; fragmentos de solo; outras impurezas). Após a decantação, o caldo é filtrado e encaminhado, por tubulações, em geral de PVC, até as dornas de fermentação.

A cachaça de alambique mais tradicional utiliza o “pé-de-cuba” ou “pé-de-fermentação”, normalmente preparado no próprio local de produção da bebida, que tem como agente da fermentação uma mistura de leveduras presentes no ambiente. Cada produtor tem uma fórmula segundo as tradições locais, mas geralmente, o “pé-de-cuba” tem como componentes o farelo de arroz, fubá de milho, caldo de limão, etc. Uma das várias maneiras descritas para a preparação do “pé-de-cuba” sugere que os componentes

sejam misturados em quantidade suficiente para formar uma pasta e deixado em repouso por 12 a 24 horas. Adiciona-se o caldo de cana-de-açúcar diluído (1:1) até que o material fique submerso e deixa-se em repouso por mais 24 horas. Uma nova quantidade de caldo diluído é adicionada quando ocorre desprendimento de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o que indica atividade fermentativa; uma vez mais, a mistura é deixada em repouso por 24 horas. Repete-se este procedimento até que seja obtido um volume correspondente a 20% do volume do mosto a ser fermentado na dorna. Alternativamente, o fermento de panificação prensado pode ser usado como inóculo; no entanto, este tipo de fermento foi desenvolvido para atender as características da indústria de panificação.

As dornas geralmente cilíndricas são produzidas em madeira, aço inoxidável e aço-carbono com um volume total de acordo com a capacidade do aparelho de destilação. O processo fermentativo da cana-de-açúcar em mosto pode levar até 24 horas. A dorna é abastecida lentamente pelo caldo de cana-de-açúcar, podendo estar pré-aquecido ou não, de acordo com o clima da região. Ao término da fermentação, aguarda-se a decantação do fermento e o vinho sobrenadante é encaminhado, por tubulações, para destilação e um novo processo de fermentação é iniciado. O mesmo fermento é usado sucessivamente caracterizando um processo fermentativo semicontínuo.

A destilação do mosto é realizada em alambiques de cobre. O mosto é aquecido por fornalha ou caldeira, até que a mistura entre em ebulição e seja iniciada a emissão de vapores. A condensação dos vapores ocorre em uma serpentina de resfriamento, e o líquido formado (destilado) é então recolhido. O destilado é dividido em três partes referidas popularmente como: “cabeça”, “coração” e “cauda”. A primeira fração é descartada por conter grande quantidade de metanol. A “cauda” é desprezada ou redestilada por conter grande quantidade de água e produtos menos voláteis. O “coração”, que corresponde a cachaça, é encaminhada para o envase ou para o envelhecimento.

O produtor determina o tempo de envelhecimento e o tipo de madeira empregada nos barris. Ao término desta etapa, amostras do destilado são encaminhadas para análise dos Padrões de Identidade e Qualidade que se aprovadas pelos parâmetros instituídos na legislação, permitem que a bebida seja engarrafada e comercializada. A

comercialização do produto é regulamentada por lei e o produto deve seguir normas e estar registrado nos órgãos competentes (Cardoso, 2001; Gravata, 1999).

### 1.5 – Padrões de Identidade

A cachaça tem sua identidade e qualidade regulamentada pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005, tendo sido estabelecidos os seguintes padrões: graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20° C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L, expressos em sacarose. Segundo a Instrução, cachaça deve apresentar os seguintes teores máximos de componentes do Coeficiente de Congêneres:

Acidez volátil, em ácido acético.....	150 mg/100mL de álcool anidro
Ésteres totais, em acetato de etila.....	200 mg/100mL de álcool anidro
Aldeídos totais, em acetaldeído.....	30 mg/100mL de álcool anidro
Furfural somado a hidroximetilfurfural.....	5 mg/100mL de álcool anidro
Álcoois superiores, soma de álcoois isobutílico, isoamilico e n-propílico.....	360 mg/100mL de álcool anidro

O Coeficiente de Congêneres para os produtos não poderá ser inferior a 200mg por 100mL e não poderá ser superior a 650 mg por 100mL de álcool anidro.

É permitido um teor máximo de 25 mg de metanol /100mL de álcool anidro e o conteúdo de cobre não pode ultrapassar a 5 mg/L do produto. Contaminantes inorgânicos como chumbo e arsênio não podem estar em quantidade superior a 200 µg/L e 100 µg/L respectivamente. Enquanto contaminantes orgânicos como o carbamato de etila e acroleína (2-propenal) não podem estar em quantidade superior a 150 µg/L e 5 mg/100mL respectivamente.

Os métodos adotados pelo Ministério de Agricultura para quantificar os aldeídos e ácidos totais não oferecem resultados confiáveis em amostras coloridas e não permitem a especificação dos compostos. Esta limitação constitui uma desvantagem,

pois as propriedades químicas e toxicológicas não são as mesmas para todos os membros de uma série homóloga (Nascimento e cols., 1998).

Boscolo e cols (2000) investigaram o conteúdo de álcoois e ésteres de cachaça de diversas regiões produtoras e demonstraram que os valores de álcoois superiores estão próximos aos limites estabelecidos por lei, enquanto o éster está aproximadamente dez vezes inferior ao limite (Tabela 1). A quantidade de metanol na cachaça se encontra dentro dos limites legais, e é semelhante ao encontrado nas amostras de rum, entretanto, muito inferior à encontrada no vinho. O acetato de etila, um éster encontrado em bebidas, apresenta um teor três vezes menor na cachaça quando comparado ao uísque. A quantidade de álcool isoamílico da cachaça é menor que a encontrada no uísque. O fato da quantidade de ésteres na cachaça ser baixa em relação a outras bebidas pode influenciar no aroma e na qualidade, uma vez que o teor destes compostos está ligado a essas características (Cardoso e cols., 2004; Nobrega, 2003; Nonato e cols., 2001).

Tabela 1 – Comparação dos teores de álcoois superiores e ésteres em diferentes bebidas

<b>Composto</b>	<b>Legislação Brasileira</b>	<b>Cachaça</b>	<b>Rum</b>	<b>Uísque</b>	<b>Vinho</b>
Metanol	25	5,7	6,6	-	22
Álcool isoamílico	-	136	104	250	230
isobutanol	-	63	162	90	136
n-propanol	-	46	38	31	44
<b>Álcoois totais</b>	<b>360</b>	<b>263</b>	<b>314</b>	<b>468</b>	<b>410</b>
<b>Ésteres totais</b>	<b>200</b>	<b>24,4</b>	<b>69,7</b>	<b>74,1</b>	<b>-</b>

Resultados em mg/100mL de álcool anidro.

Fonte: Boscolo e cols (2000)

## 1.6 – Pontos críticos do processo de produção da cachaça.

O processo de fabricação tem seu início na colheita da cana-de-açúcar e hoje o agricultor dispõe de variedades de cana-de-açúcar que se adaptam a diversos tipos de solos e a variados climas, podendo ser colhidas em diferentes épocas do ano. Deve-se escolher uma variedade de cana-de-açúcar que proporcione a obtenção de um produto final de qualidade e que contribua para manter a continuidade da safra, cujo período se estende de maio a novembro (Cardoso, 2001; Gravata, 1999).

A qualidade do caldo de cana-de-açúcar que chega as dornas de fermentação contribui para o resultado final do produto. Cuidados inerentes a higiene no local de moagem da cana-de-açúcar, bem como onde o caldo de cana é filtrado e/ou aquecido, são de fundamental importância. A fermentação é ponto chave de todo o processo de fabricação de cachaça, sendo considerados fatores fundamentais: a escolha do inóculo, com cepas de qualidade, e do local, que deve ser apropriado para ocorrer o processo fermentativo. É comum na produção artesanal da cachaça o uso de dorna manufaturada com material impróprio, como por exemplo, a madeira. Materiais porosos e de difícil limpeza contribuem para a contaminação com microrganismos indesejáveis comprometendo assim a fermentação. Outro aspecto importante é a fermentação com temperatura controlada. A fermentação, na maioria dos alambiques, ocorre em sistema aberto, desprovido de manutenção da temperatura adequada para o processo.

A incorporação de cepas selecionadas que contribuam para a manutenção da identidade e da qualidade da cachaça produzida pode se constituir em etapa importante para o processo. Segundo Pataro e cols. (1998), durante uma safra, diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estão presentes na fermentação, e isto pode ser uma das causas que proporciona a irregularidade do destilado, em termos de composição química e de caracterização organoléptica. Também por esta razão, safras distintas podem produzir cachaças com composição e características diferentes. O estabelecimento de parâmetros que levem a escolha de cepas que se adaptem às condições de produção, e que contribuam para manter ou melhorar a qualidade da cachaça é um tema ainda pouco explorado e merecedor de muitos estudos.

O envelhecimento da cachaça ocorre geralmente em barris de carvalho (*Quercus Alba* L), também utilizado no envelhecimento de vinhos e uísque. De origem estrangeira, o carvalho também se encontra em extinção, sendo difícil sua aquisição no

mercado; desta forma, possui um alto valor no mercado. Como alternativa, têm-se estudado madeiras nativas para serem empregadas nesta atividade, tais como: amendoim (*Pterogyne nitens*), amburana (*Amburana cearensis*) e jequitibá (*Cariniana estrellensis*). As condições das adegas são as mais diversas. Na maioria dos casos, certas condições, tais como o controle de temperatura, de umidade, de luminosidade e de outros fatores que podem influir no envelhecimento não é levado em consideração. Diversas reações químicas acontecem durante este processo de envelhecimento, entre elas podem ser citadas: evaporação de compostos voláteis através da madeira do barril; formação de complexos moleculares estáveis a partir dos compostos secundários; e reações dos componentes da madeira com os componentes originais do destilado (Cardello & Faria, 1998; Cerdan e cols., 2004; Dias e cols., 1998; Escalona e cols., 2002; Mori e cols., 2003).

Após um período de envelhecimento em barris, a bebida adquire odor, cor e sabor típicos da madeira na qual foi acondicionada. É necessário conhecer bem as propriedades da madeira empregada na confecção do barril para se utilizar destas características para o aprimoramento do sabor e do aroma da bebida (Cardello & Faria, 1998; Cardoso, 2001; Mori e cols., 2003).

O engarrafamento e a comercialização da cachaça constituem a parte final do processo. Nem sempre as garrafas utilizadas no envase são fabricadas para este fim; muitos produtores ainda utilizam garrafas recicladas sem padronização de tipo, cor e material. Esta característica desqualifica o produto frente ao consumidor. A utilização de vasilhame que diferencie e sofistique o produto pode ser um fator capaz agregar valor à bebida (SEBRAE, 2002).

### **1.7 – A busca por qualidade nas bebidas.**

O aumento do consumo interno e a busca por espaço no mercado internacional são fatores que reforçam a necessidade de se melhorar e ou de se garantir a qualidade da cachaça produzida. Entretanto, em função de reduzido número de trabalhos publicados e/ou literatura especializada disponível é difícil estabelecer um padrão de qualidade para a cachaça.

Para que um tecnólogo de bebidas possa modificar as características e/ou controlar a qualidade de um produto é necessário que se conheça a composição química

do produto final. A cachaça é muito apreciada por possuir aroma e sabor característicos; segundo Nonato e cols. (2001), sua composição pode ser descrita como uma solução aquosa complexa, constituída de água, etanol, álcoois superiores, etil ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. Apesar de representar menos de 1% do total, os ésteres e os álcoois superiores são importantes para as características organolépticas da bebida, sendo seu aroma atribuído principalmente aos álcoois superiores e ésteres presentes (Boscolo e cols., 2000; Boza & Horii, 1998; Cardello & Faria, 1998; Cardoso e cols., 2004). Conhecer os compostos que atribuem identidade a uma bebida (por exemplo, o acetato de isoamila confere aroma característico do vinho tinto preparado com a variedade de uva Pinotage) é fator de avanço tecnológico para melhorar sua qualidade (Falqué e cols., 2001; Fraile e cols., 2000; Hernandez-Orte e cols., 2002).

Os compostos que proporcionam sabor e aroma ao vinho são formados durante a fermentação alcoólica e sua produção depende principalmente da espécie de levedura usada e das condições de fermentação (Pretorius, 2000). Na fabricação moderna de vinhos, cepas da levedura *S. cerevisiae*, usadas na fermentação alcoólica, produzem quantidades diferentes de compostos voláteis na bebida. Estudos demonstraram que a inoculação de cepas selecionadas contribui para as características do vinho, assim é importante conhecer os diferentes potenciais de produção de compostos voláteis das cepas de *S. cerevisiae* para escolher a melhor cepa para a produção de um vinho com mais qualidade (Cardoso e cols., 2004; Fraile e cols., 2000; Hernandez-Orte e cols., 2002; Ostergaard e cols., 2000; Patel & Shibamoto, 2002; Pretorius & Bauer, 2002; Pretorius & Hoj, 2005; Vianna & Ebeler, 2001).

A produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência a altas concentrações de açúcar, a habilidade de flocular, e a de produzir certos componentes do aroma da bebida, são algumas características desejáveis às linhagens de leveduras selecionadas para o processo de produção de bebidas. De modo contrário, a produção de sulfeto de hidrogênio é indesejável nas bebidas alcoólicas, devido a seu odor repugnante e ao baixo limite de detecção (Ostergaard e cols., 2000; Pretorius, 2000; Ribeiro & Horii, 2004). Devido à importância da levedura no processo de fermentação e às conseqüentes características organolépticas das bebidas fermentadas, a seguir descreveremos detalhadamente os aspectos relacionados à este microrganismo.

## 1.8 – Importância da levedura no processo de fermentação

### 1.8.1 – Constituição genética de *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* é um microorganismo leveduriforme que possui geralmente uma forma elipsoidal. Em condições ótimas de cultura e nutrição, sua biomassa é dobrada a cada 90 minutos. Esta levedura se reproduz de forma assexuada através de brotos (divisão mitótica) ou sexuada por esporulação (meiose, segregação e formação de haploides) e cruzamento com formação de diploides “mating” (Pretorius, 2000).

O genoma da cepa de laboratório de *S. cerevisiae* (linhagem BY4742) foi completamente seqüenciado apresentando-se relativamente pequeno, com grande número de cromossomos, baixa ocorrência de DNA repetitivo e de “introns”. Cepas haplóides contêm aproximadamente 12 a 13 megabases de DNA nuclear distribuídos ao longo de 16 cromossomos lineares e cerca de 6000 genes que transcrevem para proteínas. O genoma possui aproximadamente 35 a 55 cópias de retrotransposons (elementos Ty). Esses elementos móveis transportam-se de uma posição para outra no genoma por meio de um intermediário de RNA, provavelmente usando transcriptase reversa para fazer uma cópia de DNA partir de RNA, seguido pela integração num novo sítio. *S. cerevisiae* possui um DNA mitocondrial de 75Kb, rico em adenina e timina (Pretorius, 2000; Pretorius, 2003).

O fenômeno “Killer” observado em linhagens produtoras de micocinas que no processo fermentativo eliminam linhagens sensíveis, nesta levedura está associado a determinantes genéticos não-Mendelianos que ocorrem em fitas duplas de RNA e associadas a partículas virais (*Virus-like Particles* – VLP) não infecciosas. As VLPs são de 2 tipos de RNA de dupla fita: o genoma L e M. O genoma L transcreve para um RNA-dependente de RNA polimerase e uma capa viral que encapsula ambos os genomas. O genoma M transcreve para uma micocina e fator de imunidade. A micocina secretada é letal para cepas sensíveis de leveduras. As micocinas diferem entre espécies ou cepas mostrando uma diversidade de tamanho molecular, maturação de estrutura e imunidade (Marquina e cols., 2002; Pretorius, 2000; Pretorius & Hoj, 2005).

### 1.8.2 – Melhoramento genético de leveduras

O uso de inoculo a partir de uma cultura pura selecionada de levedura no processo industrial de fermentação de vinho e cerveja data de aproximadamente dois séculos (Pretorius, 2000). Desde então a busca por leveduras que melhorem as características do processo ou produto final tem sido o objetivo de muitas pesquisas. De um modo geral, o melhoramento genético das propriedades dos microorganismos usados no processo fermentativo é limitado pelo conhecimento do controle dos processos metabólicos que ocorrem dentro da célula.

As modificações genéticas das cepas de leveduras industriais são tradicionalmente realizadas com técnicas clássicas como a mutagênese, hibridização e fusão de protoplastos. A técnica de hibridização consiste no cruzamento de células haplóides de tipos de acasalamentos diferentes (“Mating type”) produzindo novos diploides heterozigotos, porém a maioria das cepas industriais esporulam pobremente dificultando a ampla aplicação do método. Outra técnica de hibridização, a fusão de protoplastos, utiliza a fusão de células de diferentes ploidias e ou espécies. Esta técnica apresenta resultados instáveis uma vez que pode não ocorrer uma completa fusão genética entre as cepas parentais. A técnica da mutagênese consiste em submeter as leveduras a diferentes dosagens de UV e isolamento em meio sólido seletivo. Após o emprego de uma dessas técnicas, as leveduras são selecionadas por características como a capacidade de fermentação, tolerância a etanol, ausência de produção de compostos de odor desagradável, osmotolerância, floculação e utilização de carboidratos. Uma desvantagem do uso destas técnicas clássicas é a dificuldade de adicionar ou remover características das cepas sem alterar a desempenho para a obtenção do produto final (Pretorius, 2000).

Nos últimos vinte anos, o grande progresso no desenvolvimento de novas técnicas moleculares para *S. cerevisiae* e aplicados com sucesso em cepas industriais permitiu o desenvolvimento de cepas especializadas. Um exemplo importante é a melhora significativa da qualidade organoléptica de produtos como o vinho (Pretorius & Hoj, 2005).

A levedura *S. cerevisiae* é um microorganismo modelo muito popular e importante na indústria alimentícia. A maioria das cepas comerciais usadas na indústria do vinho, por exemplo, são da espécie *S. cerevisiae*. Essas cepas são

predominantemente homotáticas, diplóides e com baixa capacidade de esporulação, quando comparadas com cepas de laboratório, elas exibem rearranjos e polimorfismo ao longo do cromossomo. Outro ponto importante é que as cepas padrão normalmente usadas em laboratórios são descendentes de isolados naturais, haplóides ou diplóides e tem o tamanho do cromossomo definido (Perez-Ortin e cols., 2002; Puig e cols., 2000).

A ploidia em leveduras pode conferir a vantagem de adaptação as variáveis do meio externo. As leveduras do vinho têm a habilidade de reorganização dos cromossomos durante o crescimento mitótico, capacidade observada ou não em cepas haplóides de laboratório. Devido a essa capacidade exacerbada de mudanças, em contraste com cepas de laboratório, parece não manter a uniformidade genética. A razão para isso é a habilidade natural de mudança no “mating type” quando haplóides (homotalismo). Usando esta capacidade, as células podem evoluir em três etapas: esporulação (que produz células haplóides através da redução mitótica), mudança de “mating type” das células filhas e conjugação com alguma outra célula da mesma colônia. Este mecanismo pode produzir cepas altamente homozigotas que eliminam mutações deletérias pela seleção natural. Existem ainda outros caminhos que as leveduras podem seguir para mudar suas características ao longo do tempo como, por exemplo, as mutações espontâneas, transposons Ty e adaptação ao meio ambiente (Dunn e cols., 2005; Poggeler, 2001; Pretorius & Hoj, 2005).

Desde a década de 1970, a inoculação de culturas puras selecionada de leveduras no mosto de vinho ou cerveja, tem melhorado a qualidade do produto. Durante a primeira metade do século vinte, as leveduras do vinho, por exemplo, eram selecionadas de forma quase empírica utilizando os métodos de genética clássica. A evolução da engenharia genética trouxe a possibilidade de mudanças nas características das leveduras com grande precisão e estabilidade fenotípica. As técnicas de DNA recombinante proporcionaram um grande avanço no campo da genética molecular, fisiologia e biotecnologia, possibilitando a construção de cepas comerciais alternando a expressão de genes (super-expressão ou deleção) (Dunn e cols., 2005; Pretorius, 2000; Pretorius & Hoj, 2005).

Atualmente muitas estratégias para que linhagens apresentem determinadas características podem ser utilizadas para aperfeiçoar uma cepa de levedura. Inicialmente pode-se isolar uma cepa da fermentação espontânea por de critérios tecnológicos que

contribuam para melhorar a qualidade do produto final. Em seguida, modificar genes que codificam para enzimas ou outras atividades celulares que possam direta ou indiretamente contribuir para a aquisição de características desejáveis (Gimren-Alcaniz & Matallana, 2001).

### 1.8.3 – Técnicas para análise genética de leveduras

Atualmente sabe-se que, pelo menos para o vinho, uma bebida muito estudada, a linhagem de levedura presente no processo de fermentação é de crucial importância para as características do produto final. Especialmente importante para a manutenção da qualidade do produto é que este seja o resultado de uma fermentação de uma cepa capaz de predominar no processo. Para a cachaça este processo é ainda mais sensível, visto que o mesmo é feito em sistema aberto. No sentido de acompanhar a ou as leveduras presentes no processo, utilizam-se atualmente se tem utilizado várias técnicas de análise genética.

As cepas de *S. cerevisiae* diferem significativamente em seu desempenho, contribuição no sabor e qualidade de vinhos e destilados. Esta razão levou ao desenvolvimento de métodos de identificação moleculares para diferenciação de cepas de leveduras, permitindo assim o estudo da relação dessas diferenças com características que contribuam favoravelmente para a qualidade da bebida (Lambrechts & Pretorius, 2000; Pretorius & Bauer, 2002; Pretorius & Hoj, 2005).

Durante o processo artesanal de fermentação do caldo de cana, existe uma sucessão de espécies de leveduras sendo *S. cerevisiae* prevalente no final do processo fermentativo. Estudos observaram que em uma população de leveduras de diferentes destilarias, algumas espécies são específicas de cada local e que as cepas estudadas apresentam alto polimorfismo genético (Guerra e cols., 2001; Morais e cols., 1997; Pataro e cols., 2000). Este fato aponta para a necessidade de técnicas que acompanhem a presença de leveduras *S. cerevisiae* iniciadoras em um processo fermentativo para garantir agilidade em possíveis intervenções com vistas a melhorar a qualidade do produto final (Lopez e cols., 2001; Schuller e cols., 2004; Valero e cols., 2005).

Leveduras usadas na indústria de bebidas alcoólicas são caracterizadas morfológicamente, fisiologicamente e por critérios bioquímicos. Entretanto essas técnicas não são suficientes para diferenciar cepas da mesma espécie. Por essa razão, o

uso de técnicas que possibilitem a distinção da cepa inoculada das restantes da microbiota natural presente no processo fermentativo tem incentivado o desenvolvimento de novas tecnologias. Nos últimos anos, novas metodologias baseadas no polimorfismo de DNA foram desenvolvidas para discriminar entre cepas próximas, especialmente para a indústria do vinho. A seguir serão citadas resumidamente as técnicas até então empregadas.

- Cariotipagem – A separação cromossômica realizada por um campo de eletroforese revelou considerável variabilidade na constituição cromossomal de cepas comerciais de leveduras utilizadas na indústria do vinho, sendo então um importante método para identificação de espécies de leveduras. Porém, a cariotipagem cromossômica tem como desvantagem a sua elevada complexidade, cara, laboriosa e demorada, o que impede sua utilização para um grande número de isolados (Fernandez-Espinar e cols., 2001; Querol e cols., 1992b; Schuller e cols., 2004).

- mt-DNA-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA*) - O polimorfismo do DNA-mitocondrial (mtDNA) é uma técnica largamente utilizada para caracterizar leveduras utilizadas na indústria da cerveja e do vinho. Esta técnica tem obtido muito sucesso na diferenciação tanto de gênero quanto da espécie de *S. cerevisiae*. É um método simples e rápido que utilizando a digestão do DNA mitocondrial por enzimas de restrição (exemplo a *HinfI* ou *RsaI*) associado ao alto polimorfismo genético, tem sido usada para estudar a autenticidade de cepas comerciais de leveduras (Guillamon e cols., 1994; Lopez e cols., 2001; Querol e cols., 1992b; Querol & Barrio, 1990).

- PCR (*Polymerase chain reaction*) - O desenvolvimento da técnica de PCR abriu novas possibilidades de identificação de cepas. Essa técnica tem sido aplicada usando iniciadores randômicos ou específicos. O genoma do *S. cerevisiae* contém seqüências repetitivas de DNA tal como as seqüências  $\delta$  que são frequentemente associadas aos elementos transposons Ty1. O número desses elementos e sua localização têm variabilidade intra-específica e podem ser usados como identidade genética. A reação de PCR utilizando a seqüência  $\delta$  tem bons resultados para discriminação entre cepas comerciais, porém não apresenta boa resolução para discriminar entre cepas selvagens. Uma extensiva pesquisa no programa BLAST

possibilitou aperfeiçoar estes *primers* e como resultado encontrar alto perfil polimórfico nas cepas comerciais estudadas (De Barros e cols., 1996; Legras & Karst, 2003; Schuller e cols., 2004). Outro método utilizando PCR é o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Esta técnica se baseia na amplificação de regiões randômicas usando iniciadores “específicos ou não”. Um exemplo bem descrito para *S. cerevisiae* é a utilização dos iniciadores EI1 e LA que contém seqüências complementares ao sítio de *splicing* dos introns. Uma vez que os introns não são essenciais para as funções gênicas, eles apresentam seqüências não conservadas e variáveis que podem ser usadas para identificação de espécie e intra-espécie. A vantagem dessa técnica é de analisar muitas amostras rapidamente permitindo monitorar a propagação das leveduras no processo fermentativo (Guerra e cols., 2001; Pataro e cols., 2000).

- AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) - A investigação da variação genética possibilitou o desenvolvimento de outro método para diferenciação de cepas e espécies de leveduras: Esta técnica baseia-se na amplificação por PCR de fragmentos de DNA específicos seguida de digestão por enzimas de restrição e análise dos fragmentos gerados. Apesar de ser uma importante técnica para diferenciar cepas de *S. cerevisiae*, sua aplicação na rotina do controle de qualidade industrial pode ser inviabilizada pelo longo tempo exigido para emissão do resultado (De Barros e cols., 1999; Fernandez-Espinar e cols., 2001).

Variação do número e posição dos introns no gene mitocondrial COXI - Ainda utilizando o método de PCR, outro protocolo foi desenvolvido: A variação no intron COXI tem sido observada entre cepas e entre espécies permitindo a diferenciação de cepas de *S. cerevisiae*. Uma reação de PCR multiplex com quatro *primers* selecionados mostrou-se muito efetivo na análise de polimorfismo de leveduras selvagens e comerciais para uso na fermentação do vinho (Lopez e cols., 2003).

- O PCR-DGGE (*DGGE - Denaturing gradient gel electrophoresis*) – esta é uma técnica baseada na amplificação por PCR de uma seqüência específica alvo no DNA e seguida pela separação dos fragmentos gerados em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear desnaturante. Neste processo, diferenças mínimas de números de bases são detectadas e utilizadas como parâmetro de comparação Utilizando os iniciadores Schaf/Schar foi possível identificar cepas de leveduras usadas como iniciadoras em

processo industrial e em estudos ecológicos de fermentação de vinho e cerveja (Manzano e cols., 2004)

- Análise de microsátélites - Microsatelites são seqüências de DNA de pequenos motivos repetidos (1-10 nucleotídeos) dispostos lado a lado dispersos por genoma e que mostram variação no número de repetições entre diferentes espécies ou intra-espécie. Essas seqüências estão presentes no genoma de eucariotos, procariotos e vírus e são usados como marcadores genéticos para estudo de mapeamento genético de populações. Apesar de ser uma técnica muito promissora para a diferenciação de cepas de *S. cerevisiae*, do ponto de vista da aplicação industrial, tem a desvantagem de utilizar equipamentos muito caros e apresentar demora em emitir laudos (Howell e cols., 2004; Legras e cols., 2005; Marinangeli e cols., 2004; Perez e cols., 2001)

#### 1.8.4 – Biossíntese de álcoois superiores e ésteres

Em um modelo de processo fermentativo com *S. cerevisiae*, partindo de um inoculo com 22 a 24% de açúcar, 95% é convertido a etanol e dióxido de carbono, 1% é convertido em material celular e o restante é convertido em outros produtos como glicerol, álcoois superiores e ésteres (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Os álcoois superiores são produzidos pelas leveduras durante a fermentação e contribuem para as características organolépticas das bebidas alcoólicas. Os álcoois superiores são derivados geralmente da transaminação de  $\alpha$ -cetoácidos intermediários das vias biossintéticas de aminoácidos, tais como a valina, leucina, isoleucina, treonina e fenilalanina. O  $\alpha$ -cetoisovalerato pode ser convertido no álcool isobutílico e o  $\alpha$ -cetoisocaproato em álcool isoamílico (Pretorius, 2000).

A síntese de álcool isoamílico, por exemplo, pode ser realizada por dois caminhos: pelo mecanismo de Ehrlich, onde ocorre a descarboxilação e redução de  $\alpha$ -cetoácidos (Figura 1); ou a partir do  $\alpha$ -cetoisocaproato, um precursor do álcool isoamílico sintetizado na via de síntese de L-leucina a partir de glicose (Figura 2). No mecanismo de Ehrlich, os aminoácidos extracelulares são absorvidos pelas leveduras, via transportadores (por exemplo; aminoácidos permease, Gap1p; transportadores específicos de alta e baixa afinidade para aminoácidos, Bap2p e Bap3p), e transaminados para formar os  $\alpha$ -cetoácidos, os quais são

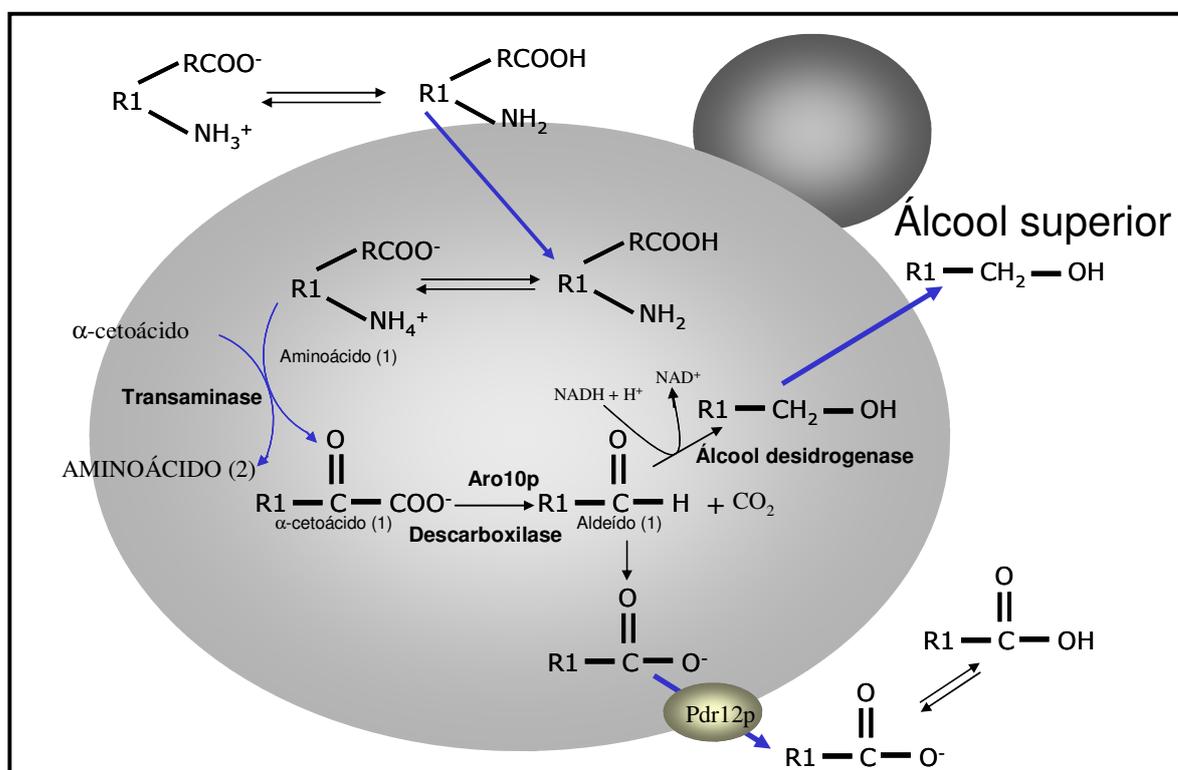


Figura 1 – Mecanismo de Ehrlich. A formação de álcoois superiores ocorre com a descarboxilação e redução de  $\alpha$ -cetoácidos.

Fonte: (Hazelwood e cols., 2006; Vuralhan e cols., 2005) (Adaptado)

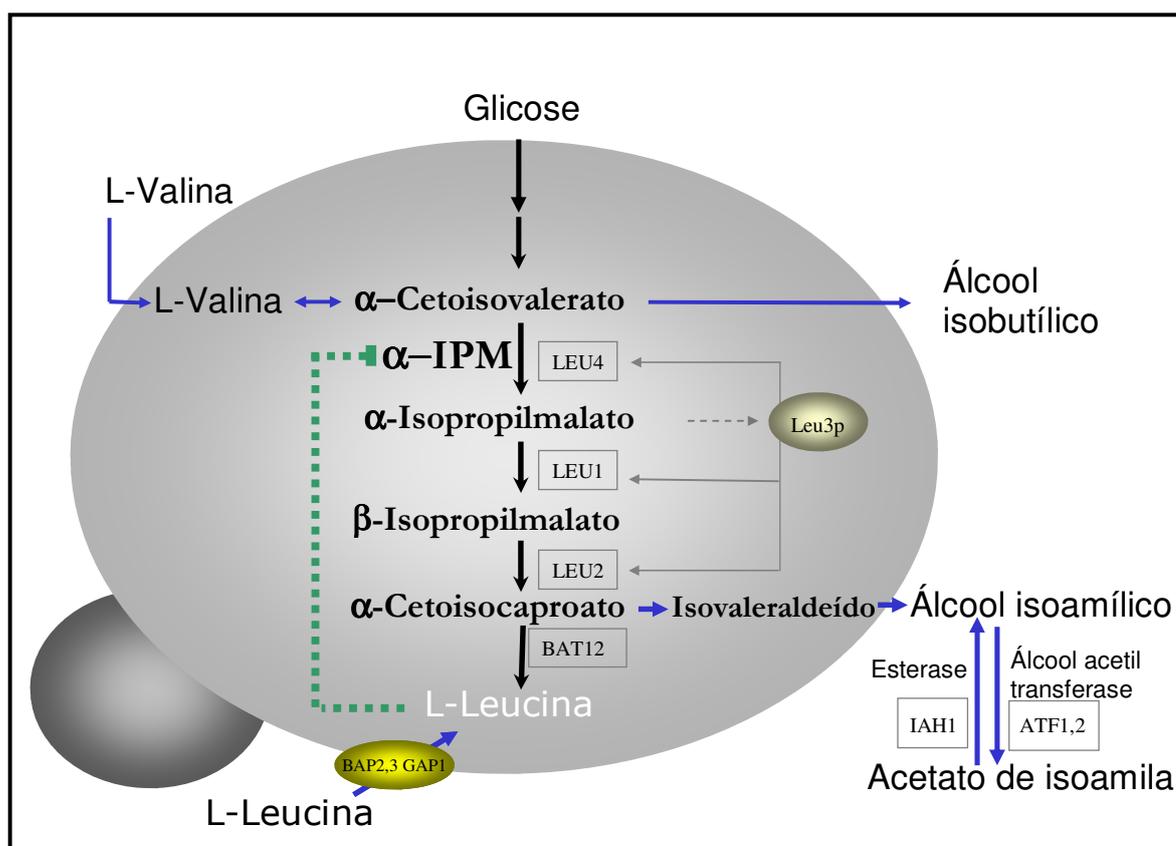


Figura 2 – Biossíntese de L-leucina e formação de álcool isoamílico e acetato de isoamila. O  $\alpha$ -cetoisocaproato é convertido em L-leucina ou álcool isoamílico. A  $\alpha$ -IPM sintase é a enzima chave no controle desta via sintética. O acúmulo de L-leucina inibe a atividade da  $\alpha$ -IPM.

Fonte: (Ashida e cols., 1987; Kohlhaw, 2003; Oba e cols., 2006) (Adaptado)

descarboxilados e reduzidos à álcoois superiores como o n-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico. O primeiro passo no catabolismo de aminoácidos é a transaminação do respectivo  $\alpha$ -cetoácido, reação catalisada por aminoácido transferases citosólicas e mitocondriais, codificadas pelos genes BAT1 e BAT2 respectivamente. Ambas as isoenzimas resultantes permitem a catálise de transferência de reação do grupo amino da L-Leucina para o 2-oxoglutarato, produzindo o oxoácido. No segundo passo ocorre a conversão do correspondente  $\alpha$ -cetoácidos para função de aldeído via reação de descarboxilação pela enzima piruvato descarboxilase. Estes aldeídos são reduzidos a álcoois superiores pela álcool desidrogenase (Ashida e cols., 1987; Casalone e cols., 1997; Eden e cols., 2001; Lilly e cols., 2000; Pretorius, 2000; Schoondermark-Stolk e cols., 2005; Swiegers e cols., 2005; Van Der Sluis e cols., 2002; Yoshikawa e cols., 1995; Yoshizawa, 1999).

A síntese de álcool isoamílico via biossíntese de L-leucina ocorre a partir da descarboxilação seguida de redução do  $\alpha$ -cetoisocaproato resultando em isovaleraldeído (Figura 2). A biossíntese de L-leucina a partir de glicose via  $\alpha$ -isopropilmalato, é catalisada seqüencialmente pela  $\alpha$ -IPM sintase (gene LEU4),  $\alpha$ -IPM isomerase (gene LEU1), e  $\beta$ -IPM desidrogenase (gene LEU2) e tem como substrado o  $\alpha$ -cetoisovalerato,  $\alpha$ -isopropilmalato e  $\beta$ -isopropilmalato respectivamente. O  $\alpha$ -cetoisocaproato é convertido em L-leucina ou álcool isoamílico. A  $\alpha$ -IPM sintase é a enzima chave no controle desta via sintética e isto é feito pelo produto final, ou seja, o acúmulo de L-leucina inibe a atividade da  $\alpha$ -IPM. A transcrição dos genes LEU4, LEU1 e LEU2 são induzidos pelo fator transcricional Leup3. Este fator atua como um repressor na ausência e ativador na presença de  $\alpha$ -IPM (Kohlhaw, 2003; Oba e cols., 2006).

Por outro lado, os ésteres encontrados em bebidas alcoólicas são produzidos durante a fermentação como produtos secundários do metabolismo de açúcares e constituem um importante grupo de componentes que afetam o sabor e aroma do produto. Os ésteres de bebidas alcoólicas podem ser classificados por diferentes parâmetros como pelo ponto de ebulição (baixo, médio e alto), pelo odor (flores e frutas etc) e polaridade (polar e apolar) (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Os ésteres são geralmente formados intracelularmente pela reação de condensação entre acetil coenzima A e etanol ou álcoois superiores produzidos no

metabolismo de aminoácidos. A síntese de ésteres por *S. cerevisiae* é catalizada por um grupo de enzimas chamadas álcool O-acetiltransferases (AATs) que utilizam os álcoois e acetil coenzima A como substratos. Foram descritas quatro diferentes álcool acetiltransferases: Atf1p, Lg-Atf1p, Atf2p e Eht1p (etanol hexanoil transferase). Esta possivelmente responsável pela conversão de etanol e hexanoil coenzima A em caproato de etila (Fujii e cols., 1996; Fujiwara e cols., 1999; Fukuda e cols., 1998; Fukuda e cols., 2000; Lilly e cols., 2000; Lyness e cols., 1997; Mason & Dufour, 2000; Verstrepen e cols., 2003c; Verstrepen e cols., 2003a; Verstrepen e cols., 2004; Yoshikawa e cols., 1995; Yoshizawa, 1999).

A álcool acetiltransferase I, Atf1p, tem sido apontada como a principal responsável pela formação da maior parte de compostos de ésteres pela fermentação com cepas de *S. cerevisiae* (Lilly e cols., 2000; Verstrepen e cols., 2003c). Alguns ésteres como acetato de isoamila e acetato de etila, são compostos importantes para o aroma do vinho, cerveja e outras bebidas. Esta enzima está localizada em partículas lipídicas da levedura sugerindo que a Atf1p tem um papel específico no metabolismo de lipídeos e/ou esterol (Verstrepen e cols., 2004).

A Atf1p é codificada pelo gene ATF1 e consiste de 525 aminoácidos com massa molecular de 61kDa. Atf1p é apontada como responsável por 80% da formação de acetato de isoamila e 40% do acetato de etila em vinho. Este dado é reforçado por experimentos de superexpressão de Atf1 que resultaram em um aumento de 100 vezes na concentração de acetato de isoamila e acetado de etila. O gene ATF1 é reprimido por traços de oxigênio, ausência de fontes de nitrogênio e carbono e ácidos graxos insaturados de cadeia média (Fujii e cols., 1997; Lilly e cols., 2000; Mason & Dufour, 2000).

A produção de maiores teores dos ésteres acetato de isoamila e caproato de etila dependem da disponibilidade dos precursores e do controle das atividades das enzimas envolvidas na síntese e na hidrólise destes compostos. Os genes ATF1, ATF2 e IAH1 foram clonados e superexpressos em leveduras do vinho. Executando-se uma fermentação com estes transformantes comparou-se a concentração de ésteres no vinho e no destilado. A superexpressão dos genes ATF1 e ATF2 resultou no aumento da concentração de acetato de isoamila e de acetato de etila enquanto para o gene IAH1 mostrou uma significativa diminuição desses ésteres. Resultado semelhante foi

observado em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* usadas na fabricação de sakê. (Fukuda e cols., 1996; Fukuda e cols., 1998; Lilly e cols., 2000; Mason & Dufour, 2000; Swiegers e cols., 2005). Recentemente foi descrito que a investigação e manipulação dos aspectos que estão envolvidos na produção de ésteres pelas leveduras pode resultar em desenvolvimento de estratégias para uma maior produção desse composto (Pretorius & Hoj, 2005).

### 1.8.5 – Estratégias para aumentar a produção de ésteres

O aroma e o sabor são características que diferenciam, identificam e oferecem qualidade a alimentos e a bebidas fermentadas. Vários são os fatores que influenciam nestas características. Neste sentido, aproximadamente 100 compostos foram identificados no vinho e cerca de 300 no saquê. Em vinhos e “brandies”, foi demonstrado que os ésteres e álcoois superiores produzidos durante o processo fermentativo das leveduras contribuem para o aroma destas bebidas. O aroma de frutas presente no vinho, “brandy”, saquê e em outras bebidas é atribuído a compostos como o caproato de etila (maçã), acetato de isoamila (banana), caprilato de etila (maçã) e acetato de 2-feniletil (frutas, flores e mel) (Yoshizawa, 1999; Lilly *et al.*, 2000; Nonato *et al.*, 2001; Falqué *et al.*, 2001).

Estudos sobre a produção de compostos aromatizantes pelas leveduras utilizadas na produção do saquê têm tido grande impulso nos últimos anos, como uma estratégia de melhoria da qualidade desta bebida. Isto também se explica pelo fato de que o consumo da cerveja e do vinho tem aumentado, causando um declínio do consumo do saquê. Como consequência, o consumo de saquê de melhor qualidade tem aumentado sensivelmente. A criação do “National Research Institute of Brewing” no Japão, possibilitou a sistematização do processo de fabricação da bebida e melhorou a qualidade e variedade do saquê (Yoshizawa, 1999).

O desenvolvimento de leveduras de referência contribuiu significativamente para a microbiologia e biotecnologia industrial (Yoshizawa, 1999). Várias leveduras foram desenvolvidas para aumentar a concentração de compostos que conferem aroma no saquê. Para isso, cepas mutantes induzidas foram selecionadas e passaram a ser usadas no processo de fabricação da bebida. Muitas destas cepas têm inoperante o sistema de inibição por “feedback” da síntese de alguns aminoácidos. Alguns mutantes

foram obtidos por exposição a irradiação UV ou a agentes químicos como o etilmetanosulfonato (SEM) e selecionadas usando um análogo da L-leucina, o 5,5',5''-trifluoro-DL-leucina (TFL) no meio seletivo. Os mutantes resistentes a TFL não são retroinibidos por L-leucina o que possibilita o acúmulo de álcool isoamílico (Ashida e cols., 1987). Cepas com habilidade de formação e acúmulo de ácido caprótico foram obtidas com mutantes resistentes a cerulenina, uma droga que inibe a síntese de ácidos graxos (Yoshizawa, 1999).

Como abordamos anteriormente (Figura 2), a biossíntese de L-leucina a partir de glicose via  $\alpha$ -isopropilmalato, é catalisada por várias enzimas como, por exemplo, a  $\alpha$ -IPM sintase. A  $\alpha$ -IPM sintase é a enzima chave no controle desta via sintética e isto é feito pelo produto final, ou seja, o acúmulo de L-leucina inibe a atividade da  $\alpha$ -IPM (Figura 2). Cepas mutantes que apresentam a  $\alpha$ -IPM insensível a inibição por “feedback” por L-leucina, apresentam uma superprodução de L-leucina e resistência a TFL (Ashida e cols., 1987; Bondoni e cols., 1999; Casalone e cols., 1997; Satyanarayana e cols., 1968; Ulm e cols., 1972).

Segundo Yoshizawa (1999), cepas selvagens em presença de TFL promovem a incorporação deste análogo em proteínas. Como estas proteínas terão suas atividades afetadas, a síntese de L-leucina é inibida e a célula não sobrevive a exposição a este composto em meios de cultivo. Mutantes resistentes a TFL não apresentam a inibição por L-leucina, desta forma, a célula não somente sobrevive como produz grandes quantidades de álcool isoamílico e de L-leucina.

Por outro lado, o caproato de etila é um importante componente do saquê, conferindo sabor de maçã a bebida. Este composto é sintetizado pela enzima álcool aciltransferase, usando como precursores o etanol e o caproil coenzima A (caproil-CoA). O caproato de etila também pode ser convertido por uma esterase, sendo que neste caso os produtos são o ácido caprótico e o etanol (Yoshizawa, 1999).

Na busca pelo desenvolvimento de leveduras que produzam elevados teores desse éster, Ichikawa e cols. (1991) isolaram mutantes resistentes a cerulenina que produziam maiores quantidades de etil caproato no processo de produção do sake quando comparados às cepas originais e sugeriram que o ácido caprótico tem relação com a síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos na levedura é catalisada por

uma enzima multifuncional com sete sítios catalíticos, a ácido graxo sintetase (Figura 3) Mudanças na atividade catalítica da enzima ácido graxo sintetase tem como resultado a alteração do comprimento de ácidos graxos formados. A cerulenina é um inibidor específico da ácido graxo sintetase. A análise de cepas mutantes resistentes a cerulenina indicou que mutação no gene FAS2 pode ser responsável por essa resistência e alta produção de caproato de etila (Akada e cols., 1999; Akada e cols., 2001; Arikawa e cols., 2000; Aritomi e cols., 2004; Asano e cols., 2000; Ashida e cols., 1987; Ichikawa e cols., 1991).

### **1.8.6 – Metodologia para aumentar a produção de compostos aromatizantes da cachaça.**

O Laboratório de Biologia Celular e Molecular - LBCM – do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB, desenvolveu uma metodologia para o isolamento de cepas de *S. cerevisiae*, a partir de amostras de fermentação em dornas de produção da cachaça, com maiores teores de compostos aromatizantes como álcoois superiores e ésteres (Figura 4). As cepas foram selecionadas seguindo critérios relevantes para a produção da bebida, como: não produção de H<sub>2</sub>S, floculação, capacidade fermentativa, tolerância a etanol e a temperaturas elevadas. As leveduras selecionadas foram expostas ao TFL e cerulenina como parte de uma estratégia para identificar aquelas maiores produtoras de álcoois superiores e ésteres. Selecionaram-se duas cepas, LBCM 427 e LBCM 422, naturalmente resistente a TFL e cerulenina e naturalmente sensível a estes compostos, respectivamente. Por cromatografia gasosa, quantificou-se a produção de álcool isoamílico e ácido capóico e verificou-se que a cepa resistente a TFL e cerulenina produz elevados teores de ambos os compostos (Vicente e cols., 2003; Vicente, 2003). Os resultados em conjunto encontrados neste trabalho permitiram vislumbrar a investigação de outros aspectos como avaliar a capacidade destas leveduras adaptarem-se no processo fermentativo do caldo de cana-de-açúcar, qualidade sensorial da cachaça produzida, assim como estudar as diferenças genéticas das leveduras selecionadas que podem diferenciar e ou melhorar a qualidade do produto

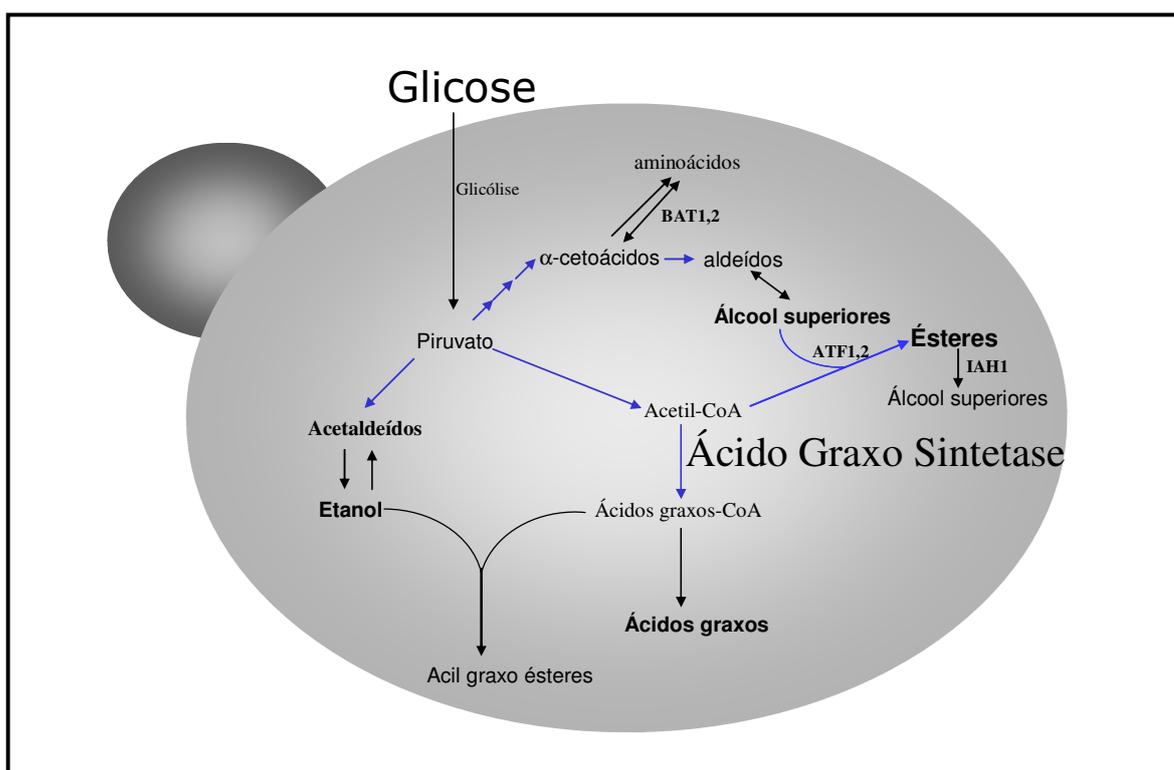


Figura 3 - Biosíntese de ácidos graxos em leveduras. A síntese de ácidos graxos na levedura é catalisada por uma enzima multifuncional, a ácido graxo sintetase. Mudanças na atividade catalítica da ácido graxo sintetase tem como resultado a alteração do comprimento dos ácidos graxos formados. O metabolismo de formação de éster pode ser um processo de desintoxicação da levedura, uma vez que ácidos graxos de cadeias entre C<sub>8</sub> e C<sub>14</sub> são tóxicos para a célula. A cerulenina é um inibidor específico da ácido graxo sintetase.

Fonte:(Beltran e cols., 2006; Ichikawa e cols., 1991).

final. Este trabalho permitiu ainda conjecturar a introdução de métodos de isolamento e/ou geração de mutantes que apresentem perfis com características mais adequadas para contribuir para a produção de teores mais elevados de compostos aromatizantes.

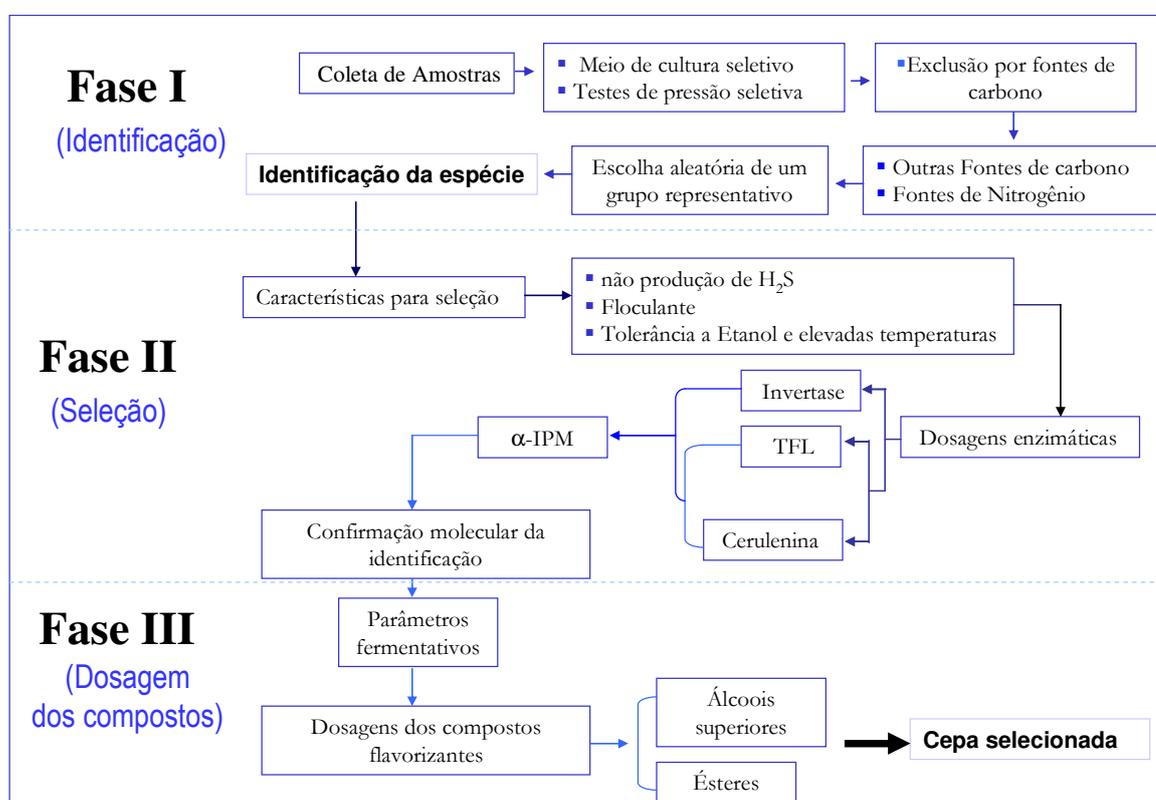


Figura 4 – Estratégia para seleção de leveduras produtoras de maiores teores de compostos aromatizantes. A seleção da levedura é dividida em três fases: identificação, seleção e dosagem dos compostos.



## 2.1 – Objetivo Geral

Caracterização molecular de cepas utilizadas na produção de cachaça de alambique com ênfase nos mecanismos de produção de compostos aromatizantes.

## 2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar métodos de identificação molecular quanto a capacidade de discriminar leveduras selecionadas das cepas nativas presentes no processo fermentativo da produção de cachaça de alambique do local onde foi isolada;
- Obter cepas segregantes de leveduras selecionadas para avaliar a estabilidade fisiológica e eventuais mutações no gene que codifica para a enzima  $\alpha$ -isopropilmalato sintase;
- Selecionar cepas segregantes resistentes a TFL e a cerulenina com características apropriadas para atender as condições empregadas no processo artesanal de produção da cachaça;
- Validar o método de seleção das leveduras por produção da cachaça em alambique de cobre, em escala piloto;
- Determinar os níveis de compostos voláteis e analisar sensorialmente o destilado produzido durante o processo fermentativo utilizando as cepas selecionadas.



### 3.1 – Linhagens utilizadas

<i>Cepas</i>	<i>Descrição</i>
LBCM 427	Cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resistente a TFL e Cerulenina (Vicente e cols., 2006)
LBCM 422	Cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sensível a TFL e Cerulenina (Vicente e cols., 2006)
RB 23A	Cepa segregante da cepa parental LBCM 427 resistente a TFL e Cerulenina
R 300 a R 330	Cepas isoladas de caldo fermentado da safra 2003 de uma destilaria de cachaça da região de Ouro Preto - MG
RB1, RB5, RB7, RB8, RB10, RB14, RB18, RB19, RB23, RB26, RB27, RB31, RB35, RB36	Cepas segregantes da cepa parenteral LBCM 427 (indicação de resistência a drogas ver Tabela 5)
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Cepa selvagem de laboratório
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Cepa selvagem de laboratório
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Cepa selvagem de laboratório
<i>S. cerevisiae</i> (W303)	Cepa selvagem de laboratório
<i>Cândida glabrata</i> NCYC 388	Cepa produtora de micocina
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006	Cepa sensível a micocina
<i>S. cerevisiae</i> Comercial	Cepa comercial usada na produção de vinho

#### 3.1.2 – Manutenção das leveduras

As cepas de leveduras foram mantidas em Meio YP dextrose 2% e estocadas em geladeira a cerca 4°C. As leveduras também foram armazenadas junto a coleção do laboratório em Meio YP dextrose 2%, acrescido de glicerol 10% em freezer -80°C.

## **3.2 – Meios de Cultura**

### **3.2.1 – Meio YP**

O meio YP (Yeast Peptone) é composto por extrato de levedura 10g/l, peptona 20g/l e agar 20g/l (para meio sólido) e fonte de carbono. Nos experimentos foram utilizadas diferentes fontes de carbono (Por exemplo, glicose, etanol, sacarose) em diferentes concentrações conforme indicado nas figuras e tabelas.

### **3.2.2 – Meio YP caldo de cana 10% agar**

O meio YP caldo de cana é composto por caldo de cana recém colhido, extrato de levedura 10g/l, bacto-peptona 20g/l e agar 2g/l. O caldo de cana não sofreu nenhum processo de esterilização. No momento do plaqueamento adicionou-se 100 µg/mL do antibiótico cloranfenicol para prevenir contaminação por bactérias (Pataro e cols., 2000).

### **3.2.3 – Meio Mínimo**

O Meio Mínimo é composto por 6,7 g/l de base nitrogenada sem aminoácidos e sem suplementar com aminoácidos, glicose 2%, agar (1,5%) para meio sólido, pH 6,5.

### **3.2.4 – Meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories)**

O meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante. As fontes de nitrogênio utilizadas foram: nitrato de potássio e lisina.

### **3.2.5 – Meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories)**

O meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

### **3.2.6 – Meio YEPD-MB (Yeast Extract Peptone Dextrose – Methylene Blue)**

O Meio YEPD-B é composto por extrato de leveduras (1%), peptona (2%), glicose (2%) e agar (3%) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 4,5. No momento de plaqueamento adiciona-se 0,01% de azul de metileno (Morais e cols., 1997; Pataro e cols., 1998).

### **3.3 – Isolamento das leveduras na destilaria**

Para verificar a presença das cepas LBCM422 e LBCM427 na destilaria, coletamos novas amostras de mosto fermentado dois anos após o primeiro estudo. As amostras de mosto foram coletadas no ano de 2003, nas dornas da destilaria localizada no distrito de Santo Antônio do Leite, Município de Ouro Preto – MG no início da safra de produção de cachaça (10 dias de produção) e com quatro horas de fermentação. As amostras foram coletas em frascos estéreis previamente identificados, mergulhando-os nas dornas e coletando cerca de 150 mL de mosto fermentado. Os frascos foram acondicionados em gelo e transportados ao laboratório e processados em até uma hora após a coleta. Essas amostras foram submetidas à diluição seriada em água estéril (1:10; 1:100 e 1:1000) e alíquotas de 100 µl foram inoculadas, em triplicata, em placas contendo meio YPD caldo de cana cloranfenicol 100µg/mL e incubadas a 30° C por 72 horas. Todas as colônias de leveduras crescidas nestes meios de cultura foram repicadas para meio YPD 2% e incubadas a 30° C por 72 horas (Pataro e cols., 2000). Foram obtidas 358 leveduras das quais 35 foram aleatoriamente escolhidas para testes de resistência a TFL e cerulenina.

### **3.4 – Teste de seleção para as cepas segregantes**

A levedura LBCM 427 foi inoculada em meio YPD 2% e incubadas a 30° C “overnight” e transferida para o meio de esporulação (Acetato de sódio 1,5%, Agar 2%). Os ascos foram dessecados utilizando micromanipulador e os esporos foram germinados em meio YPD Agar. Este experimento foi realizado no laboratório do doutor Johan M. Thevelein no Centre for Malting and Brewing Science, Department of Food and Microbial Technology, K.U. Leuven, Belgium.

#### **3.4.1 - Testes de Flocculação**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Em seguida foram feitos inóculos em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio YPD 2%. Esses tubos foram incubados por 24 horas, a 28° C, sob agitação a 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). Após esse período, uma alíquota de 50 µl da amostra em estudo e 950 µl de meio YPD 2% foi transferida

asépticamente para uma cubeta e medido a  $DO_{600nm}$  em um espectrofotômetro (Beckman Modelo DU-68). A amostra era incubada até atingir uma  $DO_{600nm}$  igual a uma unidade e a floculação foi observada visualmente (D'Hautcourt & Smart, 1999; Jin & Speers, 2000; Jin & Speers, 1998; Powell e cols., 2003; Verstrepen e cols., 2001; Verstrepen e cols., 2003b).

### **3.4.2 – Medida da produção de H<sub>2</sub>S**

As leveduras foram crescidas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Após este período, as leveduras foram inoculadas em meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories) e incubadas a 30° C durante 72 horas. As colônias que apresentavam coloração negra após o término do tempo de incubação foram consideradas produtoras de H<sub>2</sub>S (Jiranek e cols., 1995b; Jiranek e cols., 1995a).

### **3.4.3 – Medida da produção e resistência a micocinas**

As cepas segregantes, *Cândida glabrata* NCYC 388 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 foram crescidas separadamente em placas contendo YPD e incubadas a 30° C por 48 horas. Após o crescimento as colônias de leveduras foram submetidas a diluição em 1mL de solução salina (0,9% de NaCl) sendo que 100 µL de solução contendo a levedura *Cândida glabrata* NCYC 388 ou *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, foram inoculados no meio MeioYEPD-B com o auxílio de uma alça de Drigalski. Estas cepas foram utilizadas como cepas sensível e produtora de micocinas, respectivamente. Em seguida aplicou-se 5 µL da levedura teste em pontos previamente identificados. As placas foram então incubadas a 25° C durante 7 dias para verificar a produção e a resistência ou sensibilidade a micocinas. As cepas foram identificadas como produtoras de micocinas pela formação de um halo azul escuro próximo à colônia teste (Morais e cols., 1997; Pataro e cols., 1998).

### **3.4.4 – Tolerância ao estresse**

A maioria das linhagens de leveduras isoladas em alambiques artesanais mostra-se bem adaptada às condições ambientais observadas nas dornas de fermentação. Elas são capazes de crescer em condições de estresse extremo como a 37° C, em meio contendo 25% de glicose e 8% etanol (Pataro e cols., 2000).

As segregantes da cepa LBCM 427 foram submetidas a diferentes meios de cultura e temperatura para simular os parâmetros de estresse encontrados nas dornas e selecionar aquelas que sejam resistentes ou mais adaptadas. Para isso, primeiramente as cepas foram crescidas em meio YPD 2% e incubadas a 30° C por 72 horas. As cepas então foram submetidas aos seguintes meios e condições: YP glicose 20%, YP sacarose 20%, YP etanol 10% a 30°C e 37°C por 72 horas.

### **3.4.5 – Tolerância à temperatura**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Posteriormente, as leveduras foram transferidas para YP galactose 2%, YP maltose 2%, YP glicose 2%, YP glicose 20%, YP sacarose 20%, YP etanol 10%, e incubadas a 30° C e 37° C por 72 horas.

### **3.4.6 – Teste de resistência a 5,5',5"-trifluoro-DL-leucina (TFL) e Cerulenina**

#### **3.4.6.1 – Teste de sensibilidade natural a TFL**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas; após o crescimento foram transferidas por “replica plating” para placas de Petri contendo meio mínimo com glicose (2%) como fonte de carbono, suplementadas e não com 1 mM de TFL. Estas placas foram incubadas a 30° C por 72 horas. As cepas de levedura que crescem em tais condições são consideradas resistentes a TFL (Ashida e cols., 1987; Bondoni e cols., 1999; Casalone e cols., 1997; Cavaliere e cols., 1999).

#### **3.4.6.2 - Teste de sensibilidade natural a Cerulenina**

As leveduras foram inoculadas em placas contendo meio YPD 2% e incubadas a 30°C durante 72 horas. Em seguida, as leveduras foram transferidas por “replica plating” para meio mínimo contendo glicose (2%), suplementadas e não com 25 µM de cerulenina. Estas placas foram incubadas a 30° C por 72 horas. As cepas de levedura que crescem em tais condições são consideradas resistentes a cerulenina (Arikawa e cols., 2000; Ichikawa e cols., 1991)

### **3.5 - Ensaio enzimáticos**

#### **3.5.1 – Determinação da atividade enzimática da invertase**

##### **3.5.1.1 – Inoculação e crescimento das células.**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Após este período, as leveduras foram crescidas em 5 mL de meio YPD 4% e de meio YP Rafinose 2% 24 horas, a 28° C, sob agitação (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25).

Após este procedimento, uma alíquota de 50 µl da amostra em estudo e 950 µl de meio YPD 2% foi transferida assepticamente para uma cubeta para medir a DO<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro (Beckman Model DU-68). Prosseguiu-se o crescimento das leveduras até que a DO<sub>600nm</sub> atingisse uma unidade (Salgado e cols., 2002).

##### **3.5.1.2 – Preparo de extratos celulares para determinação da atividade enzimática da invertase**

Após atingir a DO<sub>600nm</sub> de uma unidade, a cultura foi centrifugada por 5 minutos, 4° C, 1000 g. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensão em 3 mL de água destilada gelada. A amostra foi novamente centrifugada; o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensão em 3mL de tampão imidazol 200 mM (Imidazol 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, KCl 400 mM, pH 7) e centrifugado nas mesmas condições. Após o último descarte do sobrenadante, adicionou-se 1 mL de tampão imidazol 50 mM (Imidazol 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, KCl 400 mM, pH 7) e 0,5 g de pérola de vidro em cada tubo. As células foram rompidas por agitação em vortex (3 X 60 segundos) com repouso em gelo nos intervalos de agitação. Após esse procedimento, adicionou-se 2,5 µl de 100 mM PMSF (Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride). O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrifuga tipo eppendorf 1,8 ml e centrifugado por 5 minutos, a 3500 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de amostra do aparelho de dosagem bioquímica (COBAS-FARA Roche®). O extrato livre de células foi estocado em temperatura de -20° C até o momento da dosagem (Salgado e cols., 2002).

### **3.5.1.3 – Dosagem da enzima invertase**

A dosagem da enzima invertase foi realizada em um aparelho de dosagens bioquímica (COBAS-FARA Roche®). Foi utilizado como substrato para a reação uma solução de sacarose 0,3 M em acetato de potássio 100 mM, pH 5,1. Após 5 minutos de incubação a 30° C, a reação era interrompida pela adição de NaOH 1 M e em seguida adicionado igual volume de HCl 1 M para neutralizar o pH da reação. Após esse procedimento, a glicose liberada foi determinada pela reação clássica de glicose-oxidase/peroxidase, tendo a ortodiansidina como reativo de cor e a leitura da absorbância feita a 546 nm. A atividade da enzima invertase foi expressa em nmoles de glicose.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup> (Celenza & Carlson, 1989; Goldstein & Lampen, 1975).

### **3.5.2 – Dosagem da atividade enzimática da $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase**

#### **3.5.2.1– Preparo do inóculo e crescimento celular**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Após o crescimento das leveduras em placas, inoculou-se 5 ml de meio YPD 2% e meio mínimo (SD) contendo glicose (2%) suplementado com 2 mM de L-Leucina. Esses tubos foram incubados por 24 horas, a 28° C, sob agitação a 200 rpm (Incubador rotatório New Brunswick Model G25). Após esse período, uma alíquota de 50  $\mu$ l da amostra em estudo e 950  $\mu$ l de meio YPD 2% foi transferida assepticamente para um cubeta de plástico para medir a DO<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro (Beckman Model DU-68). As amostras foram crescidas até atingir-se uma DO de 2 unidades (Satyanarayana e cols., 1968; Ulm e cols., 1972).

#### **3.5.2.2 – Preparo de extrato para determinação da atividade enzimática da $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase**

Após atingir a DO<sub>600nm</sub> 2, o volume total de cada amostra foi centrifugado por 5 minutos, a 4° C, 1000 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 3 mL de água destilada gelada. A amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado; as células foram ressuspensas em 3 mL de Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e novamente centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 1 mL de

Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7 e 0,5 gramas de pérolas de vidro em cada tubo. As células foram rompidas por agitação em vortex (3 X 60 segundos) com repouso em gelo nos intervalos de agitação. Após esse procedimento foi adicionado 2,5 µl de PMSF 100 mM; o sobrenadante transferido para um tubo de 1,8 mL de microcentrífuga tipo eppendorf e então centrifugado 20 minutos, a 4° C a 3.500 rpm (centrífuga Heraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de amostra do aparelho de dosagens bioquímicas (COBAS-FARA Roche®). O extrato livre de células foi estocado em temperatura de -20° C até o momento da dosagem (Ashida e cols., 1987; Kohlhaw e cols., 1969; Satyanarayana e cols., 1968; Ulm e cols., 1972; Webster & Gross, 1965).

### 3.5.2.3 – Dosagem da $\alpha$ -Isopropilmalato sintase.

A atividade da  $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase foi medida pela determinação da concentração de Coenzima A (CoA) liberada em um determinado período de tempo utilizando o 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DNTB) como reativo de cor. Uma mistura de incubação de volume final de 50 µl, de tampão Tris-HCl 50 µmoles pH 8,5 contendo 20 µmoles de KCl; 0,2 µmol de acetil-Coenzima A (acetil CoA); 1 µmol de  $\alpha$ -cetoisovalerato; e extrato celular suficiente para leitura da absorbância variar entre 0,02 a 0,2. Para verificar a retro-inibição da enzima, adicionamos à mistura de incubação 1, 2, 4, 10 e 20 mM de L-Leucina.

Após incubação a 30° C, durante 10 minutos, a reação foi interrompida com 750 µl de etanol PA. Em seguida, foi adicionado 500 µl de DTNB (DTNB 1 mM em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8). Uma alíquota foi transferida para uma cubeta de vidro e realizada a leitura em espectrofotômetro (Beckman Model DU-68) no comprimento de onda de 412 nm. A reação se mostrou linear por 15 minutos. Dos valores obtidos subtraiu-se o valor da absorbância de uma amostra sem o  $\alpha$ -cetoisovalerato na mistura reacional. A atividade da enzima  $\alpha$ -Isopropilmalato sintase assim determinada foi expressa em nmoles de  $\alpha$ -Isopropilmalato.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup> (Ashida e cols., 1987; Satyanarayana e cols., 1968; Ulm e cols., 1972).

### **3.5.3 – Dosagem de Proteínas**

A dosagem da proteína das amostras foi realizada segundo método de Lowry (Lowry e cols., 1951), usando-se soroalbumina bovina como padrão.

## **3.6 – Fermentação em escala piloto das leveduras selecionadas neste estudo**

### **3.6.1 – Preparo do Inóculo**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Após o crescimento, as leveduras foram inoculadas em 20 mL de caldo de cana diluído a 8 °Brix, e previamente esterilizado, e incubadas a 28° C por 24 horas, sem agitação mecânica. Após esse período, a alíquota foi inoculada em 100 mL de caldo de cana previamente esterilizado e diluído a 12 °Brix, e incubado a 28°C por 24 horas, sem agitação. Esta alíquota foi transferida para 1000 mL de caldo de cana previamente esterilizado, diluído a 15 °Brix, e incubado a 28° C por 24 horas sem agitação. Esta pré-cultura foi inoculada em dornas de aço inox com capacidade para 20 litros e contendo 12 litros de caldo de cana recém colhido, diluído a 15° Brix. Os parâmetros de fermentação foram acompanhados conforme pode ser observado nas figuras. Ao termino da primeira fermentação, a dorna foi novamente preenchida com 12 litros de caldo de cana recém colhido, diluído a 15 °Brix. Finalizado a fermentação, a dorna foi preenchida uma terceira e ultima vez com caldo de cana recém colhido e diluído a 15 °Brix (Figura 5). Este experimento foi realizado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, pelo doutor Paulo Henrique Alves da Silva.

### **3.6.2 - Determinação do grau alcoólico.**

A cada 0, 24, 48 e 72 horas, alíquotas de 100 mL foram coletadas do caldo fermentado e destilado (Distillatore Elettronico Enochimico Gibertini). O grau alcoólico foi determinado pelo método de densitometria em picnometro de vidro, com capacidade para 20mL. Os picnometros foram calibrados com água destilada e os dados coletados em triplicata e as análises feitas a 20°C. A partir da densidade determinou-se o grau alcoólico expresso em °GL por meio de uma tabela de conversão.

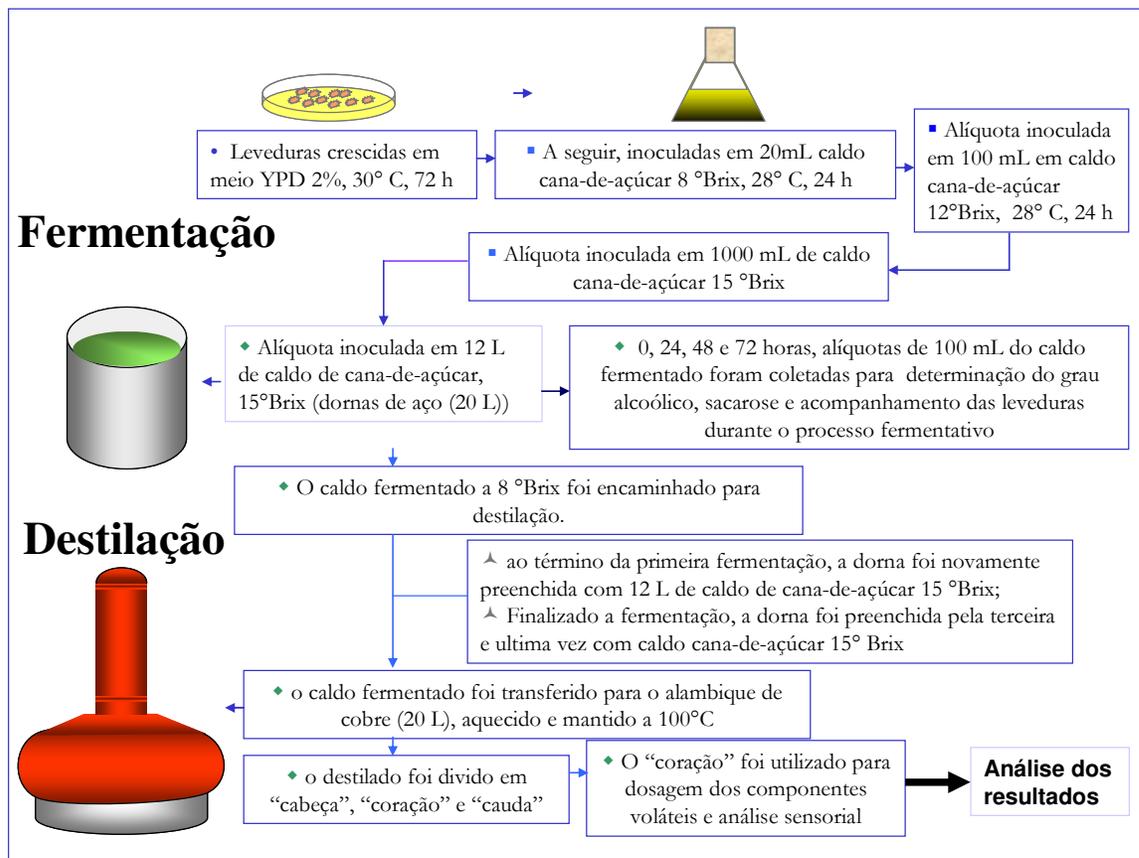


Figura 5 – Estratégia para fermentação e produção de cachaça, em escala piloto, das leveduras selecionadas.

### **3.6.3 – Determinação de sacarose**

Uma alíquota de 500 µl do caldo fermentado foi retirado a cada 0, 24, 48 e 72 horas e teor de sacarose era medido em um refratômetro. Quando a concentração do açúcar foi inferior a 8°Brix o caldo fermentado foi encaminhado para destilação em alambique de cobre como descrito no item **3.6.5**.

### **3.6.4 – Coleta de amostras para o acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo**

A cada 0, 12, 24, 48 e 72 horas, uma alíquota de 1 mL foi coletada assepticamente do caldo fermentado das diferentes dornas e transferida para tubos cônicos de polietileno de 1,8 mL, previamente identificados, adicionado de 100µl de glicerol e armazenado a -20°C. Outra alíquota de aproximadamente 200µl do caldo fermentado foi inoculada em YPD 2% e incubada a 30°C por 48 horas. Após este período, foram coletadas aleatoriamente 100 colônias de cada placa de petri e inoculada em YPD 2% e incubada a 30°C por 48 horas. Estas leveduras foram utilizadas para identificação da espécie e avaliação diversidade de cepas.

### **3.6.5 – Destilação em alambique de cobre**

O alambique de cobre com capacidade para 20 litros foi utilizado para a destilação do caldo fermentado. O caldo fermentado foi transferido para o alambique, aquecido e mantido a temperatura interna em torno de 100°C visualizado por um termômetro. A evolução da destilação em alambique de cobre foi monitorada pela dosagem do grau alcoólico utilizando um picnometro como descrito anteriormente. A destilação foi dividida em três partes: a primeira (10% que correspondem a “cabeça”) e a ultima (10% que correspondem a “cauda”) foram descartadas; a parte intermediaria (80% que correspondem ao “coração”) foi utilizada para a dosagem dos componentes voláteis da cachaça. ). Este experimento foi realizado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, pelo doutor Paulo Henrique Alves da Silva.

### 3.6.6 – Determinação dos compostos voláteis na cachaça

A determinação dos ésteres foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu 17A, com detector de ionização em chama, utilizando-se uma coluna capilar de polietileno glicol (Supelco) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura de injetor igual a 180° C, temperatura do detector igual a 200° C; fluxo de gás de arraste (Helio) 1 mL/min; vazão dos gases no detector, hidrogênio 30 mL/min e ar sintético 300 mL/min. e taxa de *split* igual a 2. A programação de temperatura do forno da coluna durante a análise cromatográfica: inicialmente a 35° C por 10 minutos e então foi levada a 200° a uma razão de 10° C/min, permanecendo a 200° C por 5 minutos. Foram feitas injeções de 1,0 µl do destilado obtido no item 4.13.5 (Boscolo e cols., 2000; Cardoso e cols., 2004; Nonato e cols., 2001).

#### 3.6.6.1 - Reagentes e Padrões para cromatografia

Foram utilizados os seguintes padrões Merck: acetato de isoamila (grau HPLC), álcool isoamílico (grau PA), etanol (grau PA), acetato de etila (grau PA), metanol (grau PA), 1-propanol (grau PA), acetaldeído (grau PA), isobutanol (grau PA) e furfural (grau PA). Foi utilizada água do Sistema de Purificação Milli-Q.

#### 3.6.6.2 - Identificação e quantificação dos compostos voláteis

Os compostos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Inicialmente os padrões foram injetados separadamente para determinar o tempo de retenção e o grau de pureza. A quantificação dos compostos nas amostras foi realizada pelo método da padronização externa.

Para determinação dos ésteres e álcoois na amostra, foi tomada uma alíquota de 1,0 mL do destilado e a solução analisada no cromatógrafo nas condições descritas anteriormente (Boscolo e cols., 2000; Nonato e cols., 2001).

### 3.6.7 – Análise sensorial da cachaça

Cada destilado recém produzido foi armazenado em frasco de vidro transparente, mantido em repouso por 1 ano e conservados em temperatura ambiente. Após este período,

as amostras foram submetidas aos testes sensoriais. As análises sensoriais das cachaças produzidas foram avaliadas por 19 provadores treinados ou consumidores contumazes. A avaliação sensorial global realizou-se segundo a escala hedônica de 9 pontos (1-desgostei extremamente/ 9-gostei extremamente). Este experimento foi realizado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, pelo doutor Paulo Henrique Alves da Silva.

### 3.7 – Reprodutividade dos resultados

Todos os experimentos foram realizados no mínimo três vezes. Para todos os resultados obtidos foram computados os valores médios com seus respectivos desvios-padrão, conforme mostram as figuras.

Quando necessário foi utilizado a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA). A PCA é uma técnica estatística de análise multivariada que transforma linearmente um conjunto original de variáveis em um conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contem a maior parte de informação do conjunto original. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de *score* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e *loadings*. O estudo conjunto de *scores* e *loadings* ainda permite estimar a influência de cada variável em cada amostra (Ferreira e cols., 1999). Os dados experimentais originais foram pré-processados pelo método de normalização de forma que todas as variáveis passam a ter a mesma importância, ou seja, o mesmo peso.

As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico *MINITAB Release 14 for Windows*.

### **3.8 - Identificação e análise do Polimorfismo molecular das cepas**

#### **3.8.1 – Preparação do DNA Genômico de leveduras**

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% e incubadas a 30° C durante 72 horas. Após este período, as leveduras foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YPD 2% até a fase estacionária, a 28° C, sob agitação de 200 rpm (New Brunswick). O volume total da cultura foi centrifugado por 5 minutos, a 4° C, 1000×g. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 0,5 mL de água destilada. Após centrifugação a 3750 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13) por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µl tampão de extração (sorbitol 1M, citrato de Sódio 100 mM, EDTA 60 mM, pH 7). A seguir, adicionou-se 100 µl de solução Lyticase 1000 U/mL (0,3 mg/mL Lyticase e 8 µl/mL β-Mercaptoetanol em tampão de extração) e agitou-se ligeiramente. Esse tubo foi incubado por 3 horas a 37° C. Após este procedimento, adicionou-se 300 µl de tampão de lise (SDS 2% em Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8), agitou-se cuidadosamente, e procedeu-se uma inubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 200 µl de NaCl 5 M e mantendo-se em gelo durante 2 horas. Ao término deste tempo, procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspense em 300 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). A seguir, adicionou-se ao tubo 400 µl de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1) promovendo-se a homogeneização em vortex por 2 minutos. Após este procedimento, o tubo foi novamente centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). Ao término da centrifugação, a camada superior foi transferida para outro tubo eppendorf previamente identificado, adicionando-se 2 volumes de etanol PA gelado. Este tudo foi deixado a temperatura de -20° C por 12 horas. Após o descongelamento, procedeu-se uma centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13); o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante o sedimento foi concentrado a vácuo (“speedvac” Savant AS 290) Após este procedimento, o DNA foi ressuspense em 60 µl de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore).

### 3.8.2 – Método de Identificação por RAPD - PCR

Para o ensaio do RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA), dois *primers* foram utilizados: EI1 (CTGGCTTGGTGTATGT) e LA1 (GCGACGGTGTACTAAC) (Pataro e cols., 2000). A reação foi procedida em um volume final de 50 µl, o qual continha 1 µl de DNA genômico (0,3 ng), 40 pmol de cada *primer*, 0,2mM de dNTP, 3 µl do tampão 10X e 2,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação passou por um passo inicial de desnaturação a 95° C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 44° C por 2 minutos e extensão a 72° C por 1,5 minutos. Depois do último ciclo houve uma extensão final a 72° C por 5 minutos. A análise do produto de RAPD-PCR foi conduzida em gel de acrilamida 6%, a 120 volts por aproximadamente 5 horas. Após a corrida o gel foi corado com prata passando por uma solução inicial de fixação (etanol 10% e ácido acético 0,5%) durante 3 minutos. Houve uma lavagem rápida com água, em seguida o gel foi deixado por 5 minutos na etapa de coloração (etanol 10%, ácido acético 0,5% e nitrato de prata 12 mM). Logo após procedeu-se nova lavagem com água durante 2 minutos. Por fim, foi utilizada a solução de desenvolvimento (NaOH 0,75 M e formaldeído 38%) até o aparecimento da cor. O gel então foi analisado e fotografado. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi usado como padrão (De Barros e cols., 1996; Pataro e cols., 2000).

### 3.8.3 – Método de Identificação por mtDNA-RFLP

#### 3.8.3.1-Preparação do DNA mitocondrial

As células foram inoculadas em 5 mL de meio YPD 2% e incubadas até a fase estacionária, a 28° C, sob agitação de 200 rpm em incubador New Brunswick Model G25. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 1.000g, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1000 µl de água milli-Q estéril. A amostra foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento celular ressuspensão em 500 µl de sorbitol 1M, EDTA 0,1M, pH 7, 5, com adição de 20 µl de solução de Lyticase (0,3 mg/mL de liticase e 8 µl /mL de β-mercaptoetanol em tampão de extração). Os tubos foram então incubados a 37° C por 3 horas e a formação dos esferoplastos foi monitorada opticamente em um microscópio. Os esferoplastos foram centrifugados a 5.000g por 5 minutos e o

precipitado ressuspensão em 500 µl de 50 mM Tris-HCl - 20 mM EDTA, pH 7,4. Em seguida foram adicionados 13 µl de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) 10%, e a mistura incubada a 65° C por 15 minutos. Imediatamente depois foram adicionados 200 µl de acetato de potássio 1M, os tubos foram colocados no gelo por 5 minutos e subsequentemente centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13) e colocados à temperatura de -20° C por 5 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf novo e o DNA foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol. Depois de incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNAm lavado com etanol 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 10.000g por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado e o DNA seco a 68° C durante 10 minutos. Após este procedimento o DNA foi ressuspensão em 30 µl de água milli-Q estéril (Lopez e cols., 2001; Querol e cols., 1992b; Querol e cols., 1992a; Querol & Barrio, 1990).

### **3.8.3.2-Digestão com enzimas de restrição**

Após a purificação do DNA como descrito anteriormente, os fragmentos foram digeridos com as enzimas *Hinf* I e *Rsa* I (Gibco BRL Life Technologies). Para tanto, foram adicionados ao tubo eppendorf de 1,8 mL, 20µl do fragmento obtido pelo método anterior, 2µl de Tampão 10X REACT 2, 1µl da enzima *Hinf* I. Em outro tubo eppendorf de 1,8 mL, foram adicionados 10µl de fragmento de DNA, 2µl de tampão 10X REACT, 1, µl da enzima *RSA* I e 8µl de água Miliq. A digestão com as enzimas de restrição foi conduzida por 2 horas a 37°C. Ao término deste tempo, o DNA foi purificado utilizando o método PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico) descrito anteriormente. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X. Após a revelação com brometo de etido (0,5µg/mL), o gel foi fotografado usando-se o sistema Sony. (Fernandez-Espinar e cols., 2001; Lopez e cols., 2001; Querol e cols., 1992b; Querol e cols., 1992a)

### 3.8.4 – Método de Identificação por COX – PCR

#### 3.8.4.1 – Condições do COX-PCR

Foi utilizado como molde amostras de DNA mitocondrial extraído de acordo com o item 3.8.3.1. O gene mitocondrial *COXI* que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase foi utilizado para análise devido à variação no número e posição de seus introns (Lopez e cols., 2003). Os introns do *COXI* foram amplificados por PCR utilizando os *primers* 3L (GCTTTAATTGGWGGWTTTGG), 3R (ATTGTCATACCATTTGTYCTYAT), 4L (GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA) e 5R (GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT). O DNA foi amplificado em um termociclador (Eppendorf-Mastercycler). A reação de amplificação continha 50 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 5 µl do tampão 10X, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 5 µl de DNAm (0,3 ng), em um volume final de 50 µl. Os parâmetros de amplificação utilizados foram: uma desnaturação inicial a 95° C por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto; anelamento a 51° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos, com extensão final a 72° C por 5 minutos. O produto de PCR foi separado em gel de acrilamida 6%, a 120 volts por aproximadamente 5 horas. Após a corrida o gel foi corado com prata como descrito anteriormente, visualizado e fotografado. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi usado como padrão.

#### 3.8.5 – Método de Cariotipagem

As células de levedura foram cultivadas em 5mL de meio YPD por 24 horas a 160 rpm, 28° C. O DNA cromossomal foi isolado como descrito por Lopes e cols (2001); lavado em tampão TE (EDTA 1 Mm, Tris-HCL 10Mm, pH 8,0) a 50° C durante 30 minutos e então lavado novamente três vezes com o mesmo tampão a temperatura ambiente, por 30 minutos. Os DNAs foram colocados em um gel de agarose (Seakem® Gold) 1% (w/v) e a corrida foi conduzida usando um sistema TAFE (transverse alternating field electrophoresis) Geneline, Beckman. As condições utilizadas foram as seguintes: voltagem constante de 250 V por 6 horas com 35 segundos pulso de tempo, seguido por 20 horas a 275 V com 55 segundos pulso de tempo a temperatura constante de 14° C (Schuller e cols., 2004). O tampão utilizado na corrida eletroforética era composto por Tris base 10m M, EDTA 0,5 mM e ácido acético 4 mM. O gel foi então corado com brometo de etídio,

visualizado e fotografado. Este experimento foi realizado na Universidade do Minho em Braga, Portugal, pelas doutoras Dorit Schuller e Margarida Casal.

### **3.9 – Isolamento e análise por sequenciamento do gene da $\alpha$ -isopropilmalato sintase**

#### **3.9.1 - Dosagem do DNA**

Uma alíquota de 5  $\mu$ l da amostra de DNA genômico, preparada conforme o procedimento descrito no item **3.8.1**, foi diluída com 950  $\mu$ l de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore). A amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo e para medir a absorbância. Sabendo-se que uma absorbância de 1 à 260 nm corresponde a uma solução contendo 50  $\mu$ g/mL de DNA calculou-se a concentração do DNA da amostra.

#### **3.9.2 – Amplificação por PCR**

A região LEU4 do DNA genômico que corresponde à região da  $\alpha$ -isopropilmalato sintase da levedura foi amplificada pela PCR utilizando-se os iniciadores IPMF (GGG GTA CCA CAA AAA GAC AAG GAA C) e IPMR (CGG AAT TCG AAT AAG TCC TGA AAT AC) (White e cols., 1990). Foram utilizadas as seguintes condições de PCR: 20 pmol de cada iniciador, 0,25 mM de dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 15 ng de DNA genômico e 0,5 U Taq DNA polimerase em volume final de 50  $\mu$ l. A mistura foi submetida a desnaturação inicial de 4 min à 94° C, seguida de 34 ciclos de 94° C por 1 min, 48° C por 1 min e 72° C por 2,20 min. A extensão final foi feita à 72° C por 10 min (Casalone e cols., 1997; Cavalieri e cols., 1999).

#### **3.9.3 – Purificação do produto de PCR**

Uma alíquota de 45  $\mu$ l do produto da PCR foi transferida para um tubo eppendorf de 1,8mL, previamente identificado, contendo 255  $\mu$ l de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore) esterilizada. A este tubo foi adicionado 300  $\mu$ l de PCI (fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico na proporção 25:24:1) e procedendo-se a homogeneização em vortex por 2 minutos. Então, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). Ao término da centrifugação, a camada superior foi transferida para outro tubo eppendorf previamente identificado, adicionando-se em seguida acetato de sódio 3 M pH

5,2 (1/10 do volume total). A este tubo foram adicionados também 2 volumes de etanol absoluto gelado e deixando-se por no mínimo 1 hora a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ao término deste tempo, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi descartado e 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% foi adicionado. Após nova centrifugação, o DNA foi seco a vácuo (“speedvac” Savant AS 290) e ressuspenso em 25  $\mu\text{l}$  de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore).

### **3.9.4 - Ligação do fragmento amplificado ao vetor plasmidial TOPO TA Cloning**

A ligação do fragmento foi feita de acordo com o manual do fabricante do kit TOPO-TA cloning (Invitrogen).

### **3.9.5 - Preparação de bactérias competentes**

Células de bactérias TOP 10F’ foram crescidas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  em placas de Petri contendo meio LB-gar suplementado com 15  $\mu\text{g}$  de tetraciclina e 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Streptomicina. O meio LB (LURIA-BERTAINI Medium) é composto por bacto-peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5% e pH ajustado para 7,5. Após o crescimento, uma colônia foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 4 mL de meio LB e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. Após este período de tempo, uma alíquota de 1 mL foi utilizada para inocular 100 mL de meio LB, sem suplementação de antibiótico, que foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante de 250 rpm (New Brunswick) até atingir um valor  $\text{DO}_{600}$  (densidade ótica) próximo de 0,8. Após este procedimento, a cultura foi transferida para um tubo polietileno cônico, com tampa, capacidade de 50 mL, e centrifugada por 10 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 40 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M e deixado em gelo durante 1 hora. Ao final deste tempo, a suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  a 1000 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M gelado. Essa suspensão celular foi aliquoteada em tubos eppendorf de 1,8 mL e adicionou-se uma concentração final de 20%(v/v) de glicerol e armazenada em temperatura de  $-75^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9.6 – Transformação de bactérias

Um tubo eppendorff de 1,8mL contendo 100 µl de células de *E. coli* competentes (ítem 4.16.4) foi mantido em gelo até o descongelamento da aliquota. Adicionou-se a este tudo 20 µl da ligação anteriormente descrita e deixada novamente no gelo por 45 minutos. Ao final deste tempo, o tubo foi colocado a 42° C por 1 minuto e uma vez mais resfriado em gelo. Adicionou-se 1 mL de meio de cultura LB e este tubo incubado a 37° C por 40 minutos. Após este procedimento, centrifugou-se todo o conteúdo a 6000 rpm por 4 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 100 µl de LB. A suspensão foi plaqueada em placas LBXIA (bacto-peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5%, agar 1,5% em pH 7,5; 100 µg/mL de ampicilina, 1 mM de IPTG e 40 µg/mL de X-Gal) e o plaqueamento foi feito com auxílio de pérolas de vidro estéreis. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37° C.

### 3.9.7 – Extração de DNA Plasmidial

As colônias brancas obtidas no procedimento anterior foram analisadas para confirmar a inserção do fragmento desejado. Para isto, as colônias foram inoculadas em tubos contendo meio 5 mL de meio LB-ampicilina e incubadas a 37° C por 24 horas. Após o crescimento, a suspensão de células foi transferida para tubos eppendorf de 1,8 mL e centrifugadas a 3500 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso com 200 µl de STET (sacarose 8%, TritonX 0,1%, EDTA 50 mM e Tris-HCl 50 mM pH 8), adicionado de 5 µl de lisozima (50 mg/mL) e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Após esta incubação, o tubo foi aquecido a 95° C por 1 minuto e em seguida centrifugado a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um eppendorf de 1,8 mL previamente identificado, adicionado de 8 µl de CTAB (Brometo de trimetil amônio 5%) e centrifugado a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13). por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 300 µl NaCl 1,2 M e homogeneizado por 1 minuto em vortex. Após este procedimento, foram adicionados 750 µl de etanol PA e o tubo deixado a temperatura de -20° C por 24 horas. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge 13), o sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial lavado com 800 µl de etanol 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 13000 rpm

por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA seco a vácuo (“speedvac” Savant AS 290). Após este procedimento, o DNA foi ressuspensão em 20 µl de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore).

### **3.9.8 – Reação de digestão do DNA utilizando a enzima de restrição *Kpn I* e *EcoR I***

Após a purificação do DNA plasmidial, este fragmento foi digerido com a enzima *Kpn I* e *EcoR*. Para tanto, foram adicionados ao tubo eppendorf de 1,8mL, 6 µl do fragmento obtido pelo método anteriormente descrito, 15 µl de água estéril, 3 µl de BSA, 1µl de RNAase, 3 µl de tampão 10X React 1 (Biolabs) e 1 µl da enzima *Kpn I* e *EcoR* (GIBCO-BRL). Essa digestão foi feita por 3 horas a 37° C. Ao término deste tempo, o DNA foi purificado utilizando o método PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico) como descrito no item 5.16.3. O produto de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X. Após revelação com brometo de etídio, o gel foi visualizado e fotografado usando-se sistema Sony®

### **3.9.9 – Sequenciamento automático de DNA**

As reações de sequenciamento foram conduzidas utilizando-se os *primers* M13 *reverse* (GGAAAAGCTATGACCATG), M13 *Forward* (CGCCAGGGTTTTCCAGT CACGAC), IPM1F *Forward* (CCTTCCTCCAAGTACAAGC), IPM3F *Forward* (CGGTGGAAGCATTAACAGG), IPM6R *reverse* (GTTCAACCACATCTAAGGAC), IPM8R *reverse* (TGGTCTTGAACGGCGCTAG), IPM9R *reverse* (ATCGAC GATCTGGTGGCCTAC), IPM10R *reverse* (ATTACGCCTATACGATAG). As amostras foram corridas em sequenciador capilar automática ABI PRISM 3100. As seqüências foram comparadas com a seqüência descrita na *Saccharomyces Genome Database* (<http://genome-www2.stanford.edu:5555/cq1-bin/blastsgd>) usando o Blast Search (Basic Local Alignment Search Tool). As seqüências foram alinhadas usando-se o programa Clustawl (<http://ebi.ac.uk/clustawl>) e traduzidas usando o programa BlastX. A percentagem de similaridade das seqüências dos fragmentos clonados com a seqüência descrita na Database foi calculada através do BLAST (White *et al.*, 1990).



## 4.1 - Identificação molecular de leveduras

### 4.1.1-Análise do Polimorfismo molecular das cepas por RAPD - PCR

Em estudo realizado por nosso grupo, desenvolvemos uma metodologia para isolar e selecionar leveduras *S.cerevisiae* para serem utilizadas na produção de cachaça (Vicente e cols., 2003; Vicente e cols., 2006). De acordo com a estratégia proposta, selecionamos a cepa LBCM 427 como a que melhor atendia aos critérios adotados: melhor adaptação a condições encontradas durante o processo de fermentação do caldo de cana, como resistência à altas concentrações de sacarose, etanol e alta temperatura, capacidade de floculação, boa capacidade de fermentação e resistência a cerulenina e TFL. Como já discutido anteriormente, a resistência a esses compostos seleciona leveduras com alto potencial de produção de álcool isoamílico e ácido caprótico, respectivamente. A cepa LBCM 422, isolada na mesma ocasião, apresenta as mesmas características exceto por sensibilidade aos compostos e por essa razão utilizada neste estudo como controle negativo para a cepa LBCM 427. Para acompanhar o comportamento destas cepas como leveduras iniciadoras na fermentação do caldo de cana no processo de produção de cachaça, se fizeram necessário avaliar técnicas de biologia molecular que melhor discriminam entre as leveduras *S. cerevisiae* e as cepas em estudo coletadas na mesma destilaria.

Em vários estudos a técnica de RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) foi utilizada para determinar o grau de polimorfismos entre as cepas de leveduras. Este método é utilizado para discriminar cepas entre as espécies presentes no processo fermentativo, bem como estudos epidemiológico e ecológico de leveduras. Tem a vantagem de ser rápido, confiável e simples permitindo identificar e monitorar a presença de leveduras iniciadoras durante a fermentação. Baseia-se no uso de *primers* (EI1 e LA1) complementares ao sítio de *splicing* dos introns. Uma vez que os introns não são essenciais para as funções gênicas, eles apresentam seqüência de motivos conservados, usados nos iniciadores para direcionamento da amplificação e altamente variáveis gerando uma diversidade utilizada como parâmetro de comparação (De Barros e cols., 1996; Guerra e cols., 2001; Pataro e cols., 2000; Plengvidhya e cols., 2004).

Para avaliar o poder desta técnica de discriminar entre as leveduras LBCM 427, LBCM 422 e selvagens presentes no processo fermentativo, coletamos em 2003 novas amostras de mosto no mesmo local de isolamento das cepas em estudo. As leveduras recém

coletadas e isoladas em meio sólido YP caldo de cana 10% ágar conforme descrito no item **3.3**. Após a incubação foram obtidas 358 leveduras das quais foram randomicamente escolhidas 35 para testes de resistência a TFL e cerulenina. As leveduras não passaram por testes de identificação, mas apenas quanto a resistência ou sensibilidade a TFL e cerulenina que foi realizado conforme descrito em **3.4.6**. As 35 leveduras foram expostas primeiramente a TFL para seleção de cepas resistentes a este composto. Deste grupo de cepas 51,4% é naturalmente resistente ao análogo como pode ser observado na Tabela 2. As leveduras também foram expostas a cerulenina para verificar resistência a esta droga. Este teste indicou que 48,5% das leveduras apresentaram resistência natural. (Tabela 2). Quando comparamos com o perfil de resistência a drogas das cepas coletadas em 2001 com as de 2003 podemos observar que há certa variação entre os dois grupos de cepas.

A partir destes testes foram escolhidas quatro cepas para caracterização molecular: R304, sensível a ambos compostos; R335, resistente a ambos compostos; R321, resistente a TFL e sensível a cerulenina; e R329, resistente a cerulenina e sensível a TFL. (Tabela 3).

Para confirmar a capacidade do método RAPD-PCR em diferenciar o gênero *Saccharomyces*, utilizamos para controle as cepas *S. paradoxus* e *S. kluyveri*. As cepas R 304, R321, R329 e R335 foram utilizadas para representar as cepas atualmente presentes na destilaria e avaliar quanto à discriminação das cepas LBCM422 e LBCM427. Também utilizamos as cepas LBCM 423 e LBCM 424 isoladas em 2001 e que apresentam características distintas quanto a resistência a cerulenina e TFL para avaliar as diferenças de perfil de bandejamento.

Como podemos observar na Figura 5, o perfil de bandejamento apresentado pelas espécies *S. paradoxus* e *S. kluyveri* se mostraram bastante diferenciados e distintos das demais cepas. As cepas LBCM422 e LBCM427 apresentaram um perfil de bandejamento idênticas porém elas diferem quanto à sensibilidade a TFL e cerulenina como é apresentado na Tabela 2. As cepas LBCM423 e LBCM424 tem perfis de bandejamento muito similares, entretanto essas mesmas cepas tem perfis completamente diferentes quanto à resistência a drogas (Tabela 3). Quando comparamos os perfis de banda de cepas coletadas no mesmo ano não encontramos diferenças de perfis de bandas entre as cepas. O mesmo acontece quando comparamos o perfil das cepas coletadas em anos diferentes, não encontrando uma região de bandejamento que possam diferenciá-las.

Tabela 2 – Perfil de resistência a TFL e Cerulenina das cepas coletadas em 2001 e 2003

Perfil de Resistência	Ano de coleta	
	2001(%)	2003(%)
Resistente a TFL e Cerulenina	37,5	20,0
Resistente a TFL e sensível a Cerulenina	18,0	31,4
Sensível a TFL e Cerulenina	26,4	25,7
Resistente a Cerulenina e sensível a TFL	18,0	22,8
Total de cepas	72	35

Tabela 3 – Perfil de Resistência da TFL e Cerulenina das cepas selecionadas para análise do perfil molecular

Ano	Levedura	Especie	Perfil de Resistencia	
			TFL	Cerulenina
2001	LBCM 422	<i>S. cerevisiae</i>	–	–
	LBCM 423	<i>S. cerevisiae</i>	–	+
	LBCM 424	<i>S. cerevisiae</i>	+	–
	LBCM 427	<i>S. cerevisiae</i>	+	+
2003	R 304	*	–	–
	R 321	*	–	+
	R 329	*	+	–
	R 335	*	+	+

\* - identificação não realizada

-- Sensível

+ - Resistente

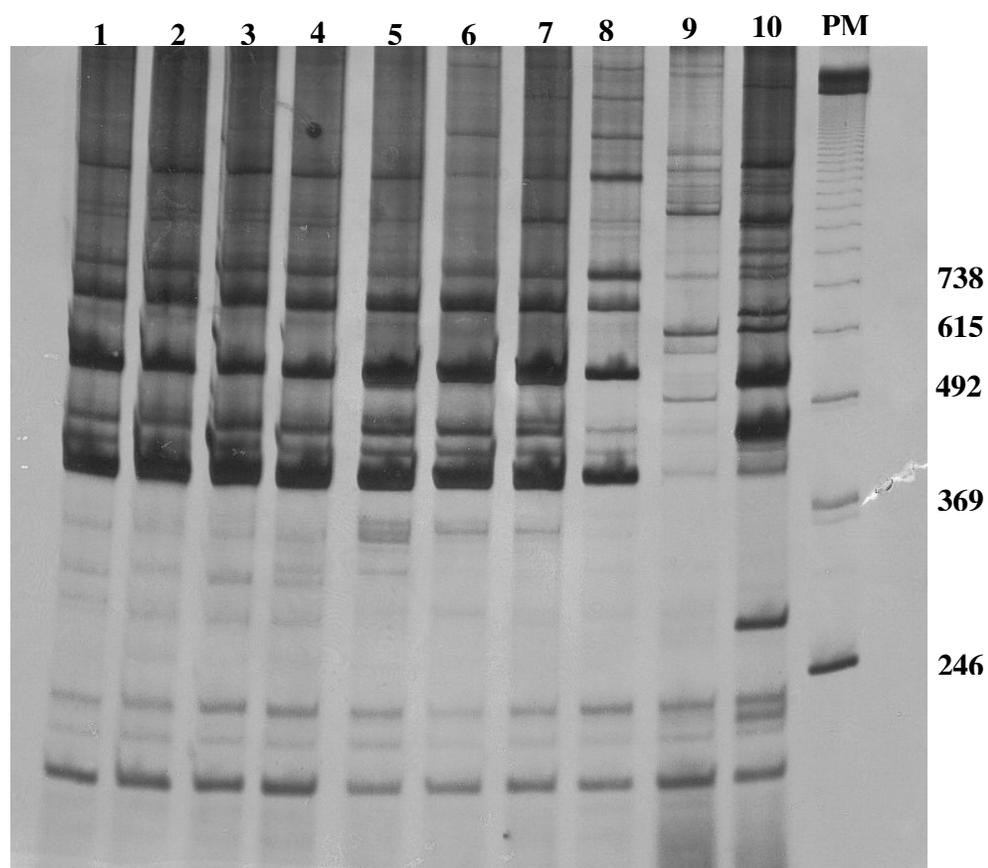


Figura 06 – RAPD-PCR das cepas de leveduras isoladas de uma destilaria artesanal de cachaça em 2003 (linhas 1 – 4) e leveduras isoladas em 2001 (linhas 5 - 8). Linhas: 1 - R304; 2 - R321; 3 - R329; 4 - R335; 5 - LBCM 422; 6 - LBCM 423; 7 - LBCM 424; 8 - LBCM 427; 9 - *S. kluyveri* ; 10 - *S. paradoxus*. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

#### 4.1.2 – Método de Identificação por mtDNA-RFLP

Em função dos resultados obtidos com o RAPD, as cepas LBCM 422 e LBCM 427 foram submetidas a outro método molecular para avaliar o poder de discriminação de linhagens iniciadoras e cepas selvagens presentes no processo fermentativo do caldo de cana na produção de cachaça. A técnica de mtDNA-RFLP tem sido muito utilizada para estudar a autenticidade de cepas comerciais de leveduras e por esse motivo foi o próximo método escolhido.

O método de mtDNA – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of mitochondrial DNA) consiste no isolamento do DNA total da levedura e o uso de endonucleases de restrição que reconhecem um grande número de sítios no DNA nuclear da levedura mas poucos sítios do DNA mitocondrial. Este método é muito utilizado para diferenciar cepas de leveduras *S. cerevisiae* além de ser descrito como eficiente para diferenciar cepas de um mesmo ecossistema (Querol e cols., 1992b). É uma técnica de fácil uso desde que as condições sejam cuidadosamente padronizadas (Beltran e cols., 2002; Fernandez-Espinar e cols., 2001; Lopes e cols., 2002; Lopez e cols., 2001; Martinez e cols., 2004; Pramateftaki e cols., 2000; Querol e cols., 1992b; Querol e cols., 1992a; Sabate e cols., 1998; Schuller e cols., 2004; Torija e cols., 2001).

A técnica proposta tem obtido sucesso na diferenciação de gênero e espécie de *Saccharomyces*. Desta forma, utilizamos as leveduras *S. cerevisiae* var. *boulardii*, *S. paradoxus*, *S. kluyverii* e *S. cerevisiae* W303 para amostra controle de gênero e LBCM422 e LBCM427 para controle de espécie para podermos avaliar assim a capacidade desta técnica em discriminar entre as cepas.

Na Figura 6 podemos observar o resultado da digestão com a endonuclease de restrição *Hinf I*, e verifica-se que as cepas LBCM422 e LBCM427 apresentaram um perfil idêntico de bandejamento. A cepa *S. cerevisiae* W303 apresentou um perfil de bandejamento bem diferenciado das demais leveduras o que pode ser evidenciado pela presença de um fragmento de 4.0Kb. A cepa da espécie *S. cerevisiae* var. *boulardii* apresenta um perfil de bandejamento bem distinto das demais, como poder ser observado na presença de fragmentos em 5.0 e 6.5Kb. As cepas *S. paradoxus* e *S. kluyverii* apresentam um perfil de bandejamento completamente diferente das demais e entre elas ocorre apenas um fragmento coincidente próximo a 3.7Kb.

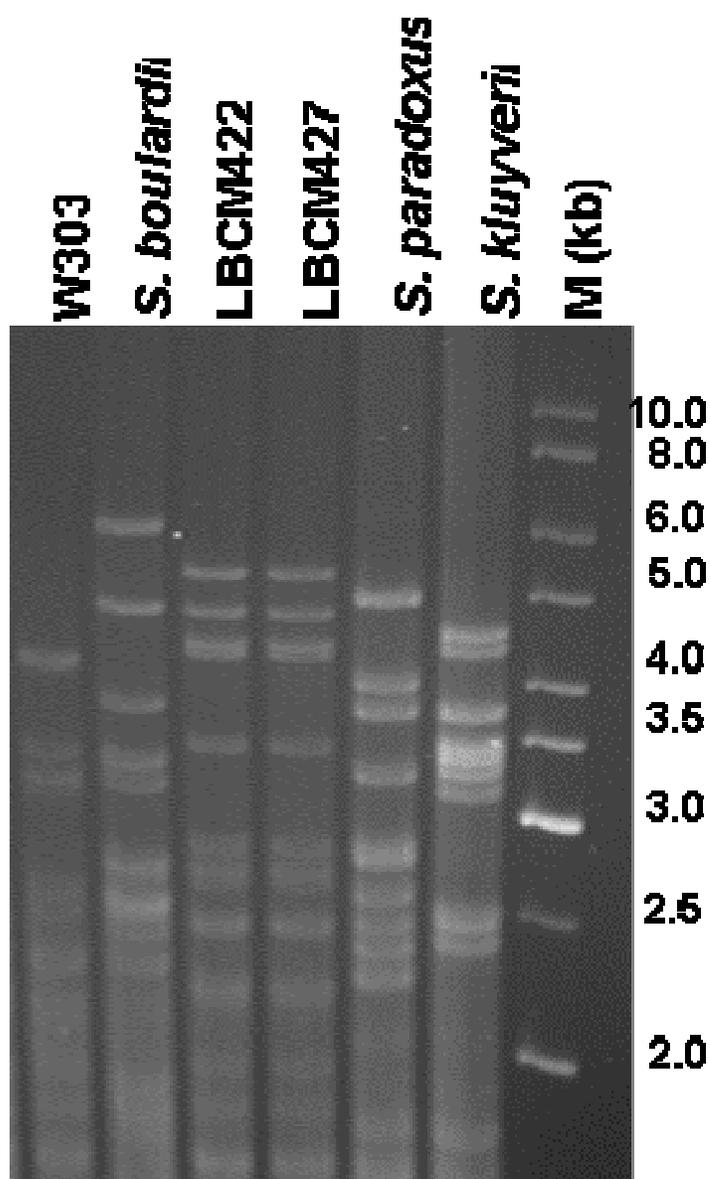


Figura 07 – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, mostrando o perfil de mtDNA-RFLP (*mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism*) das cepas LBCM 427, LBCM 422 e outras leveduras do gênero *Saccharomyces*. M representa o padrão de peso molecular.

#### 4.1.3 – Método de Identificação por COX – PCR

O sistema COX-PCR foi utilizado como outro método tentativo de acompanhamento e discriminação de linhagens de leveduras para monitorar a presença ao longo do processo fermentativo e diferenciar as cepas LBCM422 e LBCM427 entre si e das demais presentes no meio.

O COX-PCR é um método que baseia-se na variação do número e posição dos introns no gene mitocondrial COXI. Variação no íntron COXI tem sido observada entre cepas e entre espécies permitindo a diferenciação de cepas de *S. cerevisiae*. Uma reação de PCR multiplex com quatro *primers* selecionados mostrou-se muito efetivo na análise de polimorfismo de leveduras selvagens e comerciais para uso na fermentação do vinho (Lopez e cols., 2003).

A Figura 7 mostra o resultado da reação de amplificação com os 4 *primers* mencionados em Lopez e cols, 2003. No resultado para a cepa da espécie *S. paradoxus* podemos observar a presença de duas bandas, uma de aproximadamente 450 pb e outra com cerca de 1230 pb e na espécie *S. kluyverii*, a qual é diferente das demais cepas, observamos apenas uma banda de aproximadamente 500 pb.

Como podemos observar, a cepa LBCM 422 apresenta três fragmentos de aproximadamente 370 pb, 480 pb e 740 pb, sendo que esta última parece que a diferencia das cepas LBCM 423, LBCM 424 e LBCM427. Estas cepas mostraram um perfil de bandeamento com grande similaridade porem apresentam resultados distintos quando expostas a TFL e cerulenina (Tabela 3). Quanto às cepas R304, R321, R329 e R335 também apresentaram um perfil de bandeamento muito pouco diferenciado entre si porem tem perfis de resistência a TFL e cerulenina distintos (Tabela 3). Quando comparamos em conjunto as cepas coletadas em 2001 e 2003 podemos encontrar fragmentos que as diferenciam, porem entre elas há grande variedade de comportamento quanto a resistência a drogas.

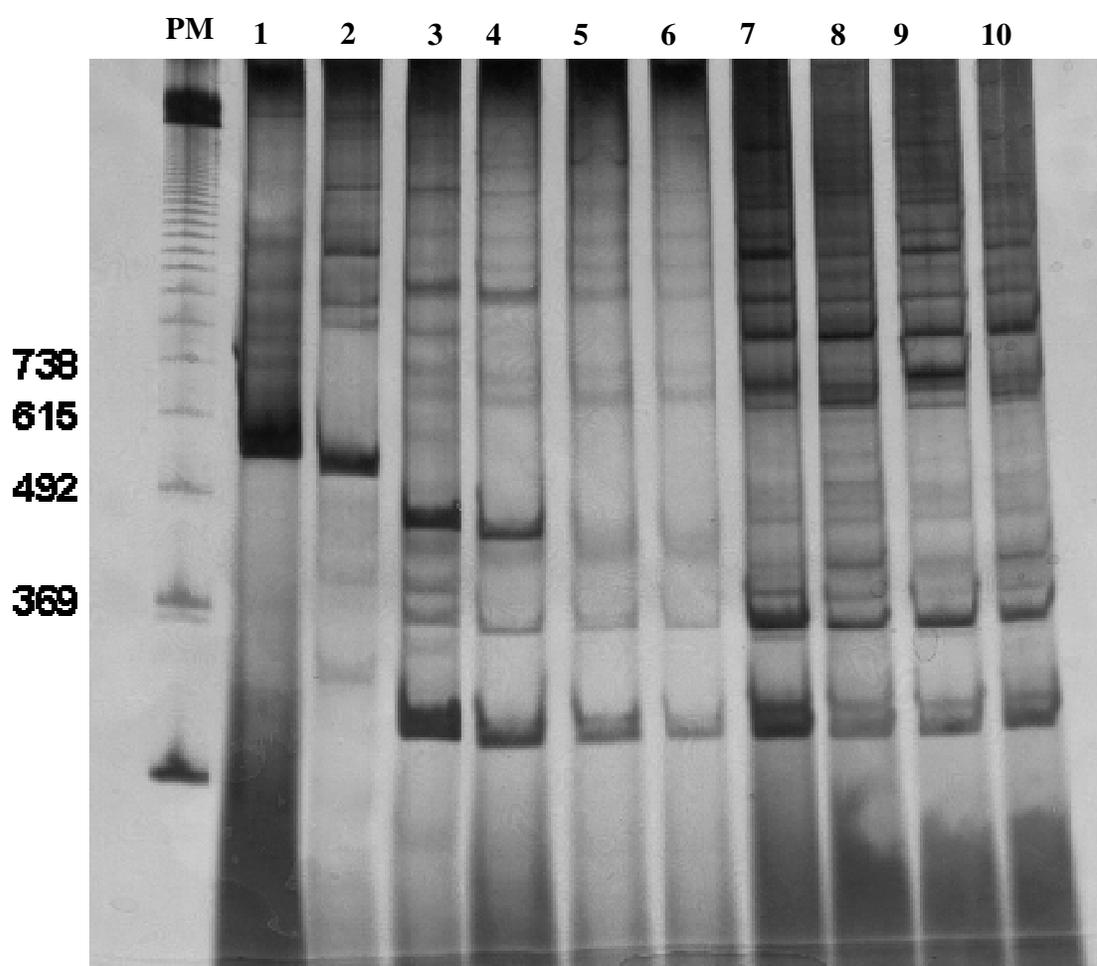


Figura 08 – COX-PCR das cepas de *S. cerevisiae* isoladas de uma destilaria artesanal de cachaça em 2001 (linhas 3 – 6) e 2003 (linhas 7-10). Linhas: 1 - *S. kluyveri*; 2 - *S. paradoxus*; 3 - LBCM 422; 4 - LBCM 423; 5 - LBCM 424; 6 - LBCM 427; 7 - R304; 8 - R321; 9 - R329; 10 - R335. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen)

#### **4.1.4 – Método de Cariotipagem**

O método de cariotipagem mostra-se muito eficiente para discriminar entre cepas geneticamente relacionadas. Tendo sido usado como método de escolha para verificar rearranjos cromossomais. Além disto, tem sido sendo também muito útil para identificação de cepas. Entretanto esta técnica é muito laboriosa e complicada para o uso rotineiro na indústria (Schuller e cols., 2004).

A aplicação desta técnica em nossas cepas de leveduras possibilitou uma clara diferenciação de cada cepa pelo perfil cromossomal específico. Como mostrado na Figura 8, cada cepa de levedura apresentou um perfil de bandeamento distinto demonstrando que há uma grande diversidade genética entre as cepas analisadas. Mesmo as cepas utilizadas na produção de cachaça e selecionadas pelos mesmos critérios bioquímicos, apresentaram fragmentos de tamanhos diferentes, comprovando que há um grande polimorfismo molecular entre as cepas utilizadas no processo fermentativo da cachaça.

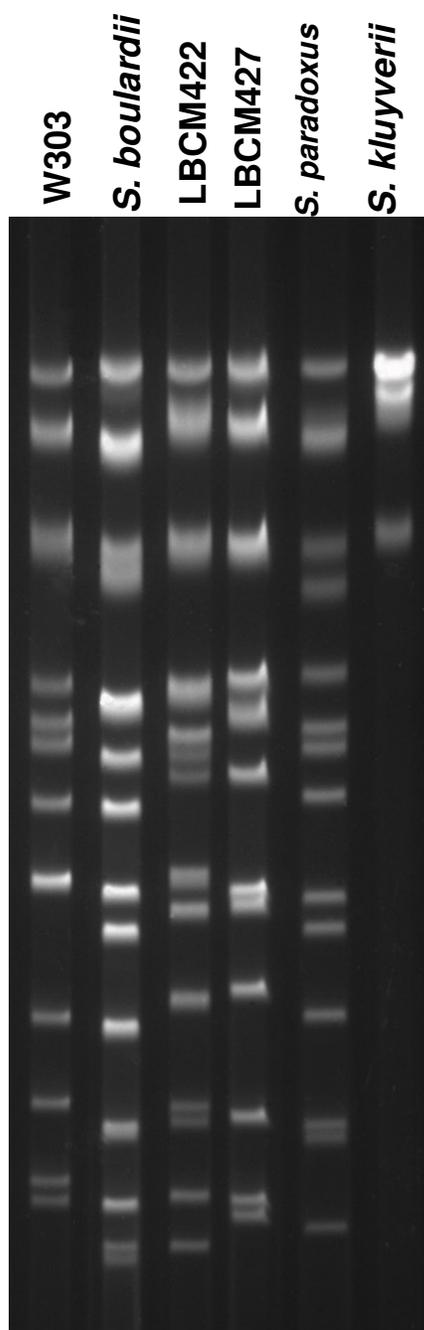


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, utilizando um sistema TAFE (*transverse alternating field electrophoresis*), mostrando o perfil do cariótipo de diferentes espécies *S. cerevisiae* (W303 e *S. cerevisiae* var. *boulardii*), *S. paradoxus* e *S. kluyveri*. Este experimento foi realizado na Universidade do Minho em Braga, Portugal pelas doutoras Dorit Schuller e Margarida Casal.

## 4.2 – Segregantes da cepa parental LBCM 427

### 4.2.1 – Estudo das cepas segregantes

A manipulação genética de cepas de *S. cerevisiae* é de grande importância para elucidar mecanismos moleculares e fisiológicos deste microrganismo, e tem sido usada para melhorar o desempenho das cepas utilizadas na indústria alimentícia e de bebidas. Para o melhoramento genético de cepas vários caminhos podem ser seguidos, dentre eles a seleção de cepas variantes ou mutantes para uma dada característica ou fenótipo. Desta forma, avaliamos a possibilidade de obter cepas variantes utilizando a técnica de esporulação da cepa LBCM 427. Esta técnica é muito utilizada para o estudo genético e caracterização de cepas utilizadas em laboratório (Gimren-Alcaniz & Matallana, 2001).

Para analisar uma cepa segregante de *S. cerevisiae* é necessário considerar a habilidade de a cepa produzir uma razoável frequência de ascos e da viabilidade de ascósporos. A viabilidade é definida como a habilidade do esporo produzir uma colônia visível dentro de 2 a 5 dias de incubação a 30°C. (Johnston e cols., 2000; Marullo e cols., 2004; Romano e cols., 1998; Sipiczki e cols., 2004). O índice de esporulação da cepa parental LBCM427 mostrou-se alto (>50% de ascos viáveis) (Tabela 4). De acordo com esses resultados, o grupo que apresentou viabilidade de quatro esporos foi escolhido para a análise da estabilidade e caracterização fisiológica das cepas.

O grupo selecionado de cepas segregantes foi submetido a metodologia de seleção de leveduras com características apropriadas a produção de cachaça proposto por nosso laboratório, que teve como objetivo avaliar a estabilidade fisiológica em algumas condições similares as encontradas nas dornas de fermentação da cachaça como o crescimento a 37° C, etanol 8% e glicose 50% (Pataro e cols., 2000). As 40 cepas segregantes foram avaliadas sob os seguintes parâmetros: resistência a TFL e cerulenina; floculação; capacidade de produção de micocinas (*Killer*); não produção de H<sub>2</sub>S; crescimento em YPD 2% 30° C, YP sacarose 20%, YPD 20%, YP galactose 2%, YP maltose 2% e YP etanol 10% incubadas a 30° C e 37° C. Para avaliar a estabilidade fisiológica as cepas segregantes foram crescidas em meio YPD 2% e incubadas a 30° C e 37° C por 48 horas (então denominada geração F1). Ao final deste período as cepas foram submetidas aos testes mencionados anteriormente por réplica *plating*. As cepas segregantes da geração F1 foram repassadas para o meio YPD2% nas mesmas condições anteriores originando a geração F2 e assim

Tabela 4 – Resultado da segregação da cepa parental LBCM427

N° ascos dissecados	Viabilidade esporos/ascos					% viabilidade	Total de esporos viáveis
	4	3	2	1	0		
36	10	5	13	7	1	61,1	88

sucesivamente. A geração F1, F4 e F6 foram submetidas aos testes e os resultados podem ser observados na Tabela 5.

Como podemos observar na Tabela 5, não encontramos cepa segregante que tenha reunido todas essas características ao mesmo tempo. O grupo de segregantes apresentou um comportamento variado de crescimento ao longo dos testes. Apenas o segregante RB 23A manteve a característica de resistência aos compostos TFL e cerulenina concomitantemente e por essa razão foi escolhido para os testes de fermentação em caldo de cana.

Para analisar o comportamento das segregantes aos testes de estabilidade, utilizamos Análise de Componentes Principais (PCA). Como podemos observar na Figura 9, a análise de PCA reúne as segregantes em três grupos que corresponde as gerações F1, F4 e F6 respectivamente. As duas primeiras componentes explicam juntas 84,77 % da variância dos dados na análise das segregantes. A análise do grupo de tétrades utilizando como banco de dados os resultados destas cepas quando expostas a todos os testes revelou uma mudança de perfil de similaridade de respostas frente aos testes citados (Figura 9). As leveduras da geração F1, F4 e F6 estão localizadas em diferentes quadrantes o que indica respostas heterogêneas de geração para geração e similaridade entre as segregantes da mesma geração. Portanto, essas segregantes demonstram uma tendência a instabilidade fisiológica frente a um mesmo teste ao longo das gerações.

Na PCA, os vetores indicam a importância de cada variável para explicar as variações entre as amostras. Vetores com medidas distantes de zero, correspondem a variações com maior influência sobre o valor do componente, enquanto que, vetores mais próximos de zero, indicam que correspondem a uma variável com pequena influencia sobre o componente. Na primeira componente (PC1 73,59%) a variável com menor peso atribuído foi a YP Galactose 2% 37°C (GAL2F37) e de maior peso a floculação (FLOC). Na segunda componente (PC2 11,18%), YP glicose 2% 30°C (G2F30) foi a variável com maior e YP glicose 20% 37°C (GLI20F37) com menor peso.

Tabela 5 – Avaliação bioquímica e fisiológica das cepas segregantes

Cepas	Crec.	Killer		Prod H2S	Atividade Invertase	Resistencia a TFL				Resistencia a Cerulenina				FLOC YPD2%			
		C	S			F1	F2	F4	F6	F1	F2	F4	F6	F1	F4	F6	
RB-5A	+	-	-	-	1574	S	S	S	S	S	R	R	R	R	+	-	+
RB-5B	+	-	-	-	1563	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	+
RB-5C	+	-	-	-	1182	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	+
RB-5D	+	+	+	-	1346	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	+
RB-7A	+	-	+	-	2742	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+
RB-7B	+	-	+	-	16045	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+
RB-7C	+	-	+	-	2654	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+
RB-7D	+	-	-	-	2927	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+
RB-8A	pobre	-	-	-	5468	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-
RB-8B	+	-	+	-	1971	R	S	R	R	R	R	R	R	R	-	-	+
RB-8C	pobre	-	-	-	8280	R	S	S	R	S	R	R	R	R	+	-	+
RB-8D	+	-	+	-	2456	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+
RB-14A	+	-	-	-	2065	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	-
RB-14B	+	-	+	-	1348	S	R	R	R	S	S	S	S	S	-	-	-
RB-14C	+	-	+	-	1063	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-
RB-14D	+	-	-	-	1598	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-
RB-18A	pobre	-	-	-	3122	S	S	S	S	S	S	R	S	S	-	-	-
RB-18B	+	-	-	-	4415	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-
RB-18C	pobre	-	-	-	7321	S	S	S	S	S	R	S	S	S	+	-	+
RB-18D	pobre	-	-	-	26326	S	S	S	S	S	R	R	R	R	+	-	+
RB-23A	+	-	+	-	1199	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
RB-23B	pobre	-	-	-	11506	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+
RB-23C	+	+	+	-	1618	R	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	-
RB-23D	pobre	-	-	-	7340	S	S	S	S	S	S	R	R	R	+	-	+
RB-26A	+	-	+	-	1827	R	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-
RB-26B	+	-	+	-	1901	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-
RB-26C	+	-	+	-	772	R	S	S	S	S	S	R	R	R	+	-	+
RB-26D	pobre	-	-	-	20730	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	-
RB-27A	+	-	+	-	1202	R	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	+
RB-27B	+	-	+	-	879	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+
RB-27C	+	-	+	-	1403	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+
RB-27D	+	-	+	-	1241	R	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	+
RB-31A	pobre	-	-	-	4607	S	S	S	S	S	S	S	R	+	+	+	
RB-31B	+	-	+	-	1763	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+
RB-31C	+	+	+	-	1357	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+
RB-31D	+	+	+	-	1072	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-
RB-36A	+	-	+	-	1795	R	S	S	S	S	S	R	R	R	+	+	-
RB-36B	pobre	-	-	-	3289	S	S	S	S	S	S	S	R	+	-	+	
RB-36C	pobre	-	-	-	3472	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+
RB-36D	+	+	+	-	495	R	S	S	S	S	S	S	R	+	-	+	

Crec – crescimento

Floc – Floculação

Killer – produção de micocinas

C - *Cândida glabrata* NCYC 388S - *S. cerevisiae* NCYC 1006Atividade invertásica - (nmoles glicose.mim<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>)Prod H<sub>2</sub>S – produção de H<sub>2</sub>S

F1, F2, F4 e F6 – número de passagens das cepas

R – resistente

S – sensível

- - ausência de crescimento

+ - crescimento

Tabela 5 – Avaliação da estabilidade fisiológica das cepas segregantes (continuação)

Cepas	YP GALACTOSE 2%						YP MALTOSE 2%						YP GLICOSE 2%						
	F1		F4		F6		F1		F4		F6		F1		F4		F6		
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	
RB-5A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-5B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-5C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-5D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-7A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-7B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-7C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-7D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-8A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-8B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-8C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-8D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-14A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-14B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-14C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-14D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-18A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-18B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-18C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-18D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-23A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-23B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-23C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-23D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-26A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-26B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-26C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-26D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-27A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-27B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-27C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-27D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-31A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-31B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-31C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-31D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-36A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-36B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-36C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RB-36D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

F2, F4 e F6 – número de passagens das cepas

30°C e 37°C – temperatura a que foi submetida a levedura

- - ausência de crescimento

+ - crescimento

Tabela 5 – Avaliação da estabilidade fisiológica das cepas segregantes (continuação)

Cepas	YP GLICOSE 20%						YP SACAROSE 20%						YP ETANOL 10%						
	F1		F4		F6		F1		F4		F6		F1		F4		F6		
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	
RB-5A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	
RB-5B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
RB-5C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
RB-5D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
RB-7A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
RB-7B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-7C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-7D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-8A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-8B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	
RB-8C	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	
RB-8D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	
RB-14A	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-14B	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-14C	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	
RB-14D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-18A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-18B	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-18C	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-18D	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-23A	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-23B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RB-23C	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
RB-23D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RB-26A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
RB-26B	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RB-26C	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-26D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
RB-27A	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-27B	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
RB-27C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RB-27D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
RB-31A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
RB-31B	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
RB-31C	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
RB-31D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
RB-36A	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
RB-36B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
RB-36C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
RB-36D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-

F2, F4 e F6 – número de passagens das cepas

30°C e 37°C – temperatura a que foi submetida a levedura

- - ausência de crescimento

+ - crescimento

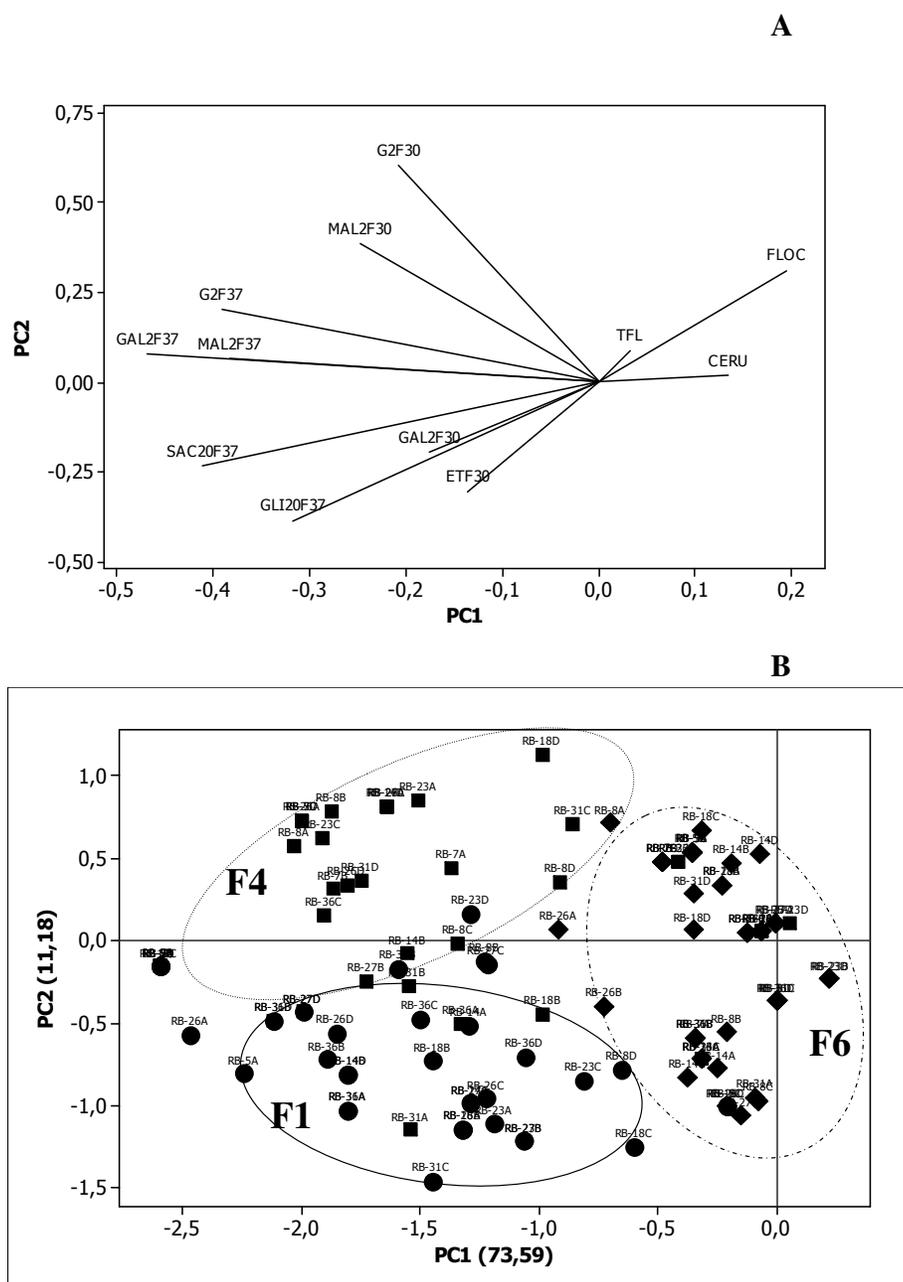


Figura 10 - Análise de Componentes Principais (PCA) correspondendo a respostas das cepas segregantes quanto à estabilidade fisiológica. Painel A: *Loadings*. Painel B: *Score*: F1, F4 e F6 correspondem as gerações 1, 2 e 3 respectivamente.

#### 4.2.2 – Atividade da enzima $\alpha$ -isopropilmalate Sintase

As leveduras resistentes ao análogo da L-leucina apresentam a enzima  $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase ( $\alpha$ -IPM) insensível a retro-inibição por L-leucina, como demonstrado por nosso grupo (Vicente e cols., 2006). Assim sendo, foram medidas as atividades da  $\alpha$ -IPM nas cepas LBCM 422, LBCM 427, RB 23A e RB 8C. A segregante RB 8C apresentou instabilidade quanto a resposta de resistência a TFL e por esta razão foi incluída no teste.

Como podemos observar na Figura 10, a atividade da  $\alpha$ -IPM medida a partir da cepa LBCM 427, não é inibida por baixas concentrações de L-leucina, e sendo parcialmente inibida (20%) em altas concentrações de L-leucina (20 mM). Já na levedura LBCM 422, a enzima apresentou-se insensível até a concentração de 10 mM de L-leucina, mas na concentração de 20 mM de L-leucina encontra-se inibida (60% de inibição).

A  $\alpha$ -IPM encontrada na levedura RB 23A não é inibida por L-leucina. Como demonstrado na Figura 10, a atividade da  $\alpha$ -IPM nesta cepa não é inibida, pelo contrário, observa-se uma estimulação da atividade em baixas concentrações de L-leucina (2 a 10 mM), e em altas concentrações de L-leucina (20mM) sua atividade está aumentada em 10% quando comparada com aquela obtida na ausência de L-leucina. Por outro lado, a levedura RB 8B não é inibida por baixas concentrações de L-leucina, sendo parcialmente inibida (20%) em altas concentrações de L-leucina (20 mM).

#### 4.2.3 – Análise da seqüência nucleotídica dos genes codificantes da $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase

As leveduras resistentes ao análogo do aminoácido L-leucina apresentam a enzima  $\alpha$ -Isopropilmalato Sintase insensível a retro-inibição por L-leucina e isso pode estar associado a mutações que causam essa perda de sensibilidade. O gene LEU4 codifica para a

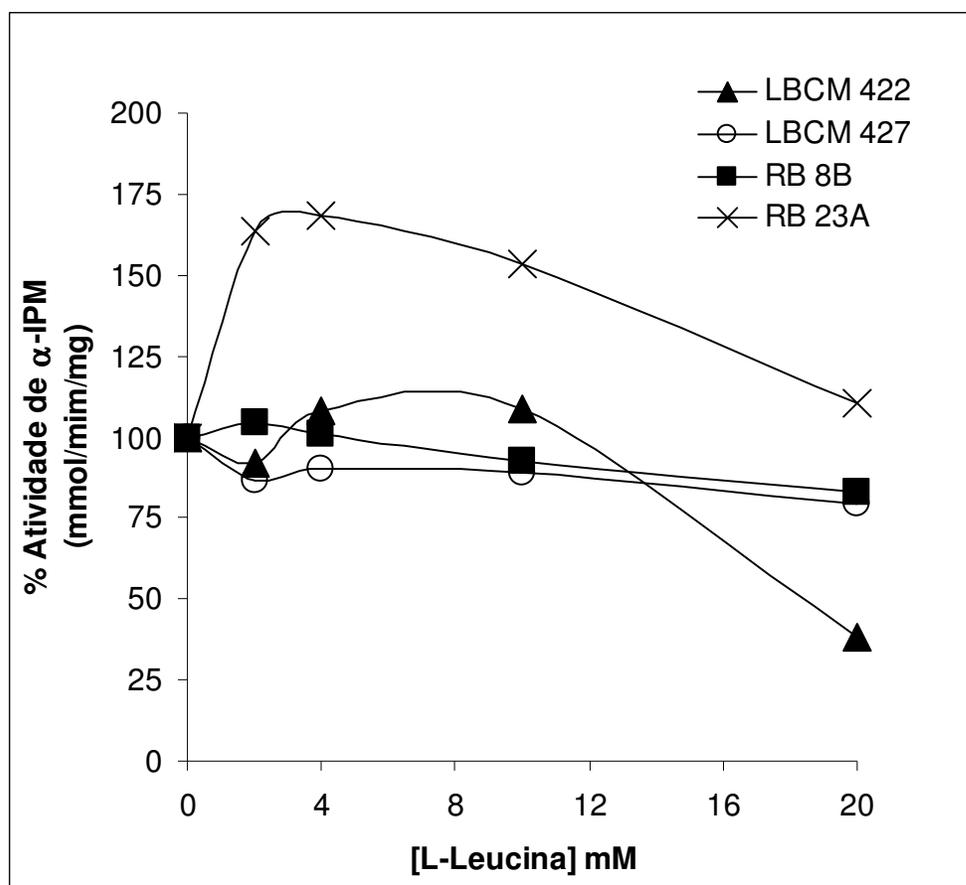


Figura 11 - Atividade da enzima  $\alpha$ -IPM nas cepas de *S. cerevisiae* LBCM 427, LBCM 422, RB 8B e RB 23A. As células foram crescidas em meio mínimo, suplementado com glicose (2%) e L-leucina (2 mM), por 24 horas, a 28° C, sob agitação. A atividade da  $\alpha$ -Isopropilmalato sintase foi medida no extrato celular, determinando-se a concentração de Coenzima A (CoA) liberada em um determinado período de tempo utilizando o 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DNTB) como reagente de cor. Para verificar a retro-inibição da enzima, adicionamos a mistura de incubação 1, 2, 4, 10 e 20 mM de L-Leucina.

enzima  $\alpha$ -isopropilmalato sintase que catalisa a conversão de 2-cetoisovalerato em  $\alpha$ -isopropilmalato na via biossintética da leucina. Esse gene codifica uma das duas enzimas responsáveis pela síntese de  $\alpha$ -IPM descritos em *S. cerevisiae*:  $\alpha$ -IPM sintase I e II responsáveis por 80% e 20% do total de atividade da enzima segundo Kohlhaw, 2003.

Segundo Cavalieri e cols., 1999 e Oba e cols., 2005 mutações no gene LEU4 podem ser responsáveis pela perda da inibição por *feedback* da leucina. Segundo esses autores, mutações dos aminoácidos Gly514Asp, Gly516Asp, Ser519Thr, Glu540Lys, His541Pro, SerSer547/8Ser, Ala552Thr e Asp578Tyr localizadas próximo ao sítio de ligação da enzima levariam a mudança na conformação dificultando a ligação da leucina.

Para verificar a presença de mutações no gene LEU4 das cepas resistentes a TFL, as cepas RB 23A e RB 8B foram seqüenciadas para esse gene. Inicialmente os genes foram amplificados por PCR usando-se primers específicos e os genes foram sequenciados usando os *primers* M13 *reverse* (GGAAAAGCTATGACCATG), M13 *Forward* (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC), IPM1F *Forward* (CCTTCCTCCAAGTACAAGC), IPM3F *Forward* (CGGTGGAAGCATTAAACAGG), IPM6R *reverse* (GTTCAACCACATCTAAGGAC), IPM8R *reverse* (TGGTCTTGAACGGCGCTAG), IPM9R *reverse* (ATCGAC GATCTGGTGGCCTAC), IPM10R *reverse* (ATTACGCCTATACGATAG).

A análise comparativa da seqüência de nucleotídeos da cepa RB 23A, através do programa BLAST-N, apresentou 99% de identidade com a seqüência LEU4 como é observado na Figura 11. Esta seqüência apresentou trocas de nucleotídeos nas posições 441(A→G), 709(T→C), 746(A→G), 865(A→G), 939(G→A), 1230(G→C) e 1826(T→C). Quando realizamos a tradução desta seqüência e analisamos comparativamente com a proteína codificada pelo gene LEU4, encontramos identidade de 99% como pode ser observado na Figura 12. Apenas as mudanças de nucleotídeos nas posições 709, 746 e 1826 resultaram em mutação de aminoácido enquanto as demais não foram observadas alteração do aminoácido quando comparado a seqüência traduzida de LEU4.

Em consequência das mutações encontradas ocorreram mudanças quanto a característica dos resíduos de aminoácidos. A mutação encontrada na posição 237 do aminoácido, que corresponde a região 709 de nucleotídeo, observamos a troca de Isoleucina (I) por Valina (V, Val) que apresentam cadeia lateral alifática, não polar. Em outra mutação,

```

Query: 1860   TTATGCAGAGCCAGATGCCGAGCATTCTTACCTCCGACCTCGGCCAAAGATGGAATGGA 1801
            |
Sbjct: 424897 TTATGCAGAGCCAGATGCCGAGCATTCTTACCTTCGACCTCGGCCAAAGATGGAATGGA 424956

Query: 1800   CACATCACCAGAATGGATAATATTGTTAATGGTGGCAAAGATGGCTCTCACTGAAGAATC 1741
            |
Sbjct: 424957 CACATCACCAGAATGGATAATATTGTTAATGGTGGCAAAGATGGCTCTCACTGAAGAATC 425016

Query: 1740   ACCGACATCTTCGGAGACACCTACACCCCATTTGTAGGCCTTTTCGTTGTCGGCATTACG 1681
            |
Sbjct: 425017 ACCGACATCTTCGGAGACACCTACACCCCATTTGTAGGCCTTTTCGTTGTCGGCATTACG 425076

Query: 1680   CCTATACGATAGATGGATGTAAGAAGCAGCTTGCCTAGAAGAACCAGAACCTAGAGAATG 1621
            |
Sbjct: 425077 CCTATACGATAGATGGATGTAAGAAGCAGCTTGCCTAGAAGAACCAGAACCTAGAGAATG 425136

Query: 1620   CTCTGTGTAGTTTGCTACGGCAAATCTCACGTTCAACAAGTTTGATAGGGCGTCGACCAA 1561
            |
Sbjct: 425137 CTCTGTGTAGTTTGCTACGGCAAATCTCACGTTCAACAAGTTTGATAGGGCGTCGACCAA 425196

Query: 1560   AGAAGAGATTGGACCATTACCTGTACCTTCAATATCGACGATCTGGTCGCCTACTTTGAC 1501
            |
Sbjct: 425197 AGAAGAGATTGGACCATTACCTGTACCTTCAATATCGACGATCTGGTCGCCTACTTTGAC 425256

Query: 1500   TTGACCAGTGAACACTCTACGTTTCAGTGCCGAATTTTCAACATTATAAATTGACTAAACT 1441
            |
Sbjct: 425257 TTGACCAGTGAACACTCTACGTTTCAGTGCCGAATTTTCAACATTATAAATTGACTAAACT 425316

Query: 1440   AATAGCTTGGTACTGTTTCGTCATTGTAGTTGTAAGCCTCTTTGAATAACTTGGAAATCTC 1381
            |
Sbjct: 425317 AATAGCTTGGTACTGTTTCGTCATTGTAGTTGTAAGCCTCTTTGAATAACTTGGAAATCTC 425376

Query: 1380   ATCTGATTTTAGTTCTCTACCCAAGGAGTCAGCATGGTCTTGAACGGCGCTAGAAAATTC 1321
            |
Sbjct: 425377 ATCTGATTTTAGTTCTCTACCCAAGGAGTCAGCATGGTCTTGAACGGCGCTAGAAAATTC 425436

Query: 1320   GATTGTCATGTTTCTTGGTAGATCCAACCACAAAGATCTCAAATAACCCAAGCGGCACC 1261
            |
Sbjct: 425437 GATTGTCATGTTTCTTGGTAGATCCAACCACAAAGATCTCAAATAACCCAAGCGGCACC 425496

Query: 1260   ACCTTTACCAGACTGAGAGTTGACTCTGATCACAGCTTCGTAATCACGGCCAATGTCCTT 1201
            |
Sbjct: 425497 ACCTTTACCAGACTGAGAGTTGACTCTGATGACAGCTTCGTAATCACGGCCAATGTCCTT 425556

Query: 1200   TGGATCCAATGGCAAGTATGGGATTCTCCATTGAGTTTCACCTTACGACGCTTCTTGTT 1141
            |
Sbjct: 425557 TGGATCCAATGGCAAGTATGGGATTCTCCATTGAGTTTCACCTTACGACGCTTCTTGTT 425616

```

Figura 12 – Análise comparativa, feita através do programa BLAST, da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 23A, com a seqüência do gene LEU4 descrita no *Saccharomyces cerevisiae Genome Database*. As substituições nas bases estão indicadas em negrito.

Query: 1140 TTGTAAGTTGAAACCCCTTCTTAATGGCGTCTTGGTGAGAACCGGAAAAGGCACAAACGAC 1081  
 |||  
 Sbjct: 425617 TTGTAAGTTGAAACCCCTTCTTAATGGCGTCTTGGTGAGAACCGGAAAAGGCACAAACGAC 425676

Query: 1080 CAAGTCACCGCGTATGGTGTCTTTGCGATACTGGGATCTTATTACAACGCTCAACCAC 1021  
 |||  
 Sbjct: 425677 CAAGTCACCGCGTATGGTGTCTTTGCGATACTGGGATCTTATTACAACGCTCAACCAC 425736

Query: 1020 ATCTAGGACAGAGGTCAAGTCAGAGAAATCCAAATTAGGAGAAACACCTTGGGTATACAT 961  
 |||  
 Sbjct: 425737 ATCTAGGACAGAGGTCAAGTCAGAGAAATCCAAATTAGGAGAAACACCTTGGGTATACAT 425796

Query: 960 ATTCATAGCAACAGTAACCAA**A**TCCACATTACCTGTACGTTACCATTACCAAAGAGACA 901  
 |||  
 Sbjct: 425797 ATTCATAGCAACAGTAACCAA**G**TCCACATTACCTGTACGTTACCATTACCAAAGAGACA 425856

Query: 900 TCCTTCTACACGGTCGGCACCTGCAAGCATACTTA**G**CTCTGTGGCGGCACACCGCAACC 841  
 |||  
 Sbjct: 425857 TCCTTCTACACGGTCGGCACCTGCAAGCATACTTA**A**CTCTGTGGCGGCACACCGCAACC 425916

Query: 840 ACGGTCATTGTGACAATGTGTAGAGATGCAAACCTTCTCACGCTCAGTAATATGGGTAGC 781  
 |||  
 Sbjct: 425917 ACGGTCATTGTGACAATGTGTAGAGATGCAAACCTTCTCACGCTCAGTAATATGGGTAGC 425976

Query: 780 GAAGTATTCAATCTGATCAGCATAAACATTTGGAG**G**GGCAACTTCTACGGTAGCAGGTAA 721  
 |||  
 Sbjct: 425977 GAAGTATTCAATCTGATCAGCATAAACATTTGGAG**A**GGCAACTTCTACGGTAGCAGGTAA 426036

Query: 720 GTTGAAAATGA**C**TGGATTTTCCTCGGTAGGTTCCCAAGCCTTCTTAACAGCTTCGCAAAAT 661  
 |||  
 Sbjct: 426037 GTTGAAAATGA**T**TGGATTTTCCTCGGTAGGTTCCCAAGCCTTCTTAACAGCTTCGCAAAAT 426096

Query: 660 TTCTACAGCAAATTCACCTGGAGTATCACTGAAACATTCGGGGGAAAACATAGGACCA 601  
 |||  
 Sbjct: 426097 TTCTACAGCAAATTCACCTGGAGTATCACTGAAACATTCGGGGGAAAACATAGGACCA 426156

Query: 600 ACGAGTGGCTTGTGGGAAGGGTCATCCTTAGTTAGTTTCCTAACTAGTTTGGTGGCCTC 541  
 |||  
 Sbjct: 426157 ACGAGTGGCTTGTGGGAAGGGTCATCCTTAGTTAGTTTCCTAACTAGTTTGGTGGCCTC 426216

Query: 540 TACTGCCTTGAAAATAGCTTCCTCTCTAGACATATTA AAAACAATTCACGGAACATATC 481  
 |||  
 Sbjct: 426217 TACTGCCTTGAAAATAGCTTCCTCTCTAGACATATTA AAAACAATTCACGGAACATATC 426276

Query: 480 ACTTGTGGCCAAGTAAGTATGTATAGTAGCCTTTTTAGC**G**CCTGTTAATGCTTCCACCGT 421  
 |||  
 Sbjct: 426277 ACTTGTGGCCAAGTAAGTATGTATAGTAGCCTTTTTAGC**A**CCTGTTAATGCTTCCACCGT 426336

Figura 12 – (continuação)

---

```
Query: 420      TCTCTTAATCAAGTGTTCTCTAGATTGGACAAGACATTGAATACTAACATCGTCTGGGGC 361
                |||
Sbjct: 426337  TCTCTTAATCAAGTGTTCTCTAGATTGGACAAGACATTGAATACTAACATCGTCTGGGGC 426396

Query: 360      GTTTCTACAGCATATCTAGTGAAGTCGAAATCTGTTTGAGATGCAGAGGGGAAGGAAAC 301
                |||
Sbjct: 426397  GTTCTTACAGCATATCTAGTGAAGTCGAAATCTGTTTGAGATGCAGAGGGGAAGGAAAC 426456

Query: 300      CTCGATTCTTTGAACCCAATATTGACCAGCTTGTGAAAGTATTCTTCTTTTGTCCAC 241
                |||
Sbjct: 426457  CTCGATTCTTTGAACCCAATATTGACCAGCTTGTGAAAGTATTCTTCTTTTGTCCAC 426516

Query: 240      TGACATGGGATCCGGCAGAGATTGGTTACCATCTCTCAAATCTGTTGATAACCAACGAGG 181
                |||
Sbjct: 426517  TGACATGGGATCCGGCAGAGATTGGTTACCATCTCTCAAATCTGTTGATAACCAACGAGG 426576

Query: 180      AGCCCTCGTGATCCGGTTATCCGGCCACTTTCTATTAGATAGCTTTGGAGCGTTAAATGG 121
                |||
Sbjct: 426577  AGCCCTCGTGATCCGGTTATCCGGCCACTTTCTATTAGATAGCTTTGGAGCGTTAAATGG 426636

Query: 120      CTTGTACTTGAGGAAGGGTCCTTAAGCATATTTTATAGGCTAGCTTCACTGGAGGAAT 61
                |||
Sbjct: 426637  CTTGTACTTGAGGAAGGGTCCTTAAGCATATTTTATAGGCTAGCTTCACTGGAGGAAT 426696

Query: 60       AACTCTTGAGGCTCTGGAGGCCGCATGCTCAGCAAGAGCAATAATACTCTCTTTAACCAT 1
                |||
Sbjct: 426697  AACTCTTGAGGCTCTGGAGGCCGCATGCTCAGCAAGAGCAATAATACTCTCTTTAACCAT 426756
```

Figura 12 – (continuação)

Query: 1 MVKESIIALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSKYKPFNAPKLSNRKWPDNRI TRA 180  
 MVKESIIALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSKYKPFNAPKLSNRKWPDNRI TRA  
 Sbjct: 1 MVKESIIALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSKYKPFNAPKLSNRKWPDNRI TRA 60

Query: 181 PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKL VNI GFKEIEVSFSPASQTD FDFTRYAVEN 360  
 PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKL VNI GFKEIEVSFSPASQTD FDFTRYAVEN  
 Sbjct: 61 PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKL VNI GFKEIEVSFSPASQTD FDFTRYAVEN 120

Query: 361 APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKAT IHTYLATS DMFREIVFNMSREEAISKAV 540  
 APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKAT IHTYLATS DMFREIVFNMSREEAISKAV  
 Sbjct: 121 APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKAT IHTYLATS DMFREIVFNMSREEAISKAV 180

Query: 541 EATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSP ECFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPT EENP **V**IFN 720  
 EATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSP ECFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPT EENP+IFN  
 Sbjct: 181 EATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSP ECFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPT EENP **I**IFN 240

Query: 721 LPATVEVA **P**PNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG 900  
 LPATVEVA PNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG  
 Sbjct: 241 LPATVEVA **S**PNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG 300

Query: 901 CLFGNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLDFSDLTSVLDVVERCNKIPVSQRAPYGGDL 1080  
 CLFGNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLDFSDLTSVLDVVERCNKIPVSQRAPYGGDL  
 Sbjct: 301 CLFGNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLDFSDLTSVLDVVERCNKIPVSQRAPYGGDL 360

Query: 1081 VVCAFSGSHQDAIKKGFNLQNKRAQGETQWRIPYLP LDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKG 1260  
 VVCAFSGSHQDAIKKGFNLQNKRAQGETQWRIPYLP LDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKG  
 Sbjct: 361 VVCAFSGSHQDAIKKGFNLQNKRAQGETQWRIPYLP LDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKG 420

Query: 1261 GAAWVILRSLGLDLPRNMQIEFSSAVQDHADSLGRELKSDEISKLFKEAYNYNDEQYQAI 1440  
 GAAWVILRSLGLDLPRNMQIEFSSAVQDHADSLGRELKSDEISKLFKEAYNYNDEQYQAI  
 Sbjct: 421 GAAWVILRSLGLDLPRNMQIEFSSAVQDHADSLGRELKSDEISKLFKEAYNYNDEQYQAI 480

Query: 1441 SLVNYNVEKFGTERRVFTGQVKVGDQIVDIEGTGN GFISSLVDALSNNLNVRF AVANYTE 1620  
 SLVNYNVEKFGTERRVFTGQVKVGDQIVDIEGTGN GFISSLVDALSNNLNVRF AVANYTE  
 Sbjct: 481 SLVNYNVEKFGTERRVFTGQVKVGDQIVDIEGTGN GFISSLVDALSNNLNVRF AVANYTE 540

Query: 1621 HSLGSGSSTQAASYIHLSYRRNADNEKAYKWGVGVSE DVG DSSVRAIFATINNIHSGDV 1800  
 HSLGSGSSTQAASYIHLSYRRNADNEKAYKWGVGVSE DVG DSSVRAIFATINNIHSGDV  
 Sbjct: 541 HSLGSGSSTQAASYIHLSYRRNADNEKAYKWGVGVSE DVG DSSVRAIFATINNIHSGDV 600

Query: 1801 SIPSLAEV **G**GKNAASGSA\* 1860  
 SIPSLAEV GKNAASGSA\*  
 Sbjct: 601 SIPSLAEV **E**GKNAASGSA\* 620

Figura 13 – Tradução da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 23A, feita através do programa BLAST e comparada com a seqüência do gene LEU4 descrita no *Saccharomyces cerevisiae Genome Database*. A mutação do aminoácido é destacada em negro.

posição 249 da seqüência de aminoácidos que corresponde a região 746 da sequencia de nucleotídeos, Serina (S – cadeia lateral sem carga, polar) é substituída por Prolina (P, Pro) que apresenta cadeia lateral apolar. A terceira mutação, posição 609 da seqüência de aminoácidos que corresponde a região 1826 da seqüência de nucleotídeos, um resíduo ácido glutâmico (E – cadeia lateral ácida) é substituído por Glicina (G, Gly) que apresenta cadeia lateral sem carga e apolar.

A análise de comparação da seqüência traduzida da cepa RB 23A com o alinhamento de múltiplas seqüências de LEU4, através do site *Saccharomyces cerevisiae Database* (<http://www.yeastgenome.org>), observamos que a mutação de Val<sub>237</sub> está localizada em uma região altamente conservada, enquanto a Pro<sub>249</sub> está localizada em uma região medianamente conservada. A mutação Gly<sub>609</sub> está localizada em uma região de conservação variável.

Como podemos observar na Figura 13, para a cepa RB 8B a análise comparativa, através do programa BLAST-N, da seqüência de nucleotídeos apresentou 99% de identidade com a sequencia LEU 4. A seqüência apresentou trocas de bases nas posições 812(C → T), 865 (T → C), 885(C → T), 938(C → T) e 1230(C → G). Entretanto, estas trocas não resultaram em mudanças de aminoácidos como podemos observar na Figura 14. A análise comparativa da seqüência traduzida apresentou 100% de identidade com o gene LEU4.

```

Query: 661  ATTTGCGAAGCTGTTAAGAAGGCTTGGGAACCTACCGAGGAAAAATCCAATCATTTTCAAC 720
          |||
Sbjct: 661  ATTTGCGAAGCTGTTAAGAAGGCTTGGGAACCTACCGAGGAAAAATCCAATCATTTTCAAC 720

Query: 721  TTACCTGCTACCGTAGAAGTTGCCTCTCCAAATGTTTATGCTGATCAGATTGAATACTTC 780
          |||
Sbjct: 721  TTACCTGCTACCGTAGAAGTTGCCTCTCCAAATGTTTATGCTGATCAGATTGAATACTTC 780

Query: 781  GCTACCCATATTACTGAGCGTGAGAAGGTTTGTTATCTCTACACATTGTCACAATGACCGT 840
          |||
Sbjct: 781  GCTACCCATATTACTGAGCGTGAGAAGGTTTGTCATCTCTACACATTGTCACAATGACCGT 840

Query: 841  GGTTCGGTGTGCGCCGCACAGAGCTAGGTATGCTTGCAGGTGCTGACCGGTGTAAGAAGGA 900
          |||
Sbjct: 841  GGTTCGGTGTGCGCCGCACAGAGTTAGGTATGCTTGCAGGTGCCACCGGTGTAAGAAGGA 900

Query: 901  TGTCTCTTTGGTAATGGTGAACGTACAGGTAATGTGGATTTGGTTACTGTTGCTATGAAT 960
          |||
Sbjct: 901  TGTCTCTTTGGTAATGGTGAACGTACAGGTAATGTGGATCTGGTTACTGTTGCTATGAAT 960

Query: 961  ATGTATACCCAAGGTGTTTCTCCTAATTTGGATTTCTCTGACTTGACCTCTGCTTAGAT 1020
          |||
Sbjct: 961  ATGTATACCCAAGGTGTTTCTCCTAATTTGGATTTCTCTGACTTGACCTCTGCTTAGAT 1020

Query: 1021 GTGGTTGAGCGTTGTAATAAGATCCCAGTATCGCAAAGAGCACCATACGGCGGTGACTTG 1080
          |||
Sbjct: 1021 GTGGTTGAGCGTTGTAATAAGATCCCAGTATCGCAAAGAGCACCATACGGCGGTGACTTG 1080

Query: 1081 GTCGTTTGTGCCTTTTCCGGTTCTCACCAAGACGCCATTAAGAAGGGTTTCAACTTACAA 1140
          |||
Sbjct: 1081 GTCGTTTGTGCCTTTTCCGGTTCTCACCAAGACGCCATTAAGAAGGGTTTCAACTTACAA 1140

Query: 1141 AACAGAAGCGTGCTCAAGGTGAAACTCAATGGAGAATCCCATACTTGCCATTGGATCCA 1200
          |||
Sbjct: 1141 AACAGAAGCGTGCTCAAGGTGAAACTCAATGGAGAATCCCATACTTGCCATTGGATCCA 1200

Query: 1201 AAGGACATTGGCCGTGATTACGAAGCTGTGATCAGAGTCAACTCTCAGTCTGGTAAAGGT 1260
          |||
Sbjct: 1201 AAGGACATTGGCCGTGATTACGAAGCTGTCATCAGAGTCAACTCTCAGTCTGGTAAAGGT 1260

Query: 1261 GGTGCCGCTTGGGTTATTTTGTAGATCTTTGGGTTTGGATCTACCAAGAAACATGCAAATC 1320
          |||
Sbjct: 1261 GGTGCCGCTTGGGTTATTTTGTAGATCTTTGGGTTTGGATCTACCAAGAAACATGCAAATC 1320

Query: 1321 GAATTTTCTAGCGCGTTCAAGACCATGCTGACTCCTTGGGTAGAGAATAAAATCAGAT 1380
          |||
Sbjct: 1321 GAATTTTCTAGCGCGTTCAAGACCATGCTGACTCCTTGGGTAGAGAATAAAATCAGAT 1380

```

Figura 14 – Análise comparativa, feita através do programa BLAST, da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 8B, com a seqüência do gene LEU4 descrita no *Saccharomyces cerevisiae Genome Database*. As substituições nas bases estão indicadas em negrito.

---

```
Query: 1   ATGGTTAAAGAGAGTATTATTGCTCTTGCTGAGCATGCGGCCTCCAGAGCCTCAAGAGTT 60
          |||
Sbjct: 1   ATGGTTAAAGAGAGTATTATTGCTCTTGCTGAGCATGCGGCCTCCAGAGCCTCAAGAGTT 60

Query: 61  ATTCTCCAGTGAAGCTAGCCTATAAAAATATGCTTAAGGACCCTTCCTCCAAGTACAAG 120
          |||
Sbjct: 61  ATTCTCCAGTGAAGCTAGCCTATAAAAATATGCTTAAGGACCCTTCCTCCAAGTACAAG 120

Query: 121 CCATTTAACGCTCCAAAGCTATCTAATAGAAAGTGGCCGGATAACCGGATCACGAGGGCT 180
          |||
Sbjct: 121 CCATTTAACGCTCCAAAGCTATCTAATAGAAAGTGGCCGGATAACCGGATCACGAGGGCT 180

Query: 181 CCTCGTTGGTTATCAACAGATTTGAGAGATGGTAACCAATCTCTGCCGGATCCCATGTCA 240
          |||
Sbjct: 181 CCTCGTTGGTTATCAACAGATTTGAGAGATGGTAACCAATCTCTGCCGGATCCCATGTCA 240

Query: 241  GTGGAACAAAAGAAAGAATACTTTCACAAGCTGGTCAATATTGGGTTCAAAGAAATCGAG 300
          |||
Sbjct: 241  GTGGAACAAAAGAAAGAATACTTTCACAAGCTGGTCAATATTGGGTTCAAAGAAATCGAG 300

Query: 301  GTTTCCTTCCCCTCTGCATCTCAAACAGATTCGACTTCACTAGATATGCTGTAGAAAAC 360
          |||
Sbjct: 301  GTTTCCTTCCCCTCTGCATCTCAAACAGATTCGACTTCACTAGATATGCTGTAGAAAAC 360

Query: 361  GCCCCAGACGATGTTAGTATTCAATGTCTTGTCCAATCTAGAGAACACTTGATTAAGAGA 420
          |||
Sbjct: 361  GCCCCAGACGATGTTAGTATTCAATGTCTTGTCCAATCTAGAGAACACTTGATTAAGAGA 420

Query: 421  ACGGTGGAAGCATTAAACAGGTGCTAAAAAGGCTACTATACATACTTACTTGGCAACAAGT 480
          |||
Sbjct: 421  ACGGTGGAAGCATTAAACAGGTGCTAAAAAGGCTACTATACATACTTACTTGGCAACAAGT 480

Query: 481  GATATGTTCCGTGAAATTGTTTTTAATATGTCTAGAGAGGAAGCTATTTCCAAGGCAGTA 540
          |||
Sbjct: 481  GATATGTTCCGTGAAATTGTTTTTAATATGTCTAGAGAGGAAGCTATTTCCAAGGCAGTA 540

Query: 541  GAGGCCACCAAACCTAGTTAGGAACTAACTAAGGATGACCCTTCCCAACAAGCCACTCGT 600
          |||
Sbjct: 541  GAGGCCACCAAACCTAGTTAGGAACTAACTAAGGATGACCCTTCCCAACAAGCCACTCGT 600

Query: 601  TGGTCCTATGAGTTTCCCCGAATGTTTCAGTGATACTCCAGGTGAATTTGCTGTAGAA 660
          |||
Sbjct: 601  TGGTCCTATGAGTTTCCCCGAATGTTTCAGTGATACTCCAGGTGAATTTGCTGTAGAA 660
```

Figura 14 – (continuação)

---

```
Query: 1381 GAGATTCCAAGTTATTCAAAGAGGCTTACAAC TACAATGACGAACAGTACCAAGCTATT 1440
          |||
Sbjct: 1381 GAGATTCCAAGTTATTCAAAGAGGCTTACAAC TACAATGACGAACAGTACCAAGCTATT 1440

Query: 1441 AGTTTAGTCAATTATAATGTTGAAAAATTCGGCACTGAACGTAGAGTGTTCACTGGTCAA 1500
          |||
Sbjct: 1441 AGTTTAGTCAATTATAATGTTGAAAAATTCGGCACTGAACGTAGAGTGTTCACTGGTCAA 1500

Query: 1501 GTCAAAGTAGGCGACCAGATCGTCGATATTGAAGGTACAGGTAATGGTCCAATCTCTCT 1560
          |||
Sbjct: 1501 GTCAAAGTAGGCGACCAGATCGTCGATATTGAAGGTACAGGTAATGGTCCAATCTCTCT 1560

Query: 1561 TTGGTCGACGCCCTATCAAAC TTGTTGAACGTGAGATTTGCCGTAGCAAAC TACACAGAG 1620
          |||
Sbjct: 1561 TTGGTCGACGCCCTATCAAAC TTGTTGAACGTGAGATTTGCCGTAGCAAAC TACACAGAG 1620

Query: 1621 CATTCTCTAGGTTCTGGTTCTTCTACGCAAGCTGCTTCTTACATCCATCTATCGTATAGG 1680
          |||
Sbjct: 1621 CATTCTCTAGGTTCTGGTTCTTCTACGCAAGCTGCTTCTTACATCCATCTATCGTATAGG 1680

Query: 1681 CGTAATGCCGACAACGAAAAGGCTTACAAATGGGGTGTAGGTGTCTCCGAAGATGTCGGT 1740
          |||
Sbjct: 1681 CGTAATGCCGACAACGAAAAGGCTTACAAATGGGGTGTAGGTGTCTCCGAAGATGTCGGT 1740

Query: 1741 GATTCTTCAGTGAGAGCCATCTTTGCCACCATTAACAATATTATCCATTCTGGTGATGTG 1800
          |||
Sbjct: 1741 GATTCTTCAGTGAGAGCCATCTTTGCCACCATTAACAATATTATCCATTCTGGTGATGTG 1800

Query: 1801 TCCATTCCATCTTTGGCCGAGGTCGAAGGTAAGAATGCTGCGGCATCTGGCTCTGCATAA 1860
          |||
Sbjct: 1801 TCCATTCCATCTTTGGCCGAGGTCGAAGGTAAGAATGCTGCGGCATCTGGCTCTGCATAA 1860
```

Figura 14 – (continuação)

```

Query: 1      MVKESIIALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSSKYKFFNAPKLSNRKWPDNRIIRA 180
Sbjct: 1      MVKESIIALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSSKYKFFNAPKLSNRKWPDNRIIRA 60

Query: 181    PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLNVNIGFKEIEVSFPPSASQTDFFDFTRYAVEN 360
Sbjct: 61    PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLNVNIGFKEIEVSFPPSASQTDFFDFTRYAVEN 120

Query: 361    APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKATIHTYLATSMDFREIVFNMSREEAISKAV 540
Sbjct: 121   APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKATIHTYLATSMDFREIVFNMSREEAISKAV 180

Query: 541    EATKLVRKLTKDDPSQQATRWSYEFSECFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPTTEENPIIFN 720
Sbjct: 181   EATKLVRKLTKDDPSQQATRWSYEFSECFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPTTEENPIIFN 240

Query: 721    LPATVEVASPNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG 900
Sbjct: 241   LPATVEVASPNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG 300

Query: 901    CLFGNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLDFSDLTSVLDVVERCNKIPVSQRAPYGGDL 1080
Sbjct: 301   CLFGNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLDFSDLTSVLDVVERCNKIPVSQRAPYGGDL 360

Query: 1081   VVCAFSGSHQDAIKKGFNLQNKKRAQGETQWRIPYLPDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKG 1260
Sbjct: 361   VVCAFSGSHQDAIKKGFNLQNKKRAQGETQWRIPYLPDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKG 420

Query: 1261   GAAWVILRSLGLDLPRNMQIEFSSAVQDHADSLGRELKSDEISKLFKEAYNYNDEQYQAI 1440
Sbjct: 421   GAAWVILRSLGLDLPRNMQIEFSSAVQDHADSLGRELKSDEISKLFKEAYNYNDEQYQAI 480

Query: 1441   SLVNYNVEKFGTERRVFTGQVKVGDQIVDIEGTGNGPISLVDALSNNLNVRFVAVANYTE 1620
Sbjct: 481   SLVNYNVEKFGTERRVFTGQVKVGDQIVDIEGTGNGPISLVDALSNNLNVRFVAVANYTE 540

Query: 1621   HSLGSGSSTQAASYIHLSYRRNADNEKAYKWGVGVSEVDVGDSSVRAIFATINNIHSGDV 1800
Sbjct: 541   HSLGSGSSTQAASYIHLSYRRNADNEKAYKWGVGVSEVDVGDSSVRAIFATINNIHSGDV 600

Query: 1801   SIPSLAEVEGKNAASGSA* 1860
Sbjct: 601   SIPSLAEVEGKNAASGSA* 620

```

Figura 15 – Tradução da seqüência amplificada pelos iniciadores M13, IPM1F, IPM3F, IM6R, IPM8R, IPM9R e IPM10R da cepa RB 8B, feita através do programa BLAST e comparada com a seqüência do gene LEU4 descrita no *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database.

### **4.3 - Fermentação em escala piloto das leveduras selecionadas**

#### **4.3.1- Avaliação da fermentação em escala piloto das leveduras selecionadas**

As cepas LBCM 427, LBCM422, RB 23A foram submetidas a fermentação em escala piloto, utilizando também uma cepa comercial como controle do processo.

#### **4.3.2 - Determinação do consumo de sacarose**

A Figura 15 (Painel A, B e C) mostra o consumo de sacarose em função do tempo. Podemos observar que na primeira e segunda repetição do processo fermentativo (Painel A e B), as cepas LBCM 427, LBCM 422 e RB 23A tiveram um consumo total de sacarose em 72 horas de fermentação. A terceira repetição (Painel C), as cepas LBCM 427 e RB 23A terminaram o processo fermentativo em 48 horas, enquanto a cepa LBCM 422 finalizou a fermentação em 24 horas. Em todos os casos, quando os níveis de sacarose chegaram a aproximadamente 8 °Brix o caldo fermentado foi encaminhado para a destilação. A cepa comercial em nenhuma das repetições teve um completo consumo de sacarose, neste caso foi padronizado a destilação no mesmo tempo de fermentação das demais cepas.

#### **4.3.3 - Determinação do etanol**

A Figura 15 (Painel D, E e F) apresenta o etanol produzido ao longo do crescimento das leveduras selecionadas neste estudo. Como pode ser observado, ao longo do tempo de crescimento ocorre um aumento na concentração de etanol do meio, sendo que no tempo 48 e 72 horas a concentração de etanol é máxima. Assim como na sacarose, as leveduras LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A apresentam um perfil semelhante de produção de etanol quando comparadas no mesmo tempo.

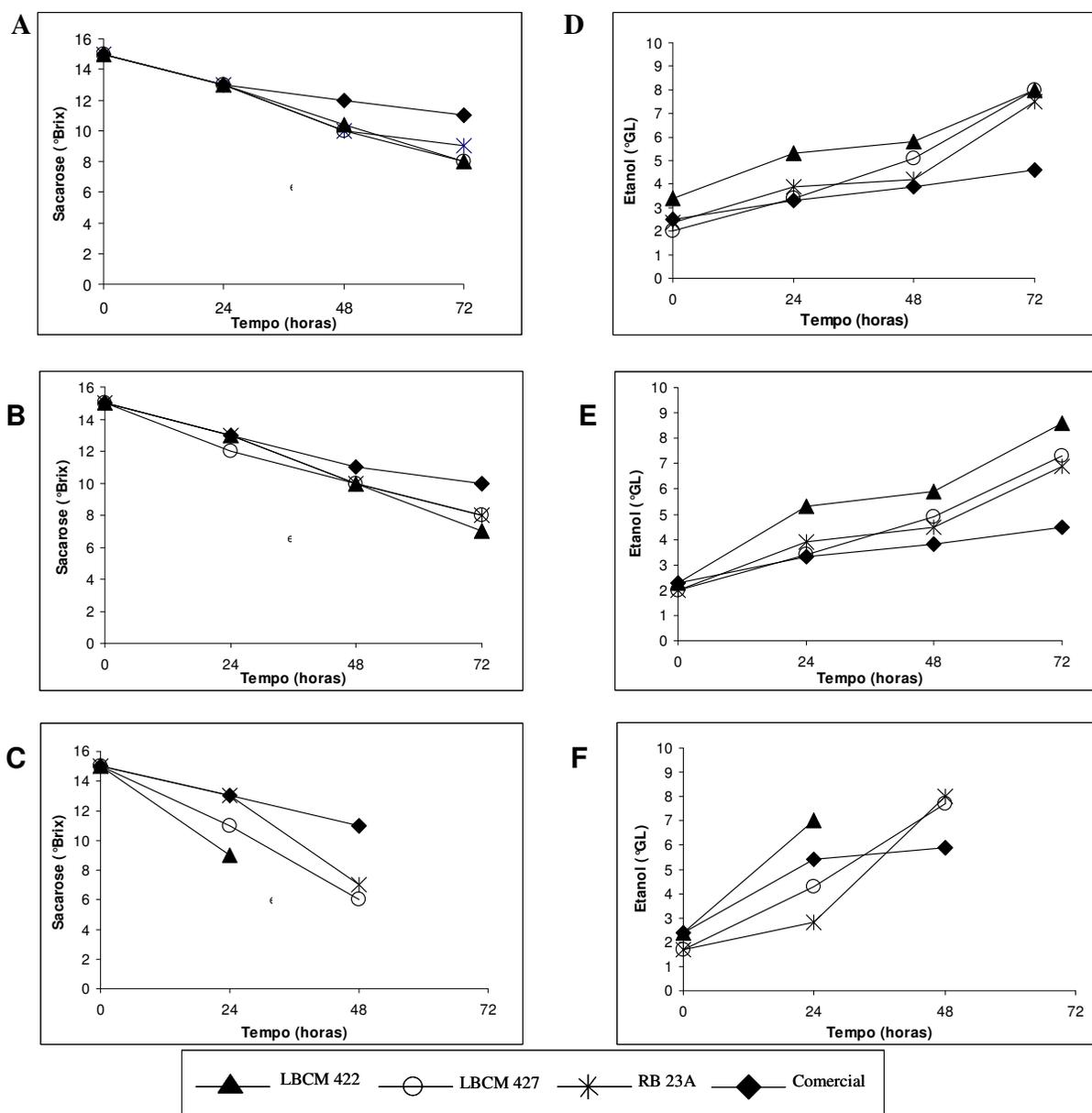


Figura 16: Determinação do consumo de sacarose e formação de etanol. As leveduras foram cultivadas em caldo de cana com 15°Brix e uma alíquota foi coletada a 0, 24, 48 e 72 horas para análise. Painel **A**, **B** e **C** – Consumo de sacarose no primeiro, segundo e terceiro ciclo de fermentação respectivamente; **D**, **E** e **F** – Produção de etanol no primeiro, segundo e terceiro ciclo de fermentação respectivamente.

#### **4.3.4 – Acompanhamento das leveduras durante o processo fermentativo**

O método de mtDNA – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of mitochondrial DNA*) foi utilizado para acompanhar as leveduras no processo fermentativo das cepas LBCM 427, LBCM422, RB 23A. Como descrito no item 3.3, para cada levedura estudada foram coletados aleatoriamente 100 colônias de leveduras de cada tempo pré-estabelecido e destas, 30 colônias também escolhidas aleatoriamente, foram utilizadas para a realização do teste de acompanhamento molecular. O resultado destes testes revelou que todas as 30 colônias, em todos os tempos coletados apresentaram o mesmo perfil de bandejamento. Na Figura 16 podemos observar o resultado da digestão de apenas três colônias para cada tempo inicial e final do experimento e verifica-se que aquelas cepas apresentaram um perfil idêntico de bandejamento.

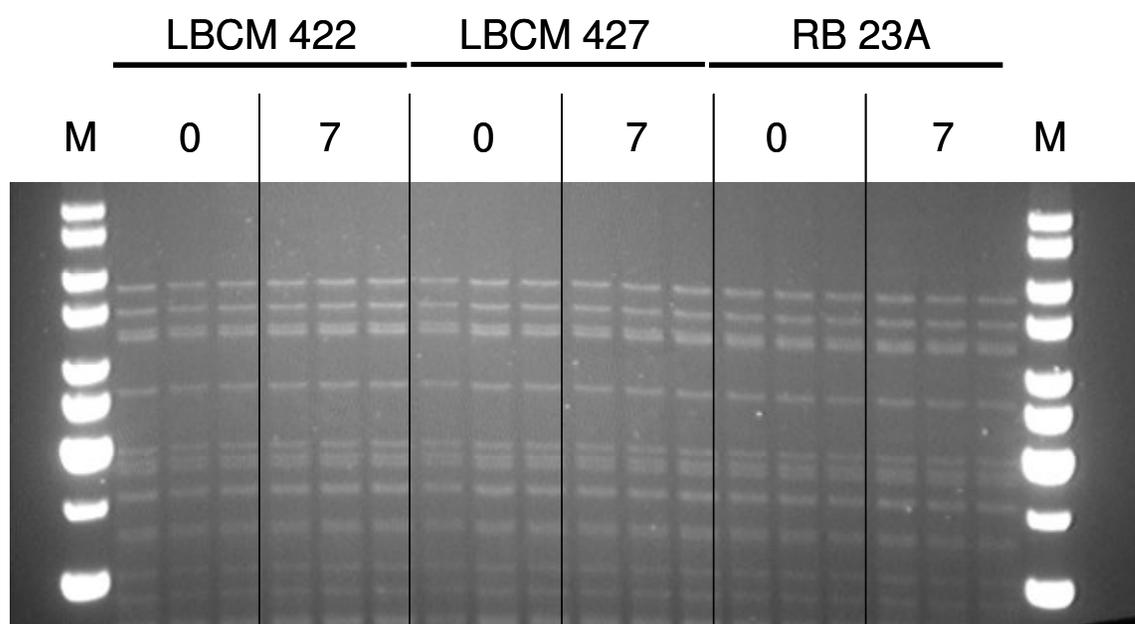


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando o perfil do mtDNA-RFLP (*mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism*) de cepas LBCM 427, LBCM 422 e RB 23A. São mostradas 3 colônias para cada tempo inicial e final do experimento. Este experimento foi realizado na Universidade do Minho em Braga, Portugal pelos doutores Dorit Schüller, Margarida Casal e Luciano Fietto.

#### **4.3.5 - Determinação dos componentes voláteis da cachaça**

A Tabela 6 apresenta os resultados das dosagens dos teores de álcool isoamílico, álcool etílico, álcool isobutílico, n-propanol, metanol, acetato de etila, furfural e acetaldeído produzidos pelo destilado do caldo fermentado pelas cepas LBCM 422, LBCM427, RB 23A e cepa comercial conforme descrito em Material e métodos.

Conforme pode ser observado, a produção de álcool isoamílico foi semelhante nas cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A e mais elevada quando comparada a cepa Comercial. A análise estatística foi realizada com a análise de variância (ANOVA) de cada composto e Test t de student para comparação das médias das amostras. Foi observado que existe diferença estatística significativa na produção de álcool isoamílico entre a cepa comercial e as demais cepas. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre as cepas LBCM422, LBCM427 e RB 23A quanto a produção de álcool isoamílico.

Por outro lado, a produção de álcool isobutílico foi mais elevada na cepa RB 23A quando comparada a produção das cepas LBCM422, LBCM 427 e cepa comercial. Foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto a produção de álcool isobutílico pela cepa RB 23A e as demais cepas. As LBCM 422 e LBCM 427 apresentaram uma produção semelhante de álcool isobutílico e maior quando comparada a cepa comercial. Após a aplicação do Test t de student foi observado diferença estatisticamente significativa entre a cepa comercial, LBCM422 e RB 23A.

A produção de álcool etílico foi semelhante nas cepas LBCM422, LBCM 427 e RB 23A e mais elevada quando comparada a cepa comercial. Foram observadas diferenças estatísticas quanto a produção de etanol pela cepa comercial e as demais cepas. Os demais compostos apresentaram resultados semelhantes de produção pelas quatro cepas.

A Tabela 6 apresenta ainda resultados das dosagens dos compostos voláteis da cachaça produzida no local de origem das leveduras em estudo no ano de 2003 e 2005. Estes dois lotes de cachaças foram coletados imediatamente após a produção, sem qualquer tratamento e analisadas por métodos cromatográficos descritos em Material e Métodos. Como podemos observar, os teores dos compostos apresentam semelhança nos dois anos de coleta. Quando comparamos os resultados obtidos pelas cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A quanto a produção de álcool isoamílico estas apresentam aproximadamente 4 vezes maior que a cachaça do produtor. O mesmo pode ser observado para a produção de

Tabela 6 - Concentração de etanol (%v/v) e compostos voláteis (mg/100 mL de álcool anidro) em cachaças obtidas com diferentes cepas de leveduras

cepa	Etanol	Acetaldeído	Acetato de Etila	Metanol	1- Propanol	Álcool Isobutílico	Álcool Isoamílico	Furfural
LBCM 422	38,72 ± 0,17	69,47 ± 42,37	72,96 ± 61,88	19,88 ± 12,56	25,26 ± 12,56	96,69 ± 11,64	286,42 ± 36,85	0,28 ± 0,28
LBCM 427	35,63 ± 3,31	36,48 ± 15,42	48,36 ± 22,21	10,25 ± 5,98	31,25 ± 5,98	112,24 ± 7,95	284,65 ± 28,40	0,11 ± 0,20
RB 23A	37,07 ± 1,32	51,98 ± 5,78	64,91 ± 23,26	14,18 ± 9,27	26,77 ± 9,27	135,69 ± 10,34 <sup>b</sup>	333,20 ± 30,89	0,52 ± 0,18
Cepa comercial <sup>1</sup>	27,42 ± 3,7 <sup>a</sup>	54,34 ± 43,60	141,37 ± 81,80	8,13 ± 9,37	24,05 ± 9,37	59,88 ± 21,18 <sup>a</sup>	196,37 ± 31,38 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,24
Produtor 2003 <sup>2</sup>	42,5	*	18,00	*	19,60	13,10	71,10	*
Produtor 2005 <sup>2</sup>	47,0	1,91	13,56	19,54	18,20	20,23	69,75	0,01

1 – Levedura comercial utilizada como controle do processo.

2 – Resultado da análise de cachaças recém destiladas, coletadas no local de origem das cepas LBCM 422 e LBCM 427 em 2003 e 2005.

a - Valores diferem significativamente entre a Cepa comercial e as demais cepas (ANOVA)

b – Valores diferem significativamente entre a cepa LBCM 427, LBCM 422 e RB 23A (ANOVA)

\* - análises não realizadas

álcool isobutílico e acetato de etila. A produção de acetaldeído foi de aproximadamente 50 vezes superior pelas cepas em estudo quando comparada a cachaça do produtor enquanto a produção de álcool etílico e n-propanol foi semelhante entre as cepas LBCM422, LBCM 427 e RB23 A e esta cachaça.

#### **4.3.6- Avaliação sensorial de cachaças produzidas com cepas selecionadas como iniciadoras.**

A Tabela 7 apresenta os resultados das notas de avaliações sensoriais produzidos pelo destilado do caldo fermentado pelas cepas LBCM 422, LBCM427, RB 23A e cepa comercial conforme descrito em Material e métodos. Conforme podemos observar, todas as cachaças tiveram boa aceitação, com notas de impressão global intermediárias na escala hedônica de pontos. A análise estatística foi realizada com a análise de variância (ANOVA) e Test t de student para comparação das médias das amostras. Foi observado que não existe diferença estatística significativa entre as amostras de cachaça.

Tabela 7 – Notas de avaliações sensoriais cachaças obtidas com diferentes cepas de leveduras e em fermentações sucessivas

<b>Cachaças</b>	<b>Batelada</b>	<b>Notas de avaliações sensorial *</b>	<b>Médias</b>
LBCM 422	1	4,5	<b>5,2</b>
	2	5,6	
	3	5,4	
LBCM 427	1	5,6	<b>4,9</b>
	2	4,6	
	3	4,4	
RB 23 A	1	5,2	<b>5,0</b>
	2	5,2	
	3	4,5	
Comercial	1	3,9	<b>4,3</b>
	2	5,1	
	3	4	

\* Médias de avaliação sensorial global segundo escala hedônica de 9 pontos ( 1-desgostei extremamente/ 9-gostei extremamente)

Para analisar a similaridade entre as cachaças produzidas pelas cepas LBCM 422, LBCM 427, RB 23A e cepa comercial, utilizamos o método de Análise de Componentes Principais (PCA). Neste estudo, utilizando as respostas encontradas na Tabela 6 e 7, construímos a matriz para análise no método PCA considerando os valores de acetaldeído, acetato de etila, metanol, 1-propanol, álcool isobutílico, álcool isoamilico, furfural, ácido acético e notas sensoriais como variáveis e dispostas em colunas enquanto as cepas, como amostras, em fileiras. Um pré-processamento dos dados foi necessário para atribuir pesos equivalentes aos teores dos analitos nas amostras.

Como podemos observar na Figura 17, a variação ocorrida entre as amostras pode ser explicada pelo Componente Principal 1 (88%) e apenas 11% pelo Componente Principal 2. Os componentes Principais 1 e 2 explicam juntos 99% da variação ocorrida entre as amostras. Isto demonstra que os descritores empregados discriminam satisfatoriamente as amostras analisadas.

A análise conjunta dos gráficos de *scores* e *loadings* (Painel A e B) mostra que PC1 separa as amostras em dois grandes grupos e que a análise sensorial contribuiu com maior peso sobre a variabilidade associada ao primeiro componente. Por outro lado, o acetaldeído teve maior influência sobre a segunda componente (PC2).

As amostras ficaram bem distintas umas das outras, marcadas pelas localizações bem definidas de cada uma no gráfico bidimensional (Figura 17). Para a cepa comercial, as três fermentações sucessivas deram origem a cachaças com características próximas entre si e diferente quando comparada a LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A. Por outro lado, as amostras de cachaças produzidas pelas cepas LBCM 427 e RB 23A foram reunidas no mesmo grupo, enquanto as amostras de cachaças da cepa LBCM 422 foram agrupadas distante das demais.

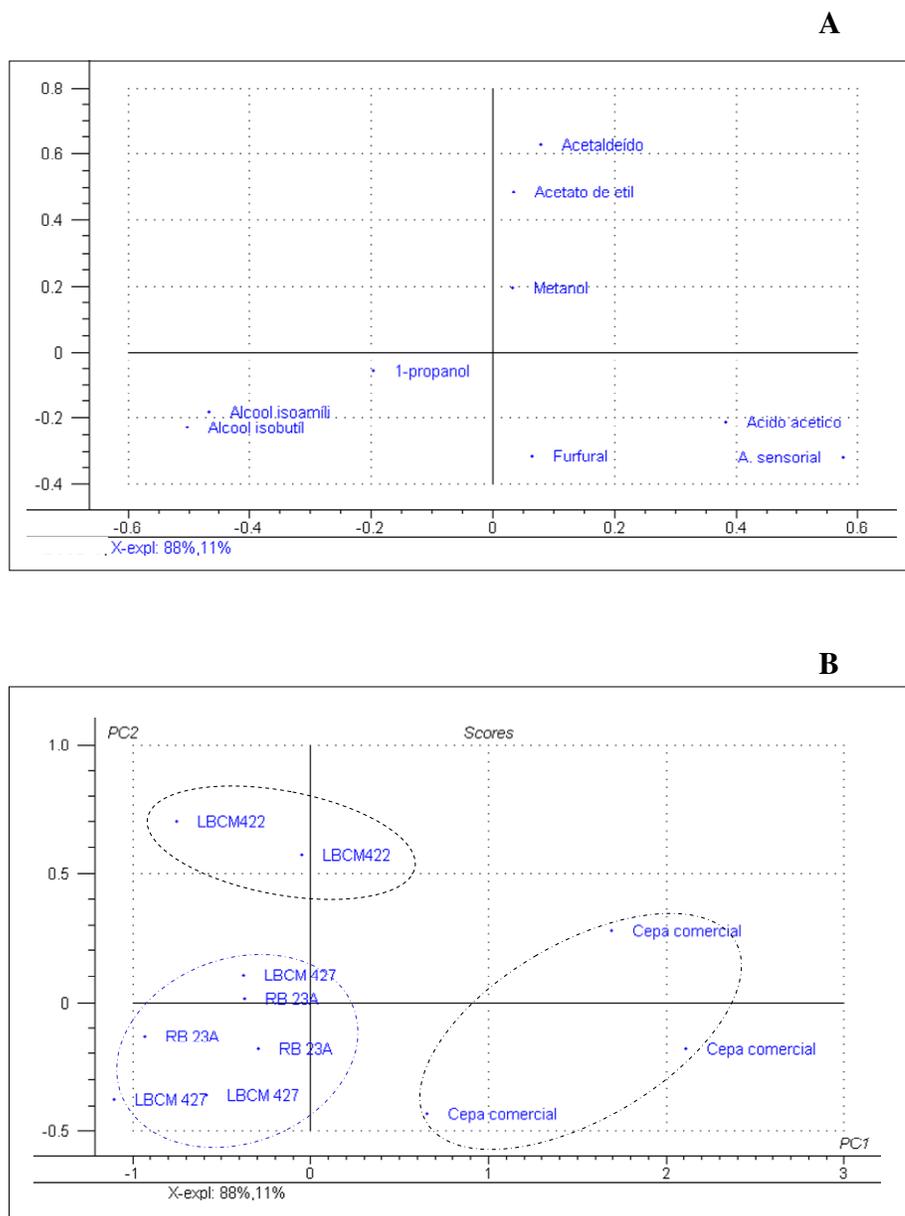


Figura 18 - Análise de Componentes Principais correspondendo a respostas das cepas LBCM 422, LBCM 427, RB 23A e comercial, quanto aos compostos voláteis e análise sensorial da cachaça. Painel A: *Loadings* PCA; Painel B: *Score* PCA.



## 5.1 - Análise do Polimorfismo molecular das cepas

A produção de cachaça de alambique é caracterizada pela fermentação do caldo de cana por uma mistura de leveduras com predomínio da espécie *S. cerevisiae*. A população de leveduras presentes neste processo fermentativo está em constante mudança devido a introdução de novas cepas provenientes do caldo de cana uma vez que este não é esterilizado e o processo fermentativo é realizado em ambiente aberto (Morais e cols., 1997; Pataro e cols., 1998).

Vários fatores podem interferir na qualidade de uma bebida destilada como o tempo de envelhecimento, tipo de madeira usado no armazenamento, processo de destilação, entretanto as leveduras e as condições de fermentação são de grande importância uma vez que os compostos aromatizantes são formados durante a fermentação. Este fato denota a importância do uso de cepas selecionadas com características importantes ao processo para melhorar a qualidade do produto final, contribuir para uma fermentação eficiente, e reduzir as variações de propriedades sensoriais da bebida de ano para ano. Entretanto, apenas a inoculação de uma cepa selecionada não é suficiente para garantir a permanência desta levedura por longos períodos no processo fermentativo fazendo-se necessário o acompanhamento da levedura de interesse ao longo do processo fermentativo (Cardello & Faria, 1998; Oliveira e cols., 2004; Oliveira e cols., 2005; Querol e cols., 1994).

Nosso laboratório desenvolveu uma metodologia para o isolamento de cepas de *S. cerevisiae* para serem usadas na produção da cachaça (Vicente e cols., 2006). A estratégia propõe a seleção de leveduras com capacidade de adaptação as condições encontradas durante o processo fermentativo do caldo de cana como: altas concentrações de sacarose e etanol, além de elevadas temperaturas; capacidade de floculação; alta capacidade fermentativa e maior potencial de produção de agentes aromatizantes. Para selecionar cepas com capacidade de maior produção de componentes aromatizantes, avaliamos a resistência das cepas a TFL e cerulenina que são compostos que foram descritos como capazes de selecionar leveduras com maior capacidade de produção de substâncias tais como o álcool isoamílico e ácido capróico respectivamente. Este protocolo busca selecionar leveduras iniciadoras que melhorem e preservem a qualidade da bebida e que possam ser utilizadas em qualquer alambique de produção artesanal de cachaça. Como será discutido neste capítulo, os resultados apresentados neste trabalho permitem validar a metodologia

proposta uma vez que as leveduras selecionadas apresentaram uma boa adaptação e capacidade fermentativa no caldo de cana, além de produzirem elevados teores de compostos voláteis quando comparados ao produzido no alambique de origem.

O uso de técnicas que possibilitem a distinção entre o inóculo de uma determinada cepa e a microbiota naturalmente presente no processo fermentativo são de grande interesse para a indústria de bebidas. Nos últimos anos, muitas metodologias têm sido desenvolvidas para permitir a discriminação entre leveduras de interesse e outras que estejam presentes no processo. Metodologias baseadas no polimorfismo do DNA têm sido de grande ajuda nesta tarefa de diferenciação. Estudos mostram que as cepas de *S. cerevisiae* presentes no processo fermentativo da cachaça e de outras bebidas apresentam alto grau de polimorfismo genético entre diferentes destilarias, alta variabilidade genética isoladas em diferentes estágios de fermentação e uma sucessão de cepas geneticamente diferentes durante o processo de produção da aguardente (Guerra e cols., 2001; Pataro e cols., 2000; Schuller e cols., 2004).

As cepas LBCM 422 e LBCM 427 foram submetidas a diferentes métodos moleculares para avaliar a permanência no processo fermentativo no caldo de cana. Utilizamos a técnica de RAPD-PCR que se baseia no uso de primers (EI1 e LA1) complementares ao sítio de *splicing* dos introns. É uma técnica que não necessita do isolamento do DNA e por isso permite a análise de muitas amostras em um mesmo dia e já demonstrou adequada para monitorar a presença de cepas iniciadoras durante o processo de fermentação (De Barros e cols., 1996).

Para avaliar a capacidade de discriminação do método entre as cepas LBCM 422 e LBCM 427, isoladas da mesma dorna, realizamos nova coleta de amostra de mosto fermentado no mesmo local de origem destas leveduras dois anos após a primeira coleta. A coleta foi realizada com quatro horas de fermentação porque espera-se encontrar leveduras com diferentes características de adaptação e este fato aumentaria a possibilidade de diferenciar as cepas LBCM422 e LBCM 427 pelo método proposto (Morais e cols., 1997). Foram isoladas 358 leveduras e escolhidas aleatoriamente 35, que corresponde a 10% do grupo, para testes de resistência a TFL e cerulenina a fim de conhecer o comportamento de resistência aos compostos dois anos após o primeiro estudo. Este novo grupo de leveduras não foi identificado quanto a espécie, pois tínhamos como objetivo avaliar o perfil de

bandeamento genético das leveduras selvagens e possivelmente diferenciá-las das cepas LBCM 422 e LBCM 427, mesmo porque a maior parte das leveduras isoladas são da espécie *S. cerevisiae* (Vicente e cols., 2006). Como podemos observar na Tabela 2, o perfil de resistência aos dois compostos é muito semelhante possivelmente explicado pelo grande polimorfismo genético no processo fermentativo de produção de cachaça. Diante destes resultados, selecionamos as cepas R304, R321, R329 e R335 que representam os diferentes comportamentos de resistência aos compostos para controle no método RAPD-PCR (Tabela 3).

Como podemos observar na Figura 5, o método de RAPD-PCR não diferenciou a levedura LBCM 427 das outras cepas avaliadas no teste. O grupo de leveduras coletadas em 2001 e 2003 apresenta o mesmo perfil de bandeamento, entretanto as leveduras *S. paradoxus* e *S. kluyveri* apresentam perfil de bandeamento distinto das demais cepas o que demonstra que o método diferencia leveduras do gênero *Saccharomyces*. O fato do método não diferenciar estas leveduras, que apresentam características bioquímicas e fisiológicas diferentes, sugere a existência de mutações pontuais não detectáveis por esta metodologia. Guerra e col, (2001), estudando a diversidade de cepas *S. cerevisiae* durante o processo fermentativo da cachaça observaram poucas diferenças de perfil de bandeamento entre as leveduras isoladas utilizando o método de RAPD-PCR. Este autor atribuiu esta observação a possibilidade de existência de mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções distribuídas no genoma. Em estudo sobre a dinâmica de leveduras selvagens e cepas iniciadoras em vinho tipos Riesling e Chardonnay, observou-se que é possível distinguir algumas cepas selvagens, mas não todas, utilizando diferentes *primers* em reações de PCR (Egli e cols., 1998).

Outro método utilizado, o mtDNA-RFLP que baseia-se no uso de endonucleases de restrição, foi escolhido por ser muito usado no controle de qualidade industrial de cepas iniciadoras mas também para o estudo da diversidade de cepas selvagens durante a produção de bebidas. Como podem ser observados na Figura 06, os perfis de bandeamento das cepas LBCM 422 e LBCM 427 são idênticos. As demais cepas do gênero *Saccharomyces* apresentaram um perfil de bandeamento que a distingue umas das outras.

Para acompanhar uma levedura iniciadora no processo fermentativo rotineiramente é necessário que o método seja rápido, eficiente e baixo custo financeiro. O método de PCR

atende a estes requisitos e por isso decidimos avaliar o método COX-PCR. Este método baseia-se no uso de quatro *primers* e se mostrou efetivo na análise de polimorfismo de leveduras selvagens e comerciais para uso na fermentação do vinho (Lopez e cols., 2003). Como podemos observar na Figura 7, não foi possível diferenciar a cepa LBCM 427 das cepas LBCM 423 e LBCM 424 que apresentam perfis diferentes de resistência a TFL e cerulenina. A cepa LBCM 422 apresentou três fragmentos que a diferencia das demais. Quanto ao grupo de cepas R304, R321, R323 e R335 também apresentaram um perfil de bandeamento muito similar entre si, porém estas leveduras apresentam perfis de resistência a TFL e cerulenina distintos. Este método então se mostrou mais efetivo na discriminação de cepas de levedura isoladas da mesma dorna, porém não foi capaz de distinguir todas as cepas que sabidamente apresentam características bioquímicas de resistência a drogas diferenciadas.

O método de cariotipagem é eficiente para discriminar cepas geneticamente próximas e de escolha para identificar a presença de rearranjos cromossomais. Como podemos observar na Figura 8, as cepas LBCM422 e LBCM 427 apresentam um perfil do cariótipo diferente entre si. Este fato sugere que a dificuldade dos métodos anteriores em não diferenciá-las é possivelmente devido a presença de mutações pontuais ou rearranjos cromossomais que resultem em leveduras com características fisiológicas distintas. Conforme os resultados encontrados neste trabalho, uma estratégia para acompanhar a permanência da cepa iniciadora no processo fermentativo da cachaça é o uso combinado de métodos moleculares e bioquímicos. Dunn e cols. (2005) utilizando a técnica de *Microarray karyotyping* em leveduras de comerciais de vinho observou pequena variação nos genes entre diferentes leveduras do vinho, mas que são suficientes para identificá-las e algumas variações estão correlacionadas com a sensibilidade a drogas. Segundo o autor, o pequeno número de diferenças genéticas entre cepas que tem propriedades fermentativas e organolépticas diferentes pode ser atribuído a um também pequeno número de mudanças genéticas, sendo então necessário acrescentarem testes que observem as diferenças sensoriais no produto final (Antunovics e cols., 2005).

## 5.2 - Análise das segregantes da cepa parental LBCM 427

Outra abordagem de nosso trabalho foi o estudo das cepas segregantes da cepa parental LBCM 427. As cepas *S. cerevisiae* largamente utilizadas em laboratórios são haplóides ou diplóides e tem um perfil eletroforético dos cromossomos constante enquanto cepas selvagens, como por exemplo, as leveduras do vinho, são principalmente diplóides, ou poliplóides, homotáticas, e com alto nível de polimorfismo nos cromossomos. As cepas do vinho não parecem ser geneticamente uniformes, apresentando exacerbada capacidade de reorganização do seu genoma por mecanismos como rearranjos cromossomais, *crossing-over* mitótico, conversão gênica e promotores com rápida capacidade de adaptação a mudanças no meio. A ploidia e o rearranjo cromossomal das leveduras podem conferir vantagem de adaptação ao meio externo. Outro aspecto é que as leveduras podem fazer mudanças genômicas no processo de adaptação as condições de laboratório (Dequin, 2001; Perez-Ortin e cols., 2002; Pretorius, 2000; Pretorius, 2003).

As cepas segregantes foram submetidas aos critérios estabelecidos por nossa metodologia para selecionar leveduras com características apropriadas a produção da cachaça. Como podemos observar na Figura 9, as cepas apresentaram uma instabilidade de resposta ao testes avaliados e não encontramos uma levedura que tenha reunido todas as características fisiológicas da cepa parental. Além disso, as cepas segregantes apresentam uma mudança no perfil de resposta aos testes ao longo das passagens em meio de cultura (Figura 9). Sipiczki e cols. (2001) em estudo da segregação de cepas *S. cerevisiae*, observou uma significativa variação na utilização de galactose, maltose; resistência a diferentes concentrações de dióxido de enxofre, cobre, etanol; e eficiência na produção de vários compostos como n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, acetaldeído e acetato de etila. Isto demonstra que a população de *S. cerevisiae* pode ancorar alelos que causam uma maciça alteração no padrão global de expressão dos genes (Cavaliere e cols., 2000; Sipiczki e cols., 2004).

De acordo com nossa metodologia para seleção de leveduras, as resistências a TFL e cerulenina são importantes parâmetros de inclusão de candidatas a boas cepas iniciadoras. Desta forma, a segregante RB 23A que apresentou resistência a ambos compostos e estabilidade de resposta ao longo dos testes de resistência, foi escolhida para os testes de fermentação em caldo de cana e avaliação da atividade da  $\alpha$ -IPM.

Como abordado anteriormente, a via biossintética da L-leucina tem como ponto de regulação a enzima  $\alpha$ -isopropimalato sintase, que é uma enzima alostérica retro-inibida por altas concentrações de L-leucina. O análogo da L-leucina, TFL, é um composto que permite selecionar leveduras que perderam a capacidade de retro-inibição por L-leucina, e como consequência que produzem maiores quantidades de álcool isoamílico e/ou acetato de isoamila. Por outro lado, a cerulenina é uma droga inibidora da ácido graxo sintetase, e como já comentado anteriormente, esta droga seleciona leveduras que apresentam desregulação da biossíntese de ácidos graxos, podendo apresentar maior produção de ácido caprótico e conseqüentemente, caproato de etila.

Como mostrado na Figura 10, e corroborando os testes de resistência a TFL, a atividade da  $\alpha$ -IPM da cepa LBCM 427 não é retro-inibida por L-leucina até a concentração de 10 mM. Somente na concentração de 20 mM de L-leucina, a atividade da  $\alpha$ -isopropilmalato sintase tem uma inibição de 20%, o que pode significar que a enzima ainda tenha o sítio de retro-inibição, porém outros fatores podem estar atuando neste mecanismo retro-inibição.

Por sua vez, a cepa LBCM 422 mostrou-se insensível até a concentração de 10 mM, mas com 60% de inibição em 20 mM de L-leucina, sugerindo que a enzima da cepa LBCM 422 é mais sensível a L-leucina confirmando os resultados de resistência ao TFL.

Outro fato importante a considerar é que as leveduras mutantes obtidas a partir de cepas de *S. cerevisiae* isoladas da fabricação de vinho e saquê, apresentam uma retro-inibição em 10 mM enquanto as leveduras isoladas no processo produtivo da cachaça é de até 20 mM (Casalone e cols., 1997; Cavalieri e cols., 1999; Satyanarayana e cols., 1968; Ulm e cols., 1972).

A levedura RB 23A, que é uma segregante da cepa parental LBCM 427, não é retro-inibida por L-leucina, e ao contrário, tem sua atividade aumentada em 10% quando comparada a ausência de L-leucina. Sugerindo que independente da presença de L-leucina no meio, a enzima  $\alpha$ -isopropilmalato sintase está em maior atividade. Por outro lado, a segregante RB 8B, que apresentou instabilidade de resistência a TFL (Tabela 5), também não é retro-inibida por L-leucina em 10 mM, mas em 20 mM de L-leucina apresentou atividade da  $\alpha$ -isopropilmalato sintase com 20% inibição.

Após a medida da atividade da  $\alpha$ -isopropilmalato sintase das segregantes RB 23A e RB 8B, o gene LEU4 que codifica esta enzima, foi seqüenciado. Estudos mostram que cepas com mutação no gene LEU4 apresentam resistência a TFL, insensibilidade a retroinibição por L-leucina e produzem elevados teores de álcool isoamílico. Casalone e cols. (1997) caracterizaram molecularmente sete mutantes espontâneos resistentes a TFL, e verificaram mutação no gene LEU4: Gly514Asp, Gly516Asp, Ser519Thr, Glu540Lys, His541Pro, Ser547/8 Ser e Ala552Thr localizadas na região-R da proteína que está envolvida na retro-inibição por L-leucina e inativação mediada por  $Z^{+2}$  e Coenzima A. Outra importante mutação foi localizada no aminoácido Asp578Tyr e que resultou no estreitamento do sitio de ligação da L-leucina consequentemente impedindo sua ligação a proteína (Oba e cols., 2005).

A análise do sequenciamento da segregante RB 23A revelou a presença de três mutações na seqüência traduzida desta cepa. Conforme podemos observar na Figura 11, a seqüência de nucleotídeos identificou uma similaridade de 97% com o gene LEU4 e troca de nucleotídeos em sete posições: 441(A→G), 709(T→C), 746(A→G), 865(A→G), 939(G→A), 1230(G→C) e 1826(T→C). A tradução desta seqüência identificou uma similaridade de 99% com a proteína codificada pelo gene LEU4 e mutação em apenas três aminoácidos: I237, S249, E609 que corresponde a região 709,746 e 1826 de nucleotídeos respectivamente (Figura 12). Quando comparamos esta seqüência com o alinhamento de múltiplas seqüências de  $\alpha$ -IPM conhecidas (ver *Saccharomyces cerevisiae* Database), observamos que a mutação na posição 237 está localizada em uma região altamente conservada, enquanto a 249 está em região medianamente conservada e 609 em uma região variada.

A mutação na posição 237 da seqüência de aminoácidos onde ocorreu a troca de isoleucina por valina, aminoácidos de cadeia lateral apolar, em uma região conservada pode não trazer conseqüências para a estabilidade da estrutura da proteína uma vez que são semelhantes quimicamente. Entretanto a mutação ocorrida na posição 249, onde ocorreu a troca de serina por prolina pode comprometer a flexibilidade da estrutura protéica uma vez que a prolina com seu grupo imino é mantido em uma conformação rígida que reduz a flexibilidade estrutural no ponto da cadeia protéica. A terceira mutação na posição 609, onde ocorre a troca de ácido glutâmico, cadeia lateral carregada negativamente, por glicina,

cadeia lateral não polar, mostra uma mudança radical da característica do aminoácido o que pode por sua vez estar relacionado com alguma mudança estrutural ou funcional na enzima. Resíduos de aminoácidos carregados costumam ser importantes em sítios ativos enzimáticos (Cavalieri e cols., 1999; Oba e cols., 2005).

Surpreendentemente, as mutações encontradas não estão localizadas na região reguladora da proteína descrita pela literatura, porém não podemos afirmar que as mutações não podem causar alguma mudança estrutural que influencie a atividade enzimática indiretamente, esta questão poderia ser melhor investigada por análises de modelagem molecular ou cristalografia de raio-X, porém estas abordagens estão fora do escopo desta tese. Caso as mutações realmente não afetem a estrutura geral e atividade da enzima podem existir outros fatores pós-transcricionais (como glicosilação e fosforilação) que levam a não retro-inibição por L-leucina, ainda que em altas concentrações (20 mM), da cepa RB 23A e que não são possíveis de serem determinados somente com a avaliação da sequência de aminoácidos da proteína deduzida.

O sequenciamento da segregante RB 8B indicou uma identidade da sequência de nucleotídeos de 99% com a sequência LEU 4 (Figura 13). A sequência apresentou trocas de bases nas posições 812(C → T), 865 (T → C), 885(C → T), 938(C → T) e 1230(C → G). Dentre estas trocas, a região 812 e 885 não são comuns entre a segregante RB 8B e RB 23A. Entretanto, estas trocas não resultaram em mudanças de aminoácidos como podemos observar na Figura 14. Estes resultados sugerem que outros mecanismos podem estar interagindo para que mesmo leveduras que apresentam resistência a TFL e ausência de retro-inibição por altas concentrações de L-leucina não apresentem mutações importantes no sítio de ligação da proteína.

### **5.3 – Cepas de leveduras selecionadas usadas na produção de cachaça**

Outra abordagem neste trabalho foi avaliar o comportamento das cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A como cepas iniciadoras no processo fermentativo do caldo de cana em escala piloto. Adicionamos como cepa controle, uma cepa comercial para avaliar comparativamente a capacidade fermentativa das cepas. A segregante RB 23A foi escolhida para este teste por apresentar estabilidade de resistência a TFL e cerulenina e alta atividade da  $\alpha$ -IPM. Conforme pode ser observado na Figura 15, as leveduras LBCM 422,

LBCM 427 e RB 23A apresentaram um perfil semelhante de consumo de sacarose nas duas primeiras repetições (Painel A, B e C). Entretanto, a terceira repetição do processo a cepa LBCM 422 finalizou a fermentação em 24 horas enquanto as cepas LBCM 427 e RB 23A em 48 horas. A cepa comercial não alcançou um consumo completo de sacarose nas repetições no tempo padronizado. Estes dados em conjunto sugerem que estas cepas adaptaram-se bem ao meio caldo de cana (15°Brix) e que a cepa LBCM 422 parece ser uma melhor fermentador do que as demais testadas, ainda que as cepas LBCM 427 e RB 23A apresentam um comportamento muito similar de consumo de sacarose. Quanto a produção de etanol, todas as cepas apresentaram um mesmo perfil quando comparadas no mesmo tempo (Painel D, E e F).

Durante o processo fermentativo, utilizamos o método de mtDNA – RFLP para acompanhar as leveduras no processo fermentativo das cepas LBCM 427, LBCM422, RB 23A. O resultado destes testes revelou que todas as 30 colônias, em todos os tempos coletados apresentaram o mesmo perfil de bandeamento (Figura 16). Apesar de este método não diferenciar entre as leveduras LBCM 422 e LBCM 427, é um bom método para identificar a presença de cepas do gênero *Saccharomyces* e cepas da ecologia de fermentações espontâneas. Além disto, para o objetivo pretendido de verificar se cepas externas contaminariam e prevaleceriam no sistema durante a fermentação esta técnica foi satisfatória. Como este teste foi realizado em uma região distante (Viçosa-MG) do local de origem das leveduras (Ouro Preto-MG), e as condições de fermentação foi adequada, com inóculo inicial denso, é muito provável que de acordo com os resultados obtidos as leveduras iniciadoras se mantiveram presentes ao longo do processo fermentativo.

### 5.3.1-Análise dos componentes voláteis

Os álcoois superiores e ésteres são compostos presentes na cachaça que se incorporam ao sabor e ao aroma da bebida. Esses compostos estão presentes em pequenas quantidades, mas o suficiente para oferecer características próprias a cachaça (Boscolo e cols., 2000; Cardello & Faria, 1998; Nonato e cols., 2001; Oliveira e cols., 2005). Assim, uma vez caracterizados os perfis de crescimento fermentativo das cepas, em condições semelhantes as encontradas na produção da cachaça, dosamos as concentrações de álcool isoamílico; n-propanol; álcool isobutílico; metanol; etanol; acetato de etila; furfural e

acetaldeído presentes na cachaça produzida pelas leveduras. Conforme pode ser observado na Tabela 6, a produção de álcool etílico foi semelhante nas cepas LBCM422, LBCM 427 e RB 23A e estatisticamente significativa mais elevada quando comparada a cepa comercial. A concentração do álcool isobutílico foi significativamente mais elevada na cepa RB 23A quando comparada a produção das cepas LBCM422, LBCM 427 e cepa comercial. As cepas LBCM 422 e LBCM 427 apresentaram uma produção semelhante de álcool isobutílico e significativamente maior quando comparada a cepa comercial. A produção de álcool isoamílico foi semelhante entre as cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A e significativamente mais elevada quando comparada a cepa comercial.

Quando comparamos os teores de álcool isoamílico, álcool isobutílico e acetato de etila encontrados nas cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A com os encontrados por Boscolo e cols (2000), observamos que são de aproximadamente duas vezes superior e o n-propanol, por sua vez, apresentou aproximadamente metade dos valores encontrados por aquele autor (Tabela 1). A Tabela 6 apresenta ainda resultados das dosagens dos compostos voláteis da cachaça produzida no local de origem das leveduras em estudo no ano de 2003 e 2005. Como podemos observar, os teores dos compostos apresentam semelhança nos dois anos de coleta. Quando comparamos os resultados obtidos pelas cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A quanto a produção de álcool isoamílico estas apresentam aproximadamente 4 vezes maior que a cachaça do produtor. O mesmo pode ser observado para a produção de álcool isobutílico e acetato de etila. A produção de acetaldeído foi de aproximadamente 50 vezes superior pelas cepas em estudo quando comparada a cachaça do produtor enquanto a produção de álcool etílico e n-propanol foi semelhante entre as cepas LBCM422, LBCM 427 e RB23 A. Outro aspecto a destacar é que aos teores de álcoois totais encontrados nas cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A estão acima do permitido pela Legislação enquanto ésteres totais estão em acordo com os índices permitidos.

Surpreendentemente, os resultados de produção de álcool isoamílico das cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A não estão em acordo com os resultados obtidos quando as leveduras foram testadas quanto a sensibilidade a TFL, ou seja, cepas resistentes a TFL mostram maior resistência a retroinibição da enzima  $\alpha$ -IPM por L-leucina, tendo como consequência uma maior produção do álcool isoamílico (Ashida e cols., 1987; Casalone e cols., 1997; Yoshizawa, 1999). Este resultado, mais uma vez, sugere que outros fatores

podem estar envolvidos na regulação deste mecanismo de produção de álcool isoamílico pelo menos durante o processo fermentativo utilizado, ou ainda que o álcool isoamílico produzido esteja sendo convertido em algum outro composto não analisado nesta tese.

A síntese de álcool isoamílico pode ser realizada a partir do  $\alpha$ -cetoisocaproato, este um precursor na via de síntese de L-leucina a partir de glicose, ou por redução de  $\alpha$ -cetoácidos (via de Ehrlich). Já a síntese de álcool isobutílico pode ser realizada a partir do  $\alpha$ -cetoisovalerato, um precursor da via biossintética da valina. O  $\alpha$ -cetoisovalerato é convertido pelas enzimas  $\alpha$ -IPM sintase,  $\alpha$ -IPM isomerase, e  $\beta$ -IPM desidrogenase em  $\alpha$ -cetoisocaproato que é convertido em L-leucina ou álcool isoamílico (Figura 2). A  $\alpha$ -IPM sintase é a enzima chave no controle desta via biossintética. Estudos mostram que a adição de altas concentrações individuais de aminoácidos leva ao aumento da produção do respectivo álcool superior e ácido, entretanto também ocorre o aumento de outros álcoois indicando uma maior e complexa interação metabólica (Kodama e cols., 2001; Lilly e cols., 2006; Yoshimoto e cols., 2002). Outro aspecto a considerar são os genes BAT1 e BAT2 que codificam para a transaminação de  $\alpha$ -cetoácidos, primeiro passo na via de Ehrlich, na mitocôndria e citossol respectivamente. Estudos sugerem que a transcrição dos genes da via biossintética de L-leucina (LEU) e BAT são co-regulados pela fonte de nitrogênio e em condições anaeróbicas, Bat1p pode contribuir para a produção de álcool isoamílico. A superexpressão de BAT2 em leveduras resultou no aumento da assimilação de leucina, isoleucina e valina ocorrendo o aumento da produção de álcool isoamílico, entretanto não foi observado o aumento de álcool isobutílico, sugerindo que os mecanismos de produção de álcoois superiores são distintos e inter-relacionados (Kodama e cols., 2001; Yoshimoto e cols., 2002). Conforme podemos observar na Tabela 6, as leveduras LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A produziram teores mais elevados de álcool isoamílico e álcool isobutílico quando comparadas à cepa comercial. Este fato, de forma especulativa, sugere que a presença de maiores quantidades de  $\alpha$ -cetoisovalerato na célula sinalizaria para maiores concentrações da enzima  $\alpha$ -IPM. Esta enzima em maiores concentrações exigiria uma maior concentração de L-leucina para retroinibição (20 mM).

Outra abordagem possivelmente explicativa seria quanto a regulação gênica da  $\alpha$ -IPM. A regulação do gene LEU4 e seu importante produto gênico é muito complexa, e depende de três elementos distantes e um próximo do promotor LEU4. O elemento mais

distante Leu3p, é ligante na sequência ativadora a montante (UAS leu). Mutações nesta região implicam em perda do controle por Leu3p. Os outros dois elementos estão na região identificada como Gen4p sítio de ligação; mutações nesta região eliminam o controle geral de LEU4. A ativação transcricional é aditiva, ou seja, os elementos não competem entre si ou agem sinergicamente. Estudos mostram que as condições do meio de cultivo também interagem na regulação do gene LEU4 como, por exemplo, a presença de fosfato no meio de crescimento diminui em 40% a expressão do gene (Kohlhaw, 2003). Por outro lado, estudos mostram uma nova classe de RNA e que originalmente localizada próximo do elemento promotor conhecido, não atuam como um mRNA, podendo regular a transcrição a jusante do mRNA. As RNAs nucleares pequenos (snRNAs) são encontrados em abundância no núcleo de muitos eucariotos, variando de tamanho entre 106 a 189 nucleotídeos e são complexados com proteínas nucleares pequenas para formar partículas conhecidas como ribonucleoproteínas. A produção de RNAs instáveis são propriedades comuns dos promotores, e que em alguns casos, eles indicam a presença de um promotor auxiliar que ajuda a preservar o estado de repressão ou ativação transcricional independente da presença de mRNA (Davis & Jr, 2006). Estas observações em conjunto, demonstram a complexidade envolvida nos mecanismos de controle e expressão gênica e o número de variáveis que poderiam explicar a ausência de mutação na região do sítio ligante de L-leucina no gene LEU4, a ausência de retroinibição em altas dosagens de L-leucina (20 mM) e resistência a TFL das segregantes RB 23A e RB 8B.

### **5.3.2- Avaliação sensorial de cachaças produzidas com cepas selecionadas como iniciadoras.**

A avaliação sensorial global das cachaças produzidas por três fermentações sucessivas das cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A demonstraram uma boa aceitação pelos provadores. Comparando o perfil sensorial das amostras, não foi possível distingui-las entre si uma vez que apresentam notas de avaliação sensorial intermediária na escala hedônica.

Cachaças produzidas por diferentes cepas de leveduras apresentam variações de concentração de compostos voláteis, mas estas variações podem não resultar em diferenças perceptíveis no aroma e impressão sensorial global da bebida (Oliveira e cols., 2005). As

variações de quantidades e proporções de compostos voláteis não influenciaram na aceitação da cachaça produzida pelas cepas LBCM 422, LBCM 427 e RB 23A. A maior quantidade de álcool isoamílico produzida por estas cepas quando comparada a cepa comercial não contribuiu negativamente na aceitação da cachaça.

O método de análise exploratória mostrou-se útil para a discriminação dos grupos e diferenciou as amostras em três grupos distintos: LBCM422: LBCM 427 e RB 23A; e cepa comercial (Figura 17). O grupo de amostras de cachaças das cepas LBCM 427 e a segregante RB 23A pode ser explicado por apresentarem características bioquímicas e genéticas semelhantes. Por sua vez, os grupos de amostras das cepas LBCM 422 e cepa comercial apresentaram separação espacial sugerindo que elas apresentam características diferentes entre si. Estes dados estão em acordo com os resultados obtidos quando as leveduras foram testadas quanto a cariotipagem e este método revelou diferenças entre as cepas LBCM 422 e LBCM 427. Apesar da proximidade genética destas cepas, elas apresentam características fisiológicas distintas e este fato sugere que uma estratégia para acompanhar a permanência da cepa iniciadora no processo fermentativo da cachaça é o uso combinado de métodos moleculares e bioquímicos.



Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que é possível selecionar cepas com indicativo de alta produção de compostos flavorizantes e que esta área é ampla de possibilidades. Podemos perceber que os fatores genéticos envolvidos nos processos de produção de agentes aromatizantes são bastante complexos incluindo controle ao nível de estrutura gênica, quando aparentemente relacionados ao controle da expressão e atividade do produto gênico. As análises dos segregantes sugerem fortemente que a maioria das características fenotípicas utilizadas no processo de seleção das cepas parece ser poligênica e ter segregação independente. Estes dados demonstram que estudos sobre leveduras utilizadas no processo fermentativo da cachaça ainda são pouco explorados no país, sendo uma área bastante promissora. A investigação das diferenças genéticas e bioquímicas das leveduras utilizadas no processo pode contribuir para ressaltar características sensoriais que diferenciem e ou melhorem a qualidade do produto final. Esses estudos podem determinar novas estratégias, ou ainda melhorar o método patenteado por nosso grupo para o isolamento de leveduras que preservem a qualidade organoléptica sem prejuízo da diversidade de aroma e *bouquet* peculiar da bebida.

A estratégia desenvolvida por nosso laboratório para o isolamento de cepas de *S.cerevisiae* que produzam teores elevados de compostos aromatizantes pode ser considerada validada, pois foi possível verificar que alguns dos compostos analisados estão realmente em maiores teores na bebida produzida em escala piloto. As leveduras isoladas por essa metodologia obtiveram sucesso no processo fermentativo de caldo de cana e produziram uma cachaça com maiores quantidades de componentes voláteis.

Os métodos de identificação molecular utilizados neste trabalho, exceto a cariotipagem, foram falhos para diferenciar cepas isoladas da mesma dorna, como entre as cepas LBCM 422 e LBCM 427. O mesmo ocorreu entre estas e cepas selvagens presentes no local de origem da coletada dois anos após o primeiro isolamento. Como a cariotipagem é considerado um método caro e demorado, podemos sugerir como alternativa o uso aliado de métodos bioquímicos (como a resistência à TFL e cerulenina) e métodos moleculares para diferenciar cepas de origem selvagem umas das outras. Quando o objetivo é identificar cepas de diferentes isolados as técnicas de mtDNA-RFLP, COX-PCR e cariotipagem podem ser utilizadas.

As cepas segregantes da cepa parental LBCM 427 demonstraram instabilidade fisiológica e perda de algumas características fenotípicas. Além disto, estas sub-populações apresentaram diferentes perfis de respostas frente ao mesmo teste bioquímico ao longo dos repasses em meio de cultura. Este resultado pode indicar alterações no padrão de expressão dos genes nas cepas segregantes ou ainda um estado de não haploidia devido à possibilidade da cepa parental poder ser poliplóide. Certamente os dados obtidos demonstram a necessidade de um estudo genético para avaliar a natureza dessas alterações. Outro aspecto é que o método de segregação da cepa LBCM 427 resultou em uma segregante, RB 23A, que produziu quantidade semelhante de compostos voláteis da cepa parental. Podemos considerar que a metodologia utilizada para a escolha da cepa foi válida. Interessante para a continuidade deste estudo poderia ser o cruzamento entre segregantes para estabilização e somatória das características fenotípicas de interesse.

O sequenciamento do gene LEU4 da cepa RB 23A demonstrou que as mutações encontradas não estão localizadas na região reguladora da proteína descrita pela literatura, porém não podemos afirmar que as mutações não podem causar alguma mudança estrutural que influencie a atividade enzimática indiretamente. Por outro lado, o sequenciamento deste gene da cepa RB 8B não demonstrou mutações mesmo esta cepa apresentando alta atividade enzimática na presença de L-leucina (20 mM) e produção de elevados teores de álcool isoamílico. Estes resultados sugerem que outros mecanismos podem estar interagindo para que mesmo leveduras que apresentam resistência a TFL e ausência de retro-inibição por altas concentrações de L-leucina não apresentem mutações importantes no sítio de ligação da proteína.

Finalmente, este trabalho oferece uma importante contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias de seleção de cepas selvagens com características específicas, levando à produção de bebidas de maior qualidade.



- Akada R., Hirosawa I., Hoshida H. & Nishizawa Y. (2001) Detection of a point mutation in FAS2 gene of sake yeast strains by allele-specific PCR amplification. *J.Biosci.Bioeng.* **92**: 189-192.
- Akada R., Matsuo K., Aritomi K. & Nishizawa Y. (1999) Construction of recombinant sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. *J.Biosci.Bioeng.* **87**: 43-48.
- Antunovics Z., Irinyi L. & Sipiczki M. (2005) Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J.Appl.Microbiol.* **98**: 971-979.
- Arikawa Y., Yamada M., Shimosaka M., Okazaki M. & Fukuzawa M. (2000) Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate. *J.Biosci.Bioeng.* **90**: 675-677.
- Aritomi K., Hirosawa I., Hoshida H., Shiigi M., Nishizawa Y., Kashiwagi S. & Akada R. (2004) Self-cloning yeast strains containing novel FAS2 mutations produce a higher amount of ethyl caproate in Japanese sake. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **68**: 206-214.
- Asano T., Kawadu M., Kurose N., Tarumi S. & Kawakita S. (2000) Effect of the FAA1 gene disruption of sake yeast on the accumulation of ethyl caproate in sake mash. *J.Biosci.Bioeng.* **89**: 609-611.
- Ashida S., Ichikawa E., Suginami K. & Imayasu S. (1987) Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. *Agric.Biol.Chem.* **51**: 2061-2065.
- Beltran G., Novo M., Leberre V., Sokol S., Labourdette D., Guillamon J.M., Mas A., François J. & Rozes N. (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature wine-making fermentations. *FEMS Yeast Res.* **6**: 1167-1183.
- Beltran G., Torija M.J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamon J.M., Rozes N. & Mas A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst.Appl.Microbiol.* **25**: 287-293.
- Bendoni B., Cavalieri D., Casalone E., Polsinelli M. & Barberio C. (1999) Trifluoroleucine resistance as a dominant molecular marker in transformation of strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from wine. *FEMS Microbiol.Lett.* **180**: 229-233.
- Boscolo M., Bezerra C.W.B., Cardoso D.R., Neto B.S.L. & Franco D.W. (2000) Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugarcane spirit. *J Braz Chem Soc* **11**: 86-90.

- Boza Y. & Horii J. (1998) Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciênc Tecnol Alim* **18**: 391-396.
- Brasil. Instrução Normativa N° 13, de 29 de Junho de 2005. Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 de jun. de 2005, Seção 1, n 124, 3-5.
- Cardello H.M.A.B. & Faria J.B. (1998) Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus Alba L.*). *Cienc Tecnol Alim* **18**: 169-175.
- Cardoso D.R., Andrade-Sobrinho L.G., Leite-Neto A.F., Reche R.V., Isique W.D., Ferreira M.M., Lima-Neto B.S. & Franco D.W. (2004) Comparison between *cachaça* and rum using pattern recognition methods. *J.Agric.Food Chem.* **52**: 3429-3433.
- Cardoso M.G. (2001) *Produção de aguardente de cana-de-açúcar*. Lavras: Universidade Federal de Lavras - UFLA. pp. 1-264.
- Casalone E., Fia G., Barberio C., Cavalieri D., Turbanti L. & Polsinelli M. (1997) Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine. *Res.Microbiol.* **148**: 613-623.
- Cavalieri D., Casalone E., Bondoni B., Fia G., Polsinelli M. & Barberio C. (1999) Trifluoroleucine resistance and regulation of alpha-isopropyl malate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **261**: 152-160.
- Cavalieri D., Townsend J.P. & Hartl D.L. (2000) Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 12369-12374.
- Celenza J.L. & Carlson M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol.Cell.Biol.* **9**: 5045-5054.
- Cerdan T.G., Goni D.T. & Azpilicueta C.A. (2004) Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. *J Food Eng* **65**: 349-356.
- D'Hautcourt O. & Smart K.A. (1999) Measurement of brewing yeast flocculation. *J Amer Soc Brew Chem* **57**: 123-128.
- Davis C.A. & Jr M.A. (2006) Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **103**: 3262-3267.

- De Barros L.M., Rainieri S., Henschke P.A. & Langridge P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49**: 915-924.
- De Barros L.M., Soden A., Henschke P.A. & Langridge P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**: 4514-4520.
- Dequin S. (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 577-588.
- Dias S., Maia A. & Nelson D. (1998) Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. *CienTecnol Alim* **18**: 331-334.
- Dunn B., Levine R.P. & Sherlock G. (2005) Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC.Genomics* **6**: 53
- Eden A., Van N.L., Drukker M., Benvenisty N. & Debourg A. (2001) Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **55**: 296-300.
- Egli C.M., Edinger W.D., Mitrakul C.M. & Henick-Kling T. (1998) Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J.Appl.Microbiol.* **85**: 779-789.
- Escalona H., Birkmyre L., Piggott J.R. & Paterson A. (2002) Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Anal Chim Acta* **458**: 45-54.
- Falqué E., Fernández E. & Dubourdieu D. (2001) Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta* **54**: 271-281.
- Fernandez-Espinar M.T., Lopez V., Ramon D., Bartra E. & Querol A. (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int.J.Food Microbiol.* **70**: 1-10.
- Ferreira M.M.C., Antunes A.M., Melgo M.S. & Volpe P.L.O. (1999) Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quím.Nova* **22**: 724-731.
- Fraile P., Garrido J. & Ancin C. (2000) Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rose wines. Evolution during fermentation. *J.Agric.Food Chem.* **48**: 1789-1798.
- Fujii T., Kobayashi O., Yoshimoto H., Furukawa S. & Tamai Y. (1997) Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**: 910-915.

- Fujii T., Yoshimoto H. & Tamai Y. (1996) Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. *J Ferm Bioeng* **81**: 538-542.
- Fujiwara D., Kobayashi O., Yoshimoto H., Harashima S. & Tamai Y. (1999) Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast* **15**: 1183-1197.
- Fukuda K., Kiyokawa Y., Yanagiuchi T., Wakai Y., Kitamoto K., Inoue Y. & Kimura A. (2000) Purification and characterization of isoamyl acetate-hydrolyzing esterase encoded by the IAH1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **53**: 596-600.
- Fukuda K., Kuwahata O., Kiyokawa Y., Yanagiuchi T., Wakai Y., Kitamoto K., Inoue Y. & Kimura A. (1996) Molecular cloning and nucleotide sequence of the isoamyl acetate-hydrolyzing esterase gene (EST2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferm Bioeng* **82**: 8-15.
- Fukuda K., Yamamoto N., Kiyokawa Y., Yanagiuchi T., Wakai Y., Kitamoto K., Inoue Y. & Kimura A. (1998) Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**: 4076-4078.
- Gimren-Alcaniz J.V. & Matallana E. (2001) Performance of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is affected by manipulation strategies based on sporulation. *Syst.Appl.Microbiol.* **24**: 639-644.
- Goldstein A. & Lampen J.O. (1975) b-D-fructofuranoside fructo-hydrolase from yeast. *Methods Enzymol.* **42**: 504-511.
- Gravata C.E. (1999) *Manual da cachaça artesanal*. 4 Ed. Belo Horizonte: UNA. pp. 1-104.
- Guerra J.B., Araujo R.A., Pataro C., Franco G.R., Moreira E.S., Mendonca-Hagler L.C. & Rosa C.A. (2001) Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian *cachaça*. *Lett.Appl.Microbiol.* **33**: 106-111.
- Guillamon J.M., Barrio E., Huerta T. & Querol A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **44**: 708-714.
- Hazelwood L.A., tai S.L., Boer V.M., Winde J.H., Pronk J.T. & Daran J.M. (2006) A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res.***6**: 937-945.

- Hernandez-Orte P., Cacho J.F. & Ferreira V. (2002) Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J.Agric.Food Chem.* **50**: 2891-2899.
- Howell K.S., Bartowsky E.J., Fleet G.H. & Henschke P.A. (2004) Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Lett.Appl.Microbiol.* **38**: 315-320.
- Ichikawa E., Hosokawa N., Hata Y., Abe Y., Suginami K. & Imayasu S. (1991) Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric.Biol.Chem.* **55**: 2153-2154.
- Jin Y.L. & Speers R.A. (2000) Effect of Environmental Conditions on the Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **58**: 108-116.
- Jin Y.L. & Speers R.A. (1998) Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res Intern* **31**: 421-440.
- Jiranek V., Langridge P. & Henschke P.A. (1995b) Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H<sub>2</sub>S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. *J.Enol.Vitic* **46**: 269-273.
- Jiranek V., Langridge P. & Henschke P.A. (1995a) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**: 461-467.
- Johnston J.R., Baccari C. & Mortimer R.K. (2000) Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res.Microbiol.* **151**: 583-590.
- Kodama Y., Omura F., Miyajima K. & Ashikari T. (2001) Control of higher alcohol production by manipulation of the BAP2 gene in brewing yeast. *J Ameri Soc Brewing Chem* **59**: 157-162.
- Kohlhaw G., Leary T.R. & Umbarger H.E. (1969) Alpha-Isopropylmalate Synthase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **244**: 2218-2225.
- Kohlhaw G.B. (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **67**: 1-15.
- Lambrechts M.G. & Pretorius I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma – A Review. *S.Afri.J.Enol.Vitic.* **21**: 97-129.
- Legras J.L. & Karst F. (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol.Lett.* **221**: 249-255.

- Legras J.L., Ruh O., Merdinoglu D. & Karst F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int.J.Food Microbiol.* **102**: 73-83.
- Lilly M., Bauer F.F., Styger G., Lambrechts M.G. & Pretorius I.S. (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res.* **6**: 726-743.
- Lilly M., Lambrechts M.G. & Pretorius I.S. (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**: 744-753.
- Lopes C.A., van Broock M., Querol A. & Caballero A.C. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J.Appl.Microbiol.* **93**: 608-615.
- Lopez V., Fernandez-Espinar M.T., Barrio E., Ramon D. & Querol A. (2003) A new PCRbased method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int.J.Food Microbiol.* **81**: 63-71.
- Lopez V., Querol A., Ramon D. & Fernandez-Espinar M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int.J.Food Microbiol.* **68**: 75-81.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**: 265-275.
- Lyness C.A., Steele G.M. & Stewart G.G. (1997) Investigating ester metabolism: characterization of the ATF1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **55**: 141-146.
- Manzano M., Cocolin L., Longo B. & Comi G. (2004) PCR-DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 23-27.
- Marinangeli P., Angelozzi D., Ciani M., Clementi F. & Mannazzu I. (2004) Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterization. *FEMS Yeast Res.* **4**: 427-435.
- Marquina D., Santos A. & Peinado J.M. (2002) Biology of killer yeasts. *Int.Microbiol* **5**:65-71.
- Martinez C., Gac S., Lavin A. & Ganga M. (2004) Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J.Appl.Microbiol.* **96**: 1161-1168.

- Marullo P., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Aigle M. & Dubourdieu D. (2004) Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* **4**: 711-719.
- Mason A.B. & Dufour J.P. (2000) Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* **16**: 1287-1298.
- Morais P.B., Rosa C.A., Linardi V.R., Pataro C. & Maia A.B.R.A. (1997) Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane *aguardente*. *World J Microbiol Biotechnol* **13**: 241-243.
- Mori F.A., Mendes L.M., Trugilho P.F. & Cardoso M.G. (2003) Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana-de-açúcar. *CienTecnol Alim* **23**: 396-400.
- Nascimento R.F., Cerroni J.L., Cardoso D.R., Lima Neto B.S. & Franco D.W. (1998) Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. *Cienc Tecnol Alim* **18**: 350-355.
- Nobrega I.C.C. (2003) Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do "headspace" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Cienc Tecnol Alim* **23**: 210-216.
- Nonato E.A., Carazza F., Silva F.C., Carvalho C.R. & de L.Cardeal Z. (2001) A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. *J.Agric.Food Chem.* **49**: 3533-3539.
- Oba T., Nomiya S., Hirakawa H., Tashiro K. & Kuhara S. (2005) Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **69**: 1270-1273.
- Oba T., Yamamoto Y., Nomiya S., Suenaga H., Muta S., Tashiro K. & Kuhara S. (2006) Properties of a trifluoroleucine-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **70**: 1776-1779.
- Oliveira E.S., Cardello H.M.A.B., Jeronimo E.M., Souza E.L.R. & Serra G.E. (2005) The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of *cachaça*. *World J Microbiol Biotechnol* **21**: 707-715.
- Oliveira E.S., Rosa C.A., Morgano M.A. & Serra G.E. (2004) Fermentation characteristics as criteria for selection of *cachaça* yeast. *World J Microbiol Biotechnol* **20**: 19-24.
- Ostergaard S., Olsson L. & Nielsen J. (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **64**: 34-50.

- Pataro C., Guerra J.B., Petrillo-Peixoto M.L., Mendonca-Hagler L.C., Linardi V.R. & Rosa C.A. (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J.Appl.Microbiol.* **89**: 24-31.
- Pataro C., Santos A., Correa S.R., Morais P.B., Linardi V.R. & Rosa C.A. (1998) Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an *aguardente* distillery. *Rev Microbiol* **29**: 104-108.
- Patel S. & Shibamoto T. (2002) Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. *J.Agric.Food Chem.* **50**: 5649-5653.
- Perez M.A., Gallego F.J. & Hidalgo P. (2001) Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiol Lett.* **205**: 375-378.
- Perez-Ortin J.E., Querol A., Puig S. & Barrio E. (2002) Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* **12**: 1533-1539.
- Plengvidhya V., Breidt J.R. & Fleming H.P. (2004) Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Int.J Microbiol* **81**: 115-125.
- Poggeler S. (2001) Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 589-601.
- Powell C.D., Quain D.E. & Smart K.A. (2003) The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res.* **3**: 149-157.
- Pramateftaki P.V., Lanaridis P. & Typas M.A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol* **89**: 236-248.
- Pretorius I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**: 675-729.
- Pretorius I.S. (2003) The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. In *Genetics and Genomics of Industrial Yeasts*. Ed J.H.Winde. Heidelberg - Germany: Springer. pp.99-134.
- Pretorius I.S. & Bauer F.F. (2002) Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* **20**: 426-432.

- Pretorius I.S. & Hoj P.B. (2005) Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Austral Grape Wine Res* **11**: 83-108.
- Puig S., Querol A., Barrio E. & Perez-Ortin J.E. (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2057-2061.
- Querol A. & Barrio E. (1990) A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1657
- Querol A., Barrio E., Huerta T. & Ramon D. (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* **58**:2948-2953.
- Querol A., Barrio E. & Ramon D. (1992b) A comparative-study of different methods of yeast-strain characterization. *Syst Appl Microbiol* **15**: 439-446.
- Querol A., Barrio E. & Ramon D. (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int.J.Food Microbiol.* **21**: 315-323.
- Ribeiro C.A.F. & Horii J. (2004) Negative H<sub>2</sub>S character and flocculation as yeast strain markers for inoculum recovery. *Sci.agric.* **61**: 292-297.
- Romano P., Paraggio M. & Turbanti L. (1998) Stability in by-product formation as a strain selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *J.Appl.Microbiol.* **84**: 336-341.
- Rosa G.R., Rigon L., Correa S., Reetz E., Vencato A. & Beling R.R. (2005) Produção e exportação de Cachaça *Anuário Brasileiro da Cana-de -Açucar 2005* 1-136.
- Sabate J., Cano J., Querol A. & Guillamon J.M. (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol* **26**:452-455.
- Salgado A.P.C., Schuller D., Casal M., Leão F.C., Carling D., Fietto L.G., Trópia M.J., Castro I.M. & Brandão R.L. (2002) Relationship between protein kinase C and derepression of different enzymes. *FEBS Letters* **532**: 324-332.
- Satyanarayana T., Umbarger H.E. & Lindegren G. (1968) Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of Leucine biosynthesis in prototrophic and leucine auxotrophic strains. *J Bacteriol* **96**: 2018-2024.
- Schoondermark-Stolk S.A., Tabernero M., Chapman J., Ter Schure E.G., Verrips C.T., Verkleij A.J. & Boonstra J. (2005) Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Res.* **5**: 757-766.

- Schuller D., Valero E., Dequin S. & Casal M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol.Lett.* **231**: 19-26.
- SEBRAE B. (2002) Plano de reestruturação da cadeia da cachaça de alambique em Minas Gerais. *SEBRAE - Minas Gerais* **1**: 1-56.
- Sipiczki M., Romano P., Capece A. & Paraggio M. (2004) Genetic segregation of natural *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from spontaneous fermentation of Aglianico wine. *J.Appl.Microbiol.* **96**: 1169-1175.
- Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henchke P.A. & Pretorius I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austral J Grape Wine Res* **2**: 139-173.
- Torija M.J., Rozes N., Poblet M., Guillamon J.M. & Mas A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 345-352.
- Ulm E.H., Bohme R. & Kohlhaw G. (1972) Alpha-isopropylmalate synthase from yeast - purification, kinetic studies, and effect of ligands on stability. *J Bacteriol* **110**:1118-1126
- Valero E., Schuller D., Cambon B., Casal M. & Dequin S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* **5**: 959-969.
- Van Der Sluis C., Rahardjo Y.S.P., Smit B.A., Kroon P.J., Hrtmans S., Ter Schure E.G., Tramper J. & Wijffels R.H. (2002) Concomitant extracellular accumulation of alpha-keto acids and higher alcohols by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng* **93**: 117-124.
- Verstrepen K.J., Bauer F.F., Michiels C., Winderickx J., Derdelinckx G., Pretorius I.S., Thevelein J.M. & Delvaux F.R. (2001) Late fermentation expression of FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem* **59**: 69-76.
- Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Dufour J.P., Winderickx J., Pretorius I.S., Thevelein J.M. & Delvaux F.R. (2003a) The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res.* **4**: 285-296.
- Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H. & Delvaux F.R. (2003b) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **61**: 197-205.
- Verstrepen K.J., Van Laere S.D., Vanderhaegen B.M., Derdelinckx G., Dufour J.P., Pretorius I.S., Winderickx J., Thevelein J.M. & Delvaux F.R. (2003c) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2

- control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5228-5237.
- Verstrepen K.J., Van Laere S.D., Vercaemmen J., Derdelinckx G., Dufour J.P., Pretorius I.S., Winderickx J., Thevelein J.M. & Delvaux F.R. (2004) The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. *Yeast* **21**:367-377.
- Vianna E. & Ebeler S.E. (2001) Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 589-595.
- Vicente, M. A. (2003). Seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com maior capacidade de produção de agentes aromatizantes para utilização na fabricação da cachaça de alambique, Dissertação de mestrado, 91 f, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.
- Vicente, M. A., Fietto, L. G., Castro, I. M., Coutrin, M. X., and Brandão, R. L (2003). Metodologia para isolamento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com características mais adequadas a produção de cachaça. Patente INPI-315, Minas Gerais - Brasil.
- Vicente M.A., Fietto L.G., Castro I.M., Santos A.N.G., Coutrin M.X. & Brandão R.L. (2006) Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit. *Int. J. Food Microbiol.* 51-59.
- Vuralhan, Z., Luttk, M.A.H., Tai, S.L., Boer, V.M., Morais, M.A., Schipper, D., Almering, M.J., Kotter, P., Dickinson, J.R., Daran, J.-M. & Pronk, J.T. (2005) Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3276-3284
- Webster R.F. & Gross S.R. (1965) The alpha-isopropylmalate synthase of *Neurospora I.* the kinetics and end product control of alpha-isopropylmalate synthetase function. *Biochemistry* **4**: 2309-2318.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetic. In *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Eds M.A.Inns, D.H.Gelfrand, J.J.Sninsky & T.J.With. New York: Academic Press. pp. 315-322.
- Yoshikawa S., Oguri I., Kondo K., Fukuzawa M., Shimosaka M. & Okazaki M. (1995) Enhanced formation of isoamyl alcohol in *Zygosaccharomyces-rouxii* due to elimination of feedback inhibition of alpha-isopropylmalate synthase. *FEMS Microbiol Lett.* **127**: 139-143.

Yoshimoto H., Fukushige T., Yonezawa T. & Sone H. (2002) Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **59**: 501-508.

Yoshizawa K. (1999) Sake: production and flavor. *Food Res Intern* **15**: 83-107.